



HAL
open science

**CARACTERISATION DES PROTEINES DE
GRANULES DENSES DE TOXOPLASMA
GONDII:Etude des interactions protéiques et lipidiques
et du rôle des hélices alpha-amphipatiques de GRA2**

Laetitia Travier

► **To cite this version:**

Laetitia Travier. CARACTERISATION DES PROTEINES DE GRANULES DENSES DE TOXOPLASMA GONDII:Etude des interactions protéiques et lipidiques et du rôle des hélices alpha-amphipatiques de GRA2. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00182730

HAL Id: tel-00182730

<https://theses.hal.science/tel-00182730>

Submitted on 26 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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I
LABORATOIRE ADAPTATION ET PATHOGENIE DES
MICRO-ORGANISMES CNRS UMR 5163 - UJF

Thèse
pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Ecole Doctorale Chimie Sciences du Vivant
Discipline : Biologie Cellulaire

Présentée par

Laetitia TRAVIER

**CARACTERISATION DES PROTEINES DE
GRANULES DENSES DE *TOXOPLASMA GONDII* :**
**Etude des interactions protéiques et lipidiques et
du rôle des hélices alpha-amphipatiques de GRA2**

Soutenue publiquement le 11 octobre 2007 devant le jury composé de :

Gérard BRANDOLIN	Président de Jury
Catherine BRAUN-BRETON	Rapporteur
Stan TOMAVO	Rapporteur
Claudie VERWAERDE	Examineur
Franck FIESCHI	Examineur
Maryse LEBRUN	Invitée
Corinne MERCIER	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie en tout premier lieu Marie-France Cesbron-Delauw de m'avoir accueillie durant ces quatre années de thèse dans son laboratoire.

Je tiens à remercier Gérard Brandolin de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

J'adresse mes vifs remerciements à Maryse Lebrun, Catherine Braun-Breton et Stan Tomavo d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

J'exprime ma reconnaissance à Claudie Verwaerde et Franck Fieschi d'avoir bien voulu évaluer ce travail en tant qu'examineurs.

Je remercie tout particulièrement Corinne Mercier qui a dirigé ce projet avec une incroyable implication sans laquelle tout ce travail n'aurait pas été possible. Merci pour son aide, son soutien constant, sa disponibilité, sa patience, ses précieux conseils et sa rigueur scientifique qui ont fait progresser ce travail.

Merci également à tous ceux qui ont collaboré à ce travail : Laurence Braun qui a initié le projet de purification des protéines GRA, Mohamed Ali Hakimi pour ses précieux conseils biochimiques et pour avoir fait progresser mes travaux grâce à sa fine critique scientifique, Jérôme Garin et Sylvie Kieffer pour l'analyse par MS/MS des protéines associées à GRA5-HA-FLAG, Jean-François Dubremetz et Ricardo Mondragon pour leurs superbes photos de microscopie électronique et leur importante participation à l'étude des hélices alpha-amphipatiques de GRA2, enfin, Ralph Schwarz qui m'a chaleureusement accueillie pendant un mois dans son unité très sympathique et Nahid Azzouz pour la recherche des glycanes portés par GRA2 et GRA6 et pour sa sympathie.

Je remercie tout le personnel du laboratoire et tous les membres de l'équipe qui m'ont aidée et soutenue, plus particulièrement Pauline Ruffiot, Amina Bittame et Claire Gendrin dont les résultats ont contribué à faire évoluer ce travail, Karine Musset pour sa gestion très efficace de la culture cellulaire sans laquelle le laboratoire ne fonctionnerait pas, mais aussi pour sa précieuse amitié, Cyrille Botté qui a su égayer le laboratoire grâce à son humour décalé et son optimisme, Nhémé Saksouk et Evelyne Coursange dont l'aide, le soutien et l'amitié ont rendu mon quotidien plus chaleureux. Merci également à Jean Gagnon qui a cru dans ce projet et dont l'implication a donné un nouvel élan à ces travaux. Enfin merci à Samira Khaldi qui a été une stagiaire très sympathique et très motivée.

J'adresse enfin mes vifs remerciements à ma famille et mes amis pour leur confiance et leur générosité, principalement Séverine pour nos interminables discussions, sa patience et son infaillible soutien.

Merci à Martin, de m'avoir écoutée, épaulée et aidée avec autant de patience, de constance et d'implication. Ces remerciements ne sont pas à la hauteur de ton soutien quotidien.

Enfin, je remercie la Région Rhône-Alpes pour avoir financé ce projet et la Faculté de Pharmacie pour m'avoir accordée un demi-poste d'ATER.

Les travaux exposés dans ce manuscrit ont été présentés :

- dans deux publications :

[1] Travier L, Mondragon R, Dubremetz JF, Musset K, Mondragon M, Gonzales S, Cesbron-Delauw MF and Mercier C (accepté dans International Journal for Parasitology). *Functional domains of the Toxoplasma GRA2 protein in the formation of the Membranous Nanotubular Network of the parasitophorous vacuole.*

[2] Travier L*, Braun L*, Kieffer S, Musset K, Garin J, Mercier C and Cesbron-Delauw MF (* contribution égale à ce travail) (accepté dans Molecular and Biochemical Parasitology). *Purification of Toxoplasma dense granule proteins reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway.*

- lors de congrès :

- VIII^e International Congress on Toxoplasmosis ; mai 2005, Ajaccio.

Travier L, Dubremetz JF, Cesbron-Delauw MF and Mercier C. *A strategy of deletion mutants to investigate the functional domains of the Toxoplasma dense granule protein GRA2.* (Poster).

- COST Action 857 : Apicomplexan Biology in the Post-Genomic Era ; 17-20 mai 2006, Dresden, Allemagne.

Travier L*, Braun L*, Musset K, Hakimi MA, Mercier C and Cesbron-Delauw MF (* contribution égale à ce travail). « *Toxoplasma dense granules proteins : exploration of the interactome before and after secretion into the parasitophorous vacuole* ». (Présentation orale).

Autres participations :

- Journée des étudiants de l'Université Joseph Fourier ; octobre 2004, Grenoble.

Travier L, Cesbron-Delauw MF and Mercier C. *Toxoplasma gondii : strategy of deletion mutants to investigate the functional domains of the secreted protein GRA2.* (Poster).

- Journée de l'Ecole Doctorale Chimie Sciences du Vivant de l'Université Joseph Fourier ; mai 2005, Grenoble.

Travier L, Cesbron-Delauw MF and Mercier C. *Toxoplasma gondii : strategy of deletion mutants to investigate the functional domains of the secreted protein GRA2.* (Poster).

- Journée des étudiants de l'Université Joseph Fourier ; octobre 2005, Grenoble.

Travier L, Dubremetz JF, Cesbron-Delauw MF and Mercier C. *A strategy of deletion mutants to investigate the functional domains of the Toxoplasma dense granule protein GRA2.* (Poster).

Encadrement au cours de ma thèse :

- Vacations en Biologie pour les étudiants de Licence 1 et 2 à l'Université Joseph Fourier, Grenoble : TP Biologie Animale (35h), TP Génétique Microbienne (64h), TP Biochimie (40h) et TD Découverte de la Biologie (23h).

- Encadrement d'un stagiaire Master 1 (avril-juillet 2005).

- Demi- poste d'ATER Immunologie. UFR Pharmacie. Université Joseph Fourier, Grenoble.
Responsable : E. Drouet (UJF CNRS FRE 2854 ; Institut de Virologie Moléculaire et Structurale).

TD d'Immunologie (8h), TP de Bactériologie (64h) et de Parasitologie (60h) pour les étudiants de 3^{ème} année.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	
CHAPITRE I. LE PARASITE <i>TOXOPLASMA GONDII</i>, L'AGENT PATHOGENE DE LA TOXOPLASMOSE .	5
A. Découverte du parasite.....	5
B. Phylogénie de <i>T. gondii</i>	6
C. Les différentes souches génotypiques de <i>T. gondii</i>.....	7
D. Le cycle biologique	8
1. <i>Le cycle sexué.....</i>	<i>9</i>
2. <i>Le cycle asexué.....</i>	<i>10</i>
a) <i>Ultrastructure du kyste.....</i>	<i>11</i>
b) <i>L'interconversion.....</i>	<i>11</i>
E. La toxoplasmose	13
1. <i>Prévalence</i>	<i>13</i>
2. <i>Pathogénicité.....</i>	<i>14</i>
a) <i>Chez les sujets immunocompétents.....</i>	<i>14</i>
b) <i>La toxoplasmose congénitale</i>	<i>14</i>
c) <i>La toxoplasmose chez les sujets immunodéprimés</i>	<i>15</i>
d) <i>Isolats de virulence exacerbée</i>	<i>15</i>
3. <i>Facteurs influençant la toxoplasmose</i>	<i>16</i>
F. La réponse immunitaire développée lors d'une infection par <i>T. gondii</i>.....	16
1. <i>Réponse innée</i>	<i>16</i>
2. <i>Réponse cellulaire</i>	<i>18</i>
3. <i>Subversion de la réponse immunitaire par le parasite.....</i>	<i>20</i>
G. Diagnostics, traitements et vaccins	20
CHAPITRE II. BIOLOGIE DU TACHYZOÏTE	22
A. Le génome nucléaire.....	24
B. Les organites possédant un génome extra-nucléaire.....	25
1. <i>La mitochondrie.....</i>	<i>25</i>
2. <i>L'apicoplaste.....</i>	<i>25</i>
C. Les organites impliqués dans le transport protéique	27
1. <i>Le réticulum endoplasmique.....</i>	<i>27</i>
2. <i>L'appareil de Golgi.....</i>	<i>28</i>
D. Le complexe apical.....	28
1. <i>Le conoïde et le cytosquelette de microtubules.....</i>	<i>29</i>
a) <i>Le conoïde.....</i>	<i>29</i>

b)	Le cytosquelette de microtubules.....	30
2.	<i>La pellicule et le cytosquelette d'actine</i>	32
a)	La membrane plasmique.....	32
b)	Le complexe membranaire interne.....	33
c)	Les microfilaments d'actine.....	33
3.	<i>Les micronèmes</i>	35
a)	Sécrétion des micronèmes.....	35
b)	Ciblage protéique vers les micronèmes.....	35
c)	Fonctions des protéines de micronèmes.....	36
4.	<i>Les rhoptries</i>	36
a)	Biosynthèse des rhoptries.....	37
b)	Ciblage des protéines de rhoptries.....	37
c)	Fonctions des protéines de rhoptries.....	38
d)	Les lipides des rhoptries.....	39
E.	Le processus d'invasion	39
1.	<i>Le gliding</i>	41
2.	<i>L'attachement du parasite à la cellule hôte et l'engagement vers l'invasion cellulaire</i>	41
a)	L'attachement initial.....	42
b)	L'attachement apical.....	42
c)	L'engagement vers l'invasion.....	42
3.	<i>Le glideosome et l'invasion active du parasite</i>	44
4.	<i>La formation de la vacuole parasitophore</i>	45
F.	La multiplication intracellulaire des parasites	47
CHAPITRE III. LA VACUOLE PARASITOPHORE ET LES PROTEINES DE GRANULES DENSES	50	
A.	La vacuole parasitophore	50
1.	<i>Modifications de la cellule hôte suite à la formation de la vacuole parasitophore</i>	51
a)	Redistribution du cytosquelette contre la vacuole parasitophore.....	51
b)	Redistribution des endo-lysosomes.....	52
c)	Redistribution des mitochondries et du réticulum endoplasmique.....	52
2.	<i>Deux systèmes de tubules membranaires dans la vacuole</i>	53
a)	Les HOST (Host Organelles Sequestering Tubulo-structures).....	53
b)	Le réseau de nanotubes membranaires.....	54
3.	<i>La vacuole parasitophore, une interface d'échange entre le parasite et la cellule hôte</i>	57
B.	Les granules denses	59
1.	<i>Sécrétion constitutive ou sécrétion régulée ?</i>	60
2.	<i>Les protéines stockées dans les granules denses présentent un haut niveau de compaction</i>	61
C.	Les protéines de granules denses	61
1.	<i>Les protéines GRA</i>	63
a)	Caractérisation moléculaire des protéines GRA.....	63
✓	Peptide signal N-Terminal.....	63
✓	Domaines hydrophobes.....	63
✓	Domaines particuliers.....	64
✓	Modifications post-traductionnelles.....	65
b)	Régulation de l'expression des gènes des protéines GRA.....	65
c)	Le polymorphisme des gènes <i>GRA</i> chez les différentes souches parasitaires.....	66
d)	Implication des protéines GRA dans la virulence du parasite.....	66

e)	Les protéines GRA et l'immunité	67
f)	L'utilisation des protéines GRA dans les tests diagnostics et les stratégies vaccinales.....	68
2.	<i>Les autres protéines de granules denses</i>	69
a)	Les cyclophilines	69
b)	Les NTPases	69
c)	Les inhibiteurs de sérine protéase.....	70
d)	Les cathepsines.....	71
e)	Les protéines 14-3-3.....	71
3.	<i>L'association membranaire post-sécrétoire des protéines GRA</i>	71
4.	<i>Implication des protéines GRA dans la maturation de la vacuole parasitophore</i>	75
5.	<i>Redistribution des protéines GRA au niveau du kyste</i>	79

BUT DU PROJET 83

RESULTATS

CHAPITRE IV. ETUDE DES PROPRIETES BIOCHIMIQUES DES PROTEINES GRA DANS LES GRANULES DENSES ET LA VACUOLE PARASITOPHORE 87

A.	Contexte	87
1.	<i>Les granules de sécrétion sont largement distribués chez les eucaryotes</i>	88
a)	Vers une évolution convergente des granules chez les eucaryotes	88
b)	Les granules de sécrétion des eucaryotes possèdent une morphologie commune mais sont impliqués dans des fonctions différentes.....	89
✓	Prédation et pathogénicité :.....	89
✓	Défense et protection :	90
✓	Fonctions spécifiques des métazoaires :	90
c)	Caractéristiques des granules au cœur dense (DCG).....	90
d)	Les granules denses de <i>Toxoplasma</i>	91
2.	<i>Le ciblage des protéines vers la voie de sécrétion granulaire</i>	92
a)	Association membranaire	93
b)	Liaison à des cargos protéiques	93
c)	Agrégation	94
d)	Synergie des mécanismes évoqués	95
3.	<i>Solubilisation des protéines de membrane</i>	96
a)	Trafic individuel : repliement.....	96
b)	Trafic en complexe : protection des zones hydrophobes par des cofacteurs	97
B.	Problématique	98
C.	Etude des interactions établies entre protéines GRA, avant et après leur secretion dans la vacuole parasitophore	99
1.	« Purification of <i>Toxoplasma dense granule proteins</i> reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway »	99
2.	<i>Résultats complémentaires et discussion</i>	117
a)	Purification de GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG	117
b)	Etude des protéines GRA associées à GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG au cours de leur trafic	118
✓	Interactions dans le parasite	118
✓	Interactions lors de la sécrétion <i>in vitro</i>	119
✓	Interactions dans la vacuole parasitophore	120

✓	Bilan des interactions entre protéines GRA	121
c)	Effet du niveau d'expression des protéines GRA fusionnées à l'étiquette HA-FLAG sur leurs interactions avec les autres protéines GRA	121
d)	L'agrégation des protéines GRA	124
✓	Séparation des protéines GRA par biochimie conventionnelle.....	124
✓	Les formes de solubilisation des protéines GRA avant, pendant et après sécrétion (thèse de P. Ruffiot, juillet 2007)	124
e)	Etude des modifications post-traductionnelles de GRA2 et GRA6	125
✓	Phosphorylation de GRA2, GRA6 et GRA9	125
✓	Glycosylation de GRA6	126
✓	Identification des O-glycanes portés par GRA2.....	127
D.	Conclusion générale.....	130
1.	<i>Solubilité des protéines GRA dans les GD et lors de leur sécrétion dans la VP.....</i>	<i>130</i>
2.	<i>Agrégation des protéines GRA dans les GD.....</i>	<i>131</i>
3.	<i>Ciblage des protéines GRA vers la voie de sécrétion des GD.....</i>	<i>131</i>
4.	<i>Sécrétion des protéines GRA dans la VP en vue de leur association membranaire</i>	<i>132</i>
CHAPITRE V.	ETUDE DE L'ASSOCIATION DE GRA2 AUX MEMBRANES DU RNM	135
A.	Contexte.....	135
1.	<i>Mécanismes d'insertion membranaire</i>	<i>136</i>
a)	L'insertion d'un segment transmembranaire	136
b)	Insertion assistée	136
c)	Insertion spontanée.....	137
d)	Stabilisation des protéines après insertion : Réarrangements dans la membrane	138
✓	Interactions protéine-lipides.....	138
✓	Interactions protéine-protéine.	139
2.	<i>Génération et maintenance de courbures membranaires.....</i>	<i>139</i>
a)	Courbure générée par mécanisme de charpentage.....	140
✓	Dynamines	140
✓	Protéines à domaine BAR.....	140
✓	Protéines à IMD.....	142
b)	Courbure générée par mécanisme de courbure spontanée locale	142
✓	Insertion partielle d'une hélice amphipatique	142
✓	Insertion d'un segment hydrophobe en épingle.....	142
c)	Rôle du cytosquelette.....	143
✓	Déformations générées par les microtubules	144
✓	Déformations générées par les filaments d'actine	144
d)	Les senseurs de courbure.....	145
B.	Problématique	145
C.	Etude du rôle des hélices alpha-amphipatiques de GRA2 dans la formation du RNM	146
1.	« <i>Functional domains of the Toxoplasma GRA2 protein in the formation of the Membranous Nanotubular Network in the parasitophorous vacuole</i> »	146
2.	<i>Conclusion</i>	178
3.	<i>Résultats complémentaires : identification de partenaires lipidiques spécifiques</i>	179
a)	Interactions GRA2-lipides	179
b)	Interactions des autres protéines GRA avec les lipides	181
4.	<i>Etude in vitro de l'interaction de GRA2 avec des membranes modèles</i>	183
a)	Association de GRA2 aux GUVs formées de lipides complexes (thèse de P. Ruffiot).....	183

✓	Concentration de GRA2, GRA6 et GRA7 au niveau de microenvironnements à la surface des GUVs isolées..	184
✓	Répartition de GRA2 et GRA7 au niveau des zones de contact entre GUVs	185
✓	GRA2 et GRA7 sont associées à des fils membranaires.....	185
✓	Interdépendance de GRA2 et GRA6 pour leur association aux membranes des GUVs.....	186
b)	Association spontanée de GRA2 aux SUVs formées de lipides complexes.....	187
c)	Effet tubulogénique direct de GRA2 sur les membranes des SUVs.....	188
D.	Conclusion générale	189

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	195
A. Problème de la solubilité des protéines GRA dans les granules denses et la vacuole parasitophore.....	195
B. Ciblage spécifique des protéines GRA vers les membranes du RNM	196
C. Association membranaire de GRA2 et formation du RNM	197
1. <i>Etude de la structure tridimensionnelle de GRA2 et GRA6.....</i>	198
2. <i>Mise en évidence des lipides partenaires de GRA2</i>	198
3. <i>Détermination des paramètres de liaison de GRA2 aux SUVs</i>	199
4. <i>Définition des domaines de liaison aux membranes.</i>	199
5. <i>Caractérisation du processus de tubulation</i>	200

MATERIEL ET METHODES..... 203

A. MATERIEL	203
1. <i>Vecteurs de clonage :</i>	203
a) • Clonage de produits PCR :	203
b) • Vecteurs utilisés dans le cadre de l'expression ectopique de protéines chez <i>T. gondii</i> :	203
2. <i>Les amorces et plasmides recombinants :</i>	204
3. <i>Souche bactérienne :</i>	204
4. <i>Souches de parasites :</i>	204
5. <i>Souches recombinantes parasitaires :</i>	204
6. <i>Souches cellulaires :</i>	204
7. <i>Anticorps :</i>	211
8. <i>Protéines recombinantes produites par des bactéries E. coli BL21 transformées par les plasmides correspondants :</i>	211
B. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	211
1. <i>Conditions de culture et de stockage des bactéries :</i>	211
2. <i>Préparation de bactéries compétentes :</i>	211
3. <i>PCR (Polymerase Chain Reaction) et RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) :</i>	212
4. <i>Clonages dans le vecteur TOPO® :</i>	213
5. <i>Mini préparation plasmidique par lyse alcaline :</i>	213
6. <i>Digestion totale de l'ADN plasmidique :</i>	213
7. <i>Ligation du vecteur et de l'insert PCR digérés et purifiés :</i>	214
C. METHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE	214
1. <i>Culture et stockage des tapis cellulaires et des parasites :</i>	214
2. <i>Marquage métabolique de parasites sauvages par la Glucosamine H³ :</i>	215
3. <i>Transfection de toxoplasmes, sélection et clonage des parasites recombinants :</i>	215

4.	<i>Immunofluorescence indirecte (IF) :</i>	216
5.	<i>Invasion cellulaire synchronisée :</i>	216
6.	<i>Microscopie Electronique à Transmission (TEM).</i>	216
7.	<i>Microscopie Electronique à Balayage (SEM).</i>	217
8.	<i>Sécrétion in vitro des protéines granulaires :</i>	217
9.	<i>Partition parasitaire par le Triton X-114 :</i>	218
10.	<i>Fractionnement des produits vacuolaires :</i>	218
D.	METHODES DE BIOCHIMIE	219
1.	<i>SDS-PAGE et détection des protéines par coloration au Bleu de Coomassie, à l'argent ou par immunoblot:</i>	219
a)	<i>Séparation des protéines par SDS-PAGE :</i>	219
b)	<i>Détection des protéines contenues dans le SDS-PAGE par coloration à l'argent :</i>	219
c)	<i>Détection des protéines par immunoblot :</i>	220
2.	<i>Electrophorèse bidimensionnelle :</i>	220
a)	<i>Préparation des échantillons protéiques :</i>	220
b)	<i>1ère dimension :</i>	220
c)	<i>2ème dimension :</i>	221
3.	<i>Superposition protéines/lipides :</i>	221
4.	<i>Chromatographie d'affinité sur résine FLAG :</i>	221
5.	<i>Chromatographie d'absorption sur phosphocellulose :</i>	222
6.	<i>Chromatographie par exclusion de taille :</i>	222
7.	<i>Recherche de N- et O-Glycanes dans les protéines GRA2 et GRA6</i>	222
a)	<i>Immunoprécipitation des protéines GRA2 et GRA6 :</i>	223
b)	<i>Digestion protéasique de GRA2 :</i>	223
c)	<i>Chromatographie d'affinité sur colonne de Jacaline :</i>	223
d)	<i>Chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavaline A :</i>	223
8.	<i>Analyse protéique par MS/MS</i>	224
	BIBLIOGRAPHIE	227

ABREVIATIONS

DC : cellule dendritique

GD : granule dense

DGDG : digalactosyldiacylglycerol

EVP : extensions de la membrane délimitant la vacuole parasitophore

GPI : glycosylphosphatidylinositol

HOST : Invaginations de la membrane délimitant la vacuole qui permettent la séquestration des vésicules de l'hôte

IMC : complexe membranaire interne

M Φ : macrophage

MTOC : Centre organisateur des microtubules

MVP : membrane de la vacuole parasitophore

NK : Natural killer

PA : acide phosphatidique

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatidyléthanolamine

PG : phosphatidylglycérol

PI : phosphatidylinositol

PIP : phosphoinositides phosphatés

PMN : leucocytes polymorphonucléaires

PS : phosphatidylsérine

RNM : réseau de nanotubes membranaires

VP : vacuole parasitophore

Avant-Propos

AVANT-PROPOS

Toxoplasma gondii est le pathogène eucaryote unicellulaire responsable de la toxoplasmose. C'est un parasite intracellulaire obligatoire qui appartient au phylum des *Apicomplexa*. A l'intérieur de sa cellule hôte, *Toxoplasma* se multiplie au sein d'une vacuole parasitophore (VP), interface d'échange entre le parasite et son hôte. Cette VP le protège des voies endocytaires cellulaires tout en lui apportant de nombreux éléments vitaux. La VP est formée lors de l'invasion active de la cellule hôte par le parasite. Ce processus est assuré notamment par trois types d'organites de sécrétion spécifiques des *Apicomplexa* : les micronèmes qui permettent la reconnaissance et l'adhésion du parasite à la cellule hôte, les rhoptries qui initient la formation de la VP et les granules denses qui permettent sa maturation. La VP est caractérisée par trois systèmes membranaires différents : la membrane délimitant la VP (MVP), les invaginations de la MVP sous tendues de microtubules cellulaires (HOST) qui permettent la séquestration de vésicules endocytaires de l'hôte dans la VP et le réseau de nanotubes membranaires (RNM) qui connecte les parasites à la MVP. Le RNM a un rôle structural car il assure la cohésion des parasites dans la VP lors de leurs divisions synchronisées. Il pourrait également avoir une fonction trophique et servir de relai pour l'import des divers nutriments récupérés depuis la cellule hôte, au niveau de la MVP, jusqu'au parasite ou pour l'export de protéines du parasite vers la MVP ou au delà de la MVP, dans la cellule hôte. Aux divers systèmes membranaires de la VP sont associées plusieurs protéines de granules denses (GD) appelées protéines GRA. Les protéines GRA sont stockées sous formes solubles et agrégées dans les GD avant d'être sécrétées sous forme soluble dans la VP. La plupart s'associent ensuite de manière différentielle, aux membranes de la VP : à la MVP, aux HOST ou au RNM. Les protéines GRA possèdent toutes un peptide signal N-terminal hydrophobe qui les cible vers la voie de sécrétion. La plupart possèdent également deux régions hydrophiles qui encadrent un domaine central hydrophobe responsable de leur association aux membranes de la VP. La protéine GRA2 notamment, s'associe au RNM dont elle initie la tubulation, *via* ses hélices alpha-amphipatiques.

Dans le cadre global de l'étude de la biogénèse de la VP, mon projet de thèse visait 1) à mieux comprendre comment GRA2, et plus généralement les protéines GRA, peuvent-elles être stockées dans les GD et sécrétées sous forme soluble dans la VP alors que leur domaine central hydrophobe font d'elles des protéines membranaires ; 2) à identifier les mécanismes responsables du tropisme des protéines GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9 associées au RNM pour ces membranes et 3) à déterminer comment GRA2 s'associe-t-elle aux membranes du RNM dont elle induit la formation.

Dans une première partie, je vais introduire de manière générale la pathogénie, la biologie, la VP et les protéines de GD de *Toxoplasma*. J'exposerai ensuite mes travaux sur l'étude du comportement biochimique particulier des protéines GRA au cours de leur trafic depuis les GD jusque dans la VP. Cette étude repose 1) sur l'analyse par biochimie conventionnelle des protéines GRA stockées dans les GD et 2) sur la purification de GRA2, GRA3, GRA5, GRA6 et GRA7, fusionnées à une étiquette HA-FLAG, à partir d'extraits parasitaires et vacuolaires et la recherche des protéines GRA associées. Ces travaux seront notamment décrits dans l'article « Purification of *Toxoplasma* dense granule proteins reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway » accepté dans le journal « Molecular and Biochemical Parasitology ». Ils s'accompagneront également d'une étude préliminaire sur les modifications post-traductionnelles des protéines GRA associées au RNM. Viendra ensuite l'étude du rôle des différentes hélices alpha-amphipatiques de GRA2, plus particulièrement sa troisième hélice récemment prédite, dans son trafic, son association au RNM et à GRA6 et dans la formation du RNM et l'organisation des parasites dans la VP. Cette étude repose sur l'analyse par immunofluorescence, microscopie électronique à balayage et à transmission, fractionnement parasitaire et vacuolaire du comportement de huit mutants de délétion de GRA2. Elle est exposée dans l'article « Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the Membranous Nanotubular Network in the parasitophorous vacuole » accepté dans le journal « International Journal for Parasitology ». Ces travaux seront suivis d'une première recherche des interactions lipidiques établies par GRA2, ce qui permettra de discuter de sa propriété tubulogénique.

Enfin, dans une brève conclusion, je reprendrai les acquis de mes travaux de thèse et donnerai les pistes d'études futures qu'ils ont permis de définir.

Introduction

CHAPITRE I

Le parasite *Toxoplasma gondii*, l'agent pathogène de la toxoplasmose

Toxoplasma gondii est un protozoaire appartenant au phylum des *Apicomplexa* qui regroupe de nombreux agents pathogènes d'incidence majeure sur le plan médical et vétérinaire (*Plasmodium* responsable du paludisme, *Eimeria* responsable des coccidioses aviaires, etc). *T. gondii* peut infecter tous les animaux homéothermes : oiseaux, mammifères, y compris l'homme, chez lesquels il provoque la toxoplasmose, probablement la parasitose humaine la plus répandue dans le monde. Parasite intracellulaire obligatoire, *T. gondii* se multiplie au sein d'une vacuole parasitophore (VP) qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire développée lors de la phase aigüe de l'infection. Cette phase aigüe est suivie par l'enkystement du parasite dans les organes où la pression du système immunitaire est la plus faible. Cette interconversion est caractéristique de la phase chronique de l'infection qui perdure toute la vie de l'individu.

A. DECOUVERTE DU PARASITE

T. gondii a été isolé pour la première fois en 1908, simultanément par Nicolle et Manceaux, à Tunis, chez un rongeur nord africain, le gondi, et par Splendore, au Brésil, chez un lapin (Nicolle and Manceaux, 1909 ; Splendore, 1909).

Après sa découverte, *T. gondii* a été observé chez de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux, mais ce n'est que dans les années 1920 que les premiers cas de toxoplasmose humaine ont été mis en évidence. Les données sur le toxoplasme et son épidémiologie ont été acquises très progressivement. La mise au point des premiers tests sérologiques dans les années 1940 révèle la forte prévalence de la toxoplasmose humaine. Le cycle biologique de ce parasite et la compréhension de son mode de transmission ne sont établis que dans les années 1960 par Hutchison et Work, d'une part (Hutchison, 1965) et par Frenkel et Dubey, d'autre part (Frenkel *et al.*, 1969).

B. PHYLOGENIE DE *T. GONDII*

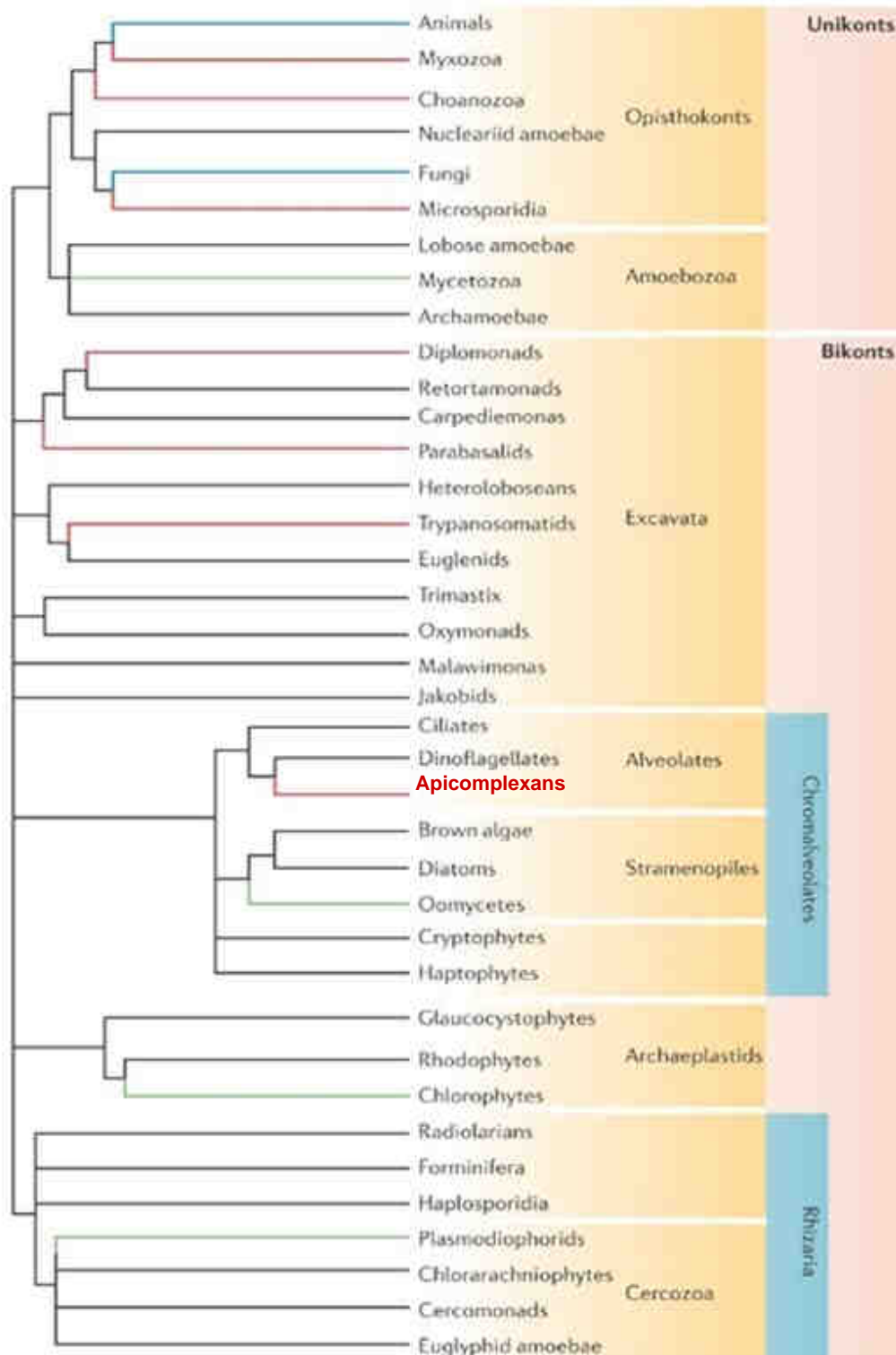


Figure 1 : Relations phylogénétiques entre les eucaryotes montrant les principales familles de parasites et pathogènes. Cet arbre comprend les groupes qui incluent essentiellement ou exclusivement des parasites animaliers (rouge), des pathogènes de plantes (vert) et les espèces majeures d'animaux et de champignons (bleu). Haldar *et al.*, 2006 d'après Embley and Martin, 2006.

Dans le règne des *Protista* et le phylum des *Apicomplexa*, *T. gondii* est un protozoaire qui appartient à la classe des *Coccidea*, l'ordre des *Eimariida*, la famille des *Sarcocystidae*. Le phylum des *Apicomplexa* inclut de nombreux pathogènes d'importance médicale ou vétérinaire tels que *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Sarcosystis*, *Eimeria*, *Babesia* et *Neospora* qui est le plus proche cousin de *T. gondii* (Figures 1 et 2).

De tous les parasites *Apicomplexa*, *Toxoplasma* est celui qui se cultive le plus facilement *in vitro*. Il peut être manipulé génétiquement de façon aisée et son génome est complètement séquencé et en cours d'assemblage. Enfin, il dispose de bons modèles animaux. Par ces aspects, *Toxoplasma* est devenu le modèle d'étude de certains parasites *Apicomplexa*.

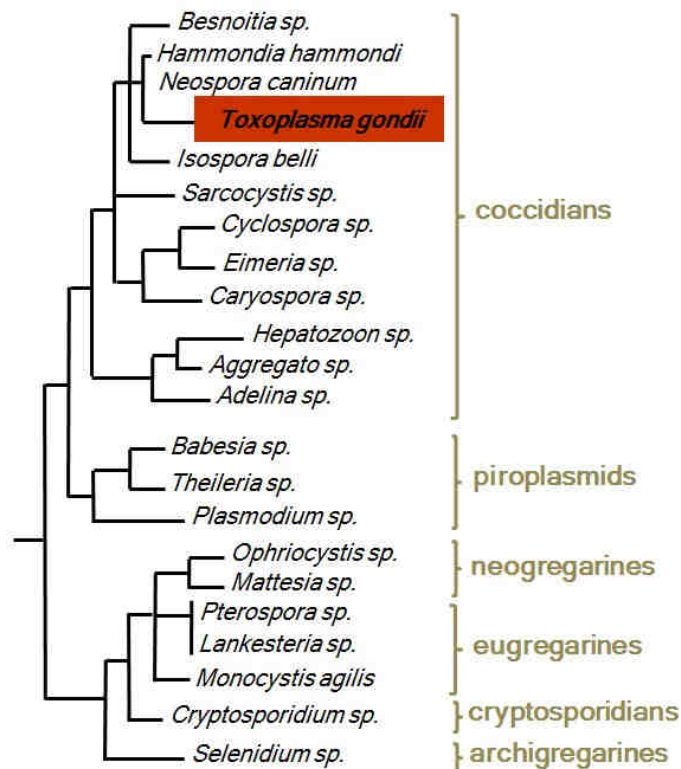


Figure 2 : Relations phylogénétiques entre les *Apicomplexa* établies en fonction de l'analyse des séquences de leurs petites sous-unités d'ARN ou d'ADN ribosomal, d'après Kopečna *et al.*, 2006 et Leander *et al.*, 2006.

C. LES DIFFERENTES SOUCHES GENOTYPIQUES DE *T. GONDII*

Bien qu'une seule espèce *T. gondii* soit décrite au sein du genre *Toxoplasma*, plus de 200 isolats parasitaires ont bénéficié d'analyses génotypiques. A l'heure actuelle, il est admis que la population de *T.*

gondii est constituée de trois lignées clonales prédominantes : les souches de génotype I, II et III (Howe and Sibley, 1995). Globalement, cette classification est corrélée avec la virulence des souches dans le modèle murin d'une part, et avec l'origine de la souche (l'homme *versus* les réservoirs animaux), d'autre part. Les souches de type I sont représentées par la souche RH que j'ai utilisée au cours de ma thèse, et qui a été isolée par Sabin en 1941, à partir d'un cas d'encéphalite humaine aiguë (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). Les souches de type II et III, moins virulentes, se caractérisent chez la souris, par une infection chronique avec persistance de kystes intracérébraux. Les différentes souches classées selon ces trois génotypes sont issues de la prolifération clonale de trois ancêtres qui dérivent d'un unique embranchement génétique (Dardé, 2004).

Moins de 1% des isolats étudiés présentent un génotype original avec une grande divergence dans leur séquence d'ADN (acide désoxyribonucléique). Ces isolats sont considérés comme « exotiques » ou « atypiques ». Toutefois, cette faible diversité est sous-estimée car la plupart des isolats étudiés ont été collectés à partir de patients et d'animaux domestiques d'Amérique du Nord et d'Europe. Ainsi, dans les isolats humains, il existe une prépondérance des souches de type II (81 %). La fréquence des souches de type I et III n'est que de 10 % et 7 %, respectivement. Le type II est apparemment responsable de la quasi-totalité des toxoplasmoses en France métropolitaine, qu'elles soient asymptomatiques ou non. La plupart des formes sévères sont associées au génotype parasitaire de type I, combiné ou non avec une infection par une souche de type II, ou à des génotypes plus rares, recombinants ou atypiques. En effet, des analyses génétiques suggèrent que des recombinaisons entre deux souches ancêtres sont à l'origine d'une descendance recombinante dont un petit nombre est devenu majoritaire dans certaines parties du monde (Boyle *et al.*, 2006). Il existe donc un lien entre la souche et l'importance des manifestations cliniques. Ce lien est évident dans le cadre des toxoplasmoses sévères, voire mortelles, qui ont récemment été isolées chez des patients immunocompétents en Guyane (cf chapitre I E 2 d). L'analyse de ces isolats montre un plus grand polymorphisme génétique qui ne permet de les classer dans aucun des trois génotypes déjà décrits. Se développant dans un environnement exotique avec des réservoirs animaliers plus variés (animaux sauvages) qu'en Amérique du Nord ou en Europe, ces souches semblent s'être diversifiées pour mieux survivre et se propager en s'adaptant à leur niche écologique (Ajzenberg *et al.*, 2004).

D. LE CYCLE BIOLOGIQUE

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 ainsi que l'homme, qui constituent ses hôtes intermédiaires. *T. gondii* y développe un cycle évolutif incomplet composé uniquement d'une phase

asexuée. Chez l'hôte définitif, le chat et les félicés, *T. gondii* peut par contre développer un cycle évolutif complet avec une phase sexuée et une phase asexuée (**Figure 3**).

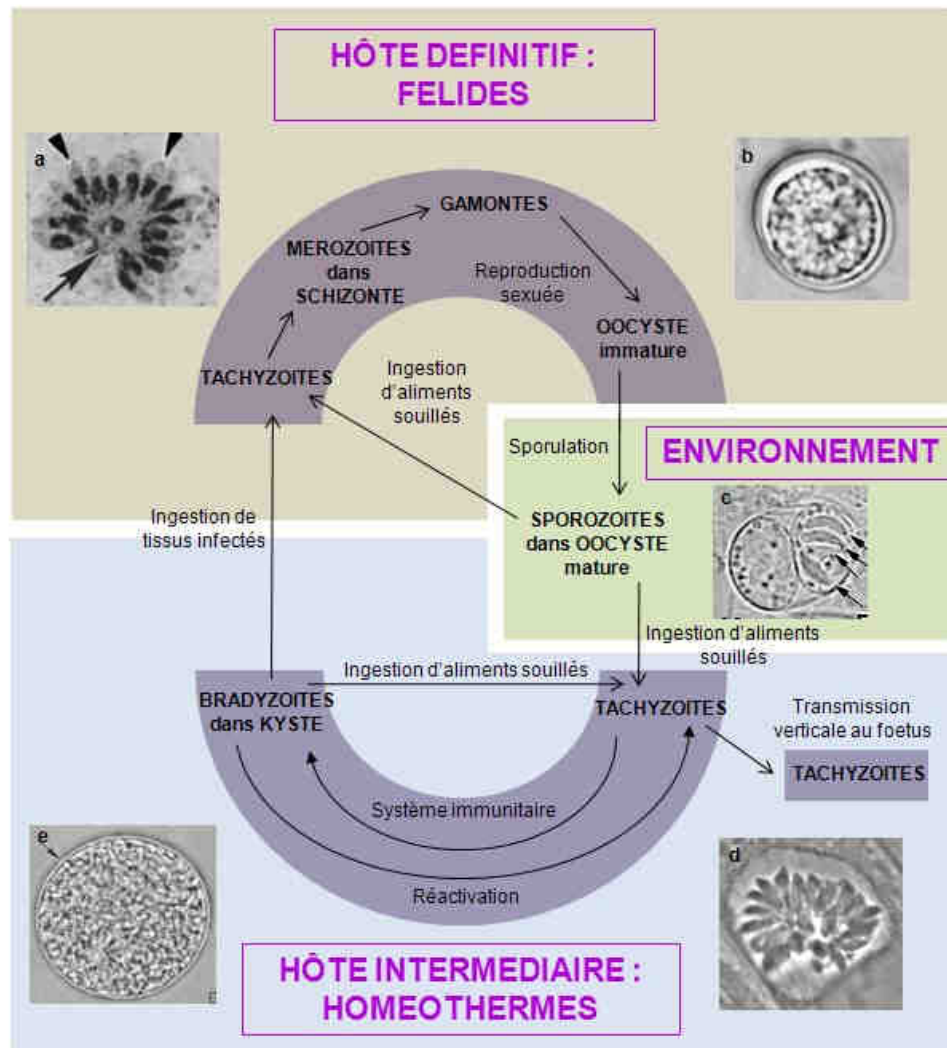


Figure 3 : Cycle de *T. gondii*. (a) Schizonte (flèche) contenant plusieurs mérozoïtes (pointes de flèches) dans le petit intestin du chat. (b) Oocyste non sporulé contenu dans les fèces du chat. (c) Oocyste sporulé composé de deux sporocystes qui contiennent chacun quatre sporozoïtes (flèches). (d) Vacuole parasitophore contenant des tachyzoïtes dans des fibroblastes humains. (e) Kyste contenant de nombreux bradyzoïtes. Les photos a et b sont issues de Hill and Dubey, 2002 ; les photos c et e de Dubey *et al.*, 1998.

1. Le cycle sexué

L'hôte définitif s'infecte après l'ingestion d'oocystes matures souillant la terre ou les herbes ou le plus souvent, par carnivorerisme, en dévorant de petits rongeurs ou des oiseaux parasités par des kystes. En effet, les oocystes et kystes correspondent à des formes de résistance et de dissémination du parasite car ils protègent dans une certaine mesure, les parasites qu'ils contiennent du milieu extérieur. Les

sporozoïtes ou bradyzoïtes émergents se transforment rapidement en tachyzoïtes capables de se diviser. Ceux-ci se différencient ensuite en mérozoïtes dans l'épithélium du petit intestin de l'hôte définitif. Les mérozoïtes se multiplient dans un schizonte dans lequel ils se divisent par schizogonie, processus au cours duquel les noyaux parasites se multiplient dans un même cytoplasme et aboutissent à la libération d'autant de parasites qu'il y a de noyaux. Après leur libération, les mérozoïtes se différencient en gamontes (production de microgamètes mâles et de macrogamètes femelles) et initient le cycle sexué qui débute deux jours après l'ingestion du kyste.

Les gamontes sont localisés dans les cellules épithéliales de l'iléon, contre les villosités du petit intestin. Le macrogamonte femelle est sphérique et contient un noyau au centre. Le microgamonte mâle est ovoïde ou en forme d'ellipse. Lors de la microgamétogénèse, le noyau du microgamonte se divise et produit 10 à 21 noyaux. Les microgamontes peuvent ainsi contenir jusqu'à 21 microgamètes qui utilisent leurs flagelles pour pénétrer et fertiliser les macrogamètes matures. La fécondation des macrogamètes par les microgamètes donne naissance à des oocystes immatures qui sont libérés dans la lumière intestinale, puis éliminés dans l'environnement par millions, avec les fèces du chat.

Les oocystes rejetés, immatures car non sporulés, ont une forme sphérique de 12 μm de diamètre. Ils subissent une maturation 1 à 5 jours après l'excrétion. La sporulation aboutit à la formation de huit sporozoïtes infectieux. Les oocystes sont très résistants en milieu humide, tant aux agents physiques ou chimiques qu'aux bactéries et champignons (Dubey *et al.* 1970). Dès l'infection orale, les oocystes sporulés initient une nouvelle infection avec une période courte dans l'intestin des hôtes intermédiaires ou de l'hôte définitif.

2. Le cycle asexué

Chez les hôtes intermédiaires, l'infection se fait essentiellement par voie orale, après l'ingestion soit d'oocystes matures provenant d'aliments souillés, soit de kystes contenus dans les viandes peu ou pas cuites. Après digestion de l'oocyste ou du kyste dans l'estomac et le petit intestin, les formes parasites infectantes, sporozoïtes ou bradyzoïtes, sont libérées et vont très vite se différencier en tachyzoïtes. Ceux-ci se disséminent dans l'organisme par voie sanguine et lymphatique, ce qui correspond à la phase aiguë de la maladie. Capables d'infecter tous les types cellulaires, les tachyzoïtes gagnent les différents tissus tels que les muscles et le système nerveux central. A l'intérieur des cellules, le parasite se multiplie par endodyogénie, processus au cours duquel deux cellules filles se forment à l'intérieur de la cellule mère (cf chapitre II E). La cellule hôte est ensuite lysée, libérant les tachyzoïtes.

Cette courte phase proliférative est rapidement contrôlée par le système immunitaire de l'hôte et aboutit à la formation de kystes localisés dans les organes les moins accessibles par le système immunitaire : muscles, système nerveux central, yeux, testicules, etc. Observée 10 à 15 jours après l'ingestion d'oocystes, la formation de kystes contenant les bradyzoïtes marque le début de la phase chronique de la maladie. Ces kystes vont alors persister pour le reste de la vie de l'hôte. Ce cycle asexué peut également se produire chez les félinés.

a) Ultrastructure du kyste

Les kystes de *Toxoplasma* sont des structures intracellulaires de 50 à 70 µm de diamètre qui contiennent jusqu'à 1000-2000 bradyzoïtes (**Figure 4**). Même si leur association étroite avec les éléments du cytosquelette de la cellule hôte n'est pas un cas général, les kystes restent enveloppés dans les filaments intermédiaires de l'hôte mais ils excluent les mitochondries et le réticulum endoplasmique de la cellule hôte de leur surface (Halonen *et al.*, 1998). Les kystes de *Toxoplasma* sont délimités par une membrane unique et par une paroi kystique fine et élastique qui leur confère une propriété de résistance importante (Sims *et al.*, 1988). La paroi kystique provient de la modification de la paroi de la VP. Elle est constituée d'une membrane intérieurement doublée d'un matériel granulaire condensé en couches homogènes (Ferguson and Hutchison, 1987). Elle contient des polysaccharides et de la chitine (Weiss and Kim, 2000).

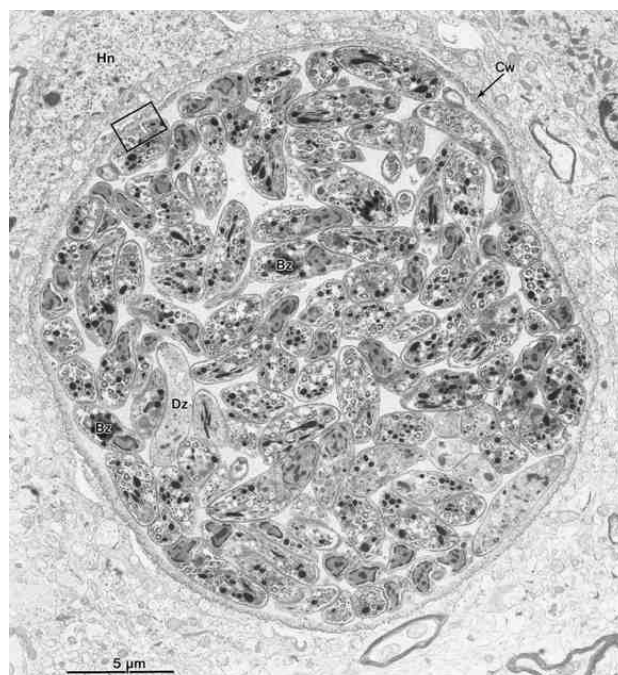


Figure 4 : Kyste de *T. gondii* issu de cerveau de souris inoculée huit mois avant avec des oocystes. La paroi du kyste (Cw, flèche) délimite environ 110 bradyzoïtes (Bz). Le kyste est localisé près du noyau de la cellule hôte (Hn). Dubey *et al.*, 1998.

b) L'interconversion

Le processus de conversion entre la forme répliquative, le tachyzoïte, et la forme à division lente, le bradyzoïte, est une étape importante dans la pathogénèse et la persistance de la toxoplasmose. Lors du processus d'enkystement qui débute deux jours après l'invasion des tachyzoïtes, un des premiers marqueurs de la différenciation en bradyzoïte est le changement de mode de division des parasites. Ils passent d'une endodyogénie synchronisée à une endodyogénie asynchrone ou schizogonie couplée avec

la ségrégation de l'apicoplaste (Dzierszinski *et al.*, 2004). La VP est modifiée et la paroi kystique est formée bien avant que le processus de conversion soit terminé.

Le développement des kystes est corrélé à l'induction de plusieurs protéines de stress et à une diminution du métabolisme parasite. Il est également caractérisé par l'apparition de grains d'amylopectine constituant une réserve d'énergie et la disparition des corps lipidiques. Les bradyzoïtes et les tachyzoïtes sont très similaires morphologiquement, à l'exception du noyau qui est plus postérieur et des rhoptries et micronèmes qui sont plus nombreuses dans le bradyzoïte (Coppin *et al.*, 2003). Les bradyzoïtes complètement différenciés sont bloqués en phase Go du cycle cellulaire.

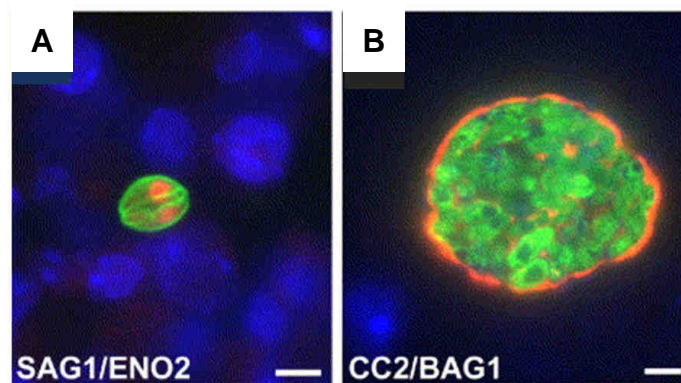


Figure 5 : Deux formes développementales différentes de *Toxoplasma*. (A) Immunofluorescence sur tachyzoïtes issus du poumon d'une souris à l'aide d'un anti-SAG1 (vert) et d'un anti-ENO2 (rouge). (B) Immunofluorescence sur un kyste issu du cerveau d'une souris à l'aide d'un anti-BAG1 (vert) et d'un anti-CC2 (rouge). Echelle : 5 µm. Ferguson, 2004.

La transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes ne se produit pas de façon synchrone au sein d'une population parasite clonée. Il s'agit d'un phénomène progressif, au cours duquel les parasites vont passer par une série de stades intermédiaires jusqu'au kyste mature contenant les bradyzoïtes. Les bradyzoïtes contenus dans un même kyste peuvent présenter des degrés différents de différenciation (Lane *et al.*, 1996). La différenciation en bradyzoïtes s'accompagne d'une diminution progressive de l'expression de l'antigène de surface majeur du stade tachyzoïte SAG1 (Surface Antigen 1) et des enzymes ENO2 (Enolase 2) et LDH1 (Lactate Déshydrogénase 1) ainsi que d'une augmentation des protéines spécifiques du stade bradyzoïte telles que la protéine HSP30/BAG1 (Heat Shock Protein/Bradyzoïte Antigen 1) et l'enzyme LDH2, toutes les deux cytoplasmiques, l'enzyme nucléaire ENO1, les antigènes de surface P18/SAG4A, SRS9/P36 (SAG-Related Sequence 9), SAG5A, SAG2C et SAG2D et les glycoprotéines CC2 et CST1 de 116 kDa de la paroi du kyste. La dernière protéine à apparaître est l'antigène de surface P21 qui est détecté uniquement lorsque la conversion est complète, c'est à dire dans les kystes matures (Zhang *et al.*, 2001 ; Lekutis *et al.*, 2001 ; Ferguson, 2004 ; Van *et al.*, 2007) (**Figure 5**).

La formation spontanée de kystes est observée *in vitro* dans des souches de toxoplasmes à croissance lente (souches kystogènes). Par contre, pour les souches à croissance rapide telles que la souche

virulente RH, la formation des kystes est très rarement observée. Toutefois, sous certaines conditions de stress, l'induction de la transformation des tachyzoïtes a pu être obtenue *in vitro* (Bohne *et al.*, 1999 ; Risco-Castillo *et al.*, 2004 ; Weiss *et al.*, 1995, 2000).

E. LA TOXOPLASMOSE

1. Prévalence

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

Alors qu'en Amérique du Nord, en Grande-Bretagne, en Scandinavie et en Asie du Sud-est, moins de 30% de la population semble infectée, la séroprévalence est supérieure à 60 % en Afrique et en Amérique Latine. En France, elle 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. La prévention de la toxoplasmose est une priorité du programme d'action de l'Institut de Veille Sanitaire (Afssa, 2005).

La toxoplasmose est également un problème de santé vétérinaire car elle affecte un grand nombre d'hôtes intermédiaires, dont les animaux d'élevage, sources potentielles de contamination pour l'homme. Ainsi, en France, plus de 50% du bétail, en particulier les ovins, est contaminé. De plus, elle est responsable d'avortements chez les ovins, entraînant de ce fait, des pertes économiques pour les éleveurs (Dubey and Lindsay, 2006).

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.

2. Pathogénicité

a) Chez les sujets immunocompétents

L'infection par *T. gondii* présente deux phases : 1) une phase aiguë lors de la primo-infection (forme tachyzoïte proliférative) qui est endiguée par la réponse immunitaire de l'hôte. Cette phase est généralement bénigne puis 2) une phase chronique asymptomatique (forme bradyzoïte enkystée) qui stimule une immunité protectrice contre une réinfection. La phase aiguë peut parfois se traduire par un syndrome pseudo grippal accompagné ou non d'adénopathies (Montoya and Liesenfeld, 2004). Des atteintes viscérales sévères sont possibles mais exceptionnelles. 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. Ils sont généralement bien tolérés par l'organisme mais ils sont susceptibles de se réactiver lors de l'affaiblissement du système 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* à 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 et manipulerait le comportement de l'hôte parasité afin d'assurer sa transmission : le rat infecté perdrait ainsi ses réflexes de fuite, son aversion pour l'odeur du chat serait annihilée et remplacée par une attraction pour les phéromones du chat. Chez l'homme infecté, il semblerait que les temps de réaction soient allongés (Vyas *et al.*, 2007 ; Webster, 2001).

La toxoplasmose est donc 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.

b) La toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale résulte du passage *trans*-placentaire des parasites circulant dans le sang maternel de la femme enceinte primo-infectée pendant la grossesse. L'immaturation du système immunitaire du fœtus l'empêche alors de combattre efficacement le parasite. La probabilité de transmission du parasite au fœtus augmente au cours de la grossesse alors que la gravité de l'atteinte fœtale diminue (Montoya and Liesenfeld, 2004). Sans traitement, la manifestation la plus courante d'une infection précoce du fœtus est une encéphalomyélite aux conséquences graves (avortement spontané ou mortalité néonatale). Les survivants souffrent généralement de retards mentaux progressifs ou d'autres déficiences neurologiques. Si la transmission materno-fœtale du parasite intervient tardivement au cours de la grossesse, les effets sur le fœtus sont moins sévères. Cependant, ils risquent de développer à l'adolescence des symptômes

oculaires (rétinohoroïdite, strabisme, cécité), neurologiques (déficience psychomotrice, convulsions, retards mentaux) ou auditifs (surdité) (Rorman *et al.*, 2006).

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 (Afssa, 2005). La toxoplasmose congénitale est donc placée au premier rang des affections congénitales pour lesquelles un dépistage prénatal ou néonatal est effectué. La connaissance du statut immunitaire permet d'agir sur la prévention de l'infection et de limiter les risques de toxoplasmose congénitale.

c) La toxoplasmose chez les sujets immunodéprimés

Résultant soit d'une primo-infection, soit d'une réactivation à partir des kystes présents chez un sujet antérieurement infecté, la toxoplasmose affecte les sujets présentant une immunosuppression sévère (SIDA, allogreffe de moelle osseuse, greffe d'organe, chimiothérapie). La réactivation parasitaire correspond à une conversion des bradyzoïtes en tachyzoïtes consécutive à l'état d'immunodépression, suivie d'une multiplication et d'une dissémination des tachyzoïtes dans l'organisme du patient, ce qui peut provoquer une encéphalite mortelle si elle n'est pas rapidement traitée.

L'infection toxoplasmique est particulièrement grave chez les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et dont l'immunodéficience est avancée. Selon les enquêtes, 12 à 47 % des personnes infectées par le virus du VIH et séropositives pour *T. gondii*, souffrent d'une réactivation parasitaire en l'absence d'un traitement prophylactique efficace (Kasper and Buzoni-Gatel, 1998). En France, le nombre de cas déclarés de toxoplasmose chez les patients atteints du VIH est d'environ 200 par an, après avoir sensiblement diminué entre 1992 (800 cas) et 1997 (250 cas) avec l'avènement des trithérapies (Afssa, 2005).

Lors d'une greffe d'organe ou de moelle osseuse, le patient receveur, soumis au traitement immunosuppresseur mis en place pour éviter les épisodes de rejet ou à une irradiation réalisée avant la greffe, peut développer une toxoplasmose lorsque le greffon est issu d'un donneur infecté (Hill and Dubey, 2002).

d) Isolats de virulence exacerbée

En Guinée française, plusieurs patients immunocompétents ont récemment développé une toxoplasmose sévère suivie par le décès de l'un d'eux. L'analyse du génome des parasites isolés chez ces patients montre une très grande diversité par rapport aux isolats répandus en Amérique du Nord et en Europe. Ces isolats n'ont pu être classés dans aucun des trois génotypiques déjà définis et ils sont donc considérés comme « atypiques » (Ajzenberg *et al.*, 2004).

3. Facteurs influençant la toxoplasmose

La gravité de l'infection toxoplasmique dépend de la virulence de la souche (cf chapitre I C et I E 2 d), de l'importance de l'inoculum et de la voie d'infection. Elle dépend également de l'hôte et plus particulièrement, de son statut immunitaire (cf chapitre I E 2), mais aussi de son âge et de son sexe.

L'étude de la pathogénèse de la toxoplasmose chez le modèle murin montre que la sensibilité des souris selon les lignées, est très variable (Araujo *et al.*, 1976). Les différences de sensibilité de l'infection chez la souris impliquent notamment certains gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Deckert-Schluter *et al.*, 1994).

Le rat constitue un bon modèle d'étude de l'infection toxoplasmique car sa résistance à l'infection aiguë est similaire à celle de l'homme. De manière originale, la souche de rat Lewis est totalement résistante à l'infection par *Toxoplasma* : la sérologie reste négative et les parasites ne peuvent pas être mis en évidence. La résistance des rats Lewis est dépendante des cellules hématopoïétiques. Elle est partiellement annulée par la neutralisation de l'IFN- γ (Interféron γ). Elle est associée à la capacité des macrophages (M Φ) à empêcher la prolifération du parasite. Elle s'exprime selon un mode dominant et elle est conférée par le locus *Toxo1* localisé sur le chromosome 10 (Sergent *et al.*, 2005 ; Cavallès *et al.*, 2006).

F. LA REPONSE IMMUNITAIRE DEVELOPPEE LORS D'UNE INFECTION PAR *T. GONDII*

Chez un individu immunocompétent, l'infection toxoplasmique se traduit par une réponse innée suivie de la mise en place rapide d'une réponse immune spécifique médiée majoritairement par une réponse à médiation cellulaire de type Th1. Cette réponse Th1 est particulièrement efficace pour contrôler la prolifération des tachyzoïtes et permettre l'établissement d'une infection chronique caractérisée par la conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes à l'intérieur de kystes intracellulaires. L'immunité acquise lors de la primo-infection contrôle la réactivation ultérieure des parasites enkystés (Capron and Dessaint, 1988). Elle permet également la mise en place d'une protection totale, durable et spécifique contre toute réinfection (Remington and Krahenbuhl, 1982).

1. Réponse innée

L'infection toxoplasmique se traduit par la mobilisation des leucocytes polymorphonucléaires (PMN qui regroupent les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles) sur le site de l'infection. Ces cellules

immunorégulatrices recrutent les cellules dendritiques (DC) *via* la production de chimokines, initient leur contact avec les parasites ou les antigènes et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 (Interleukine 12) et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) qui activent les DC. Cette production est dépendante du récepteur CXCR2 (CXC Chemokine Receptor 2) de l'IL-8 impliquée dans le chimiotactisme. Les DC activées sécrètent en retour de l'IL-12 (Denkers *et al.*, 2004).

Plusieurs voies de signalisation différentes et actuellement en cours d'étude contrôlent la production d'IL-12 par les neutrophiles et les DC. Ces voies sont initiées par la reconnaissance des plusieurs molécules parasitaires, notamment les glycosylphosphatidylinositols (GPI) qui permettent notamment l'ancrage des protéines de surface parasitaires (protéines SAG, essentiellement), une profiline et une cyclophiline de 18 kDa (Cy-18) qui est sécrétée par les parasites extracellulaires, par plusieurs récepteurs en surface des neutrophiles et/ou des DC tels que les récepteurs TLR (Toll-like receptor, notamment les TLR2, 4 et 11) et le récepteur aux chimokines CCR5 ((C-C motif) Receptor 5). Ces voies conduisent pour la plupart à l'activation de voies de signalisation dépendante d'une protéine Gi ou des voies NF κ B (Nuclear Factor kappa beta) et MAPK (Mitogen Activated protein Kinase) qui induisent la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et le TNF- α . Ces mécanismes qui pourraient être co-dépendants expliquent en partie la capacité du parasite à induire une forte réponse cellulaire Th1 (Aliberti and Sher, 2002 ; Denkers, 2003 ; Debierre-Grockiego *et al.*, 2007 ; Yarovinsky *et al.*, 2005 ; Yarovinsky and Sher, 2006).

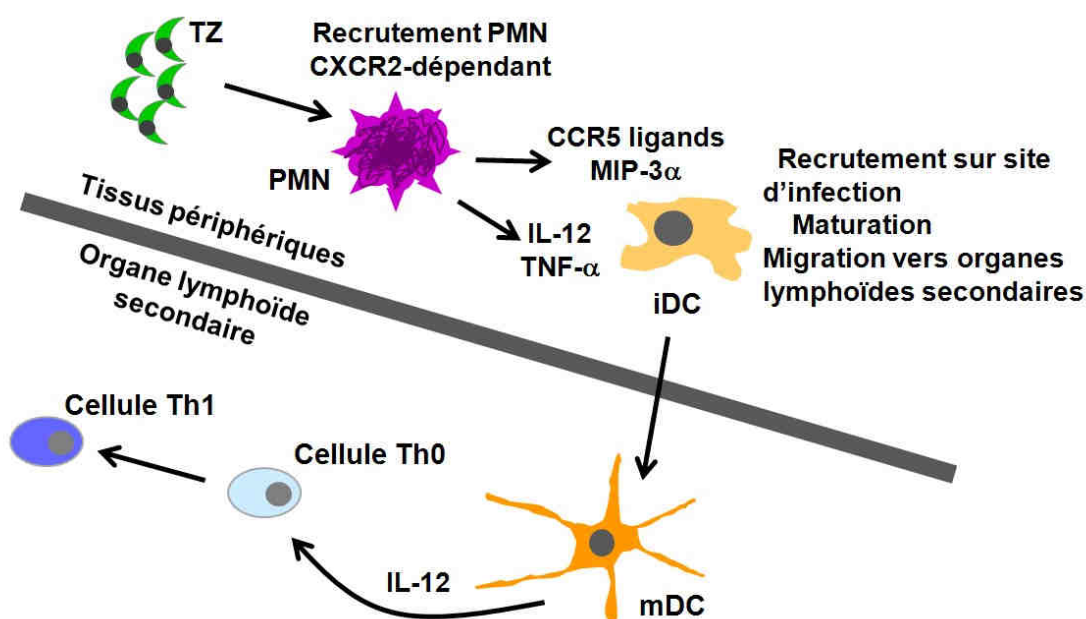


Figure 6 : Modèle du rôle des neutrophiles au niveau des tissus périphériques dans la défense précoce contre *Toxoplasma gondii*. Les parasites (TZ) initient la production d'IL-8 chez l'homme qui recrute les PMN aux foci de l'infection. En réponse, les neutrophiles sécrètent des cytokines telles que l'IL-12 et le TNF- α et des chimokines telles que MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α), MIP-1 β , RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) qui lie CCR5 et MIP-3 α . Cette production permet le recrutement des DC immatures (iDC) aux sites de l'infection et leur exposition aux parasites et antigènes. Les cytokines produites par les PMN induisent la maturation et l'activation des DC en DC matures (mDC) qui migrent vers les ganglions lymphatiques. Les mDC y présentent les antigènes, sécrètent de l'IL-12 et activent les lymphocytes T de la voie Th1. D'après Denkers, 2003.

L'IL-12 sécrétée par les DC active les cellules Natural Killer (NK) productrices d'IFN- γ . L'IFN- γ active les M Φ qui, avec les DC produisent des intermédiaires réactifs de l'oxygène ou de l'azote (RNI et ROI) et du TNF et possèdent ainsi une activité toxoplasmicide. De plus, les M Φ activés phagocytent les micro-organismes et les dégradent rapidement dans le phagolysosome (Aderem and Underhill, 1999). Ils clivent et présentent ensuite les antigènes peptidiques *via* les molécules du CMH de type I et II à la surface cellulaire et activent les cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques. Les M Φ et les DC assurent ainsi le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Denkers and Butcher, 2005).

En parallèle, les DC infectées par *Toxoplasma* migrent vers les ganglions lymphatiques mésentériques où elles alertent le système immunitaire adaptatif de l'hôte *via* la production d'IL-12 (Lambert *et al.*, 2006). Les DC possèdent donc un rôle cellulaire central dans l'initiation de l'activation des cellules T et dans la conduite de la différenciation Th1 (**Figure 6**).

2. Réponse cellulaire

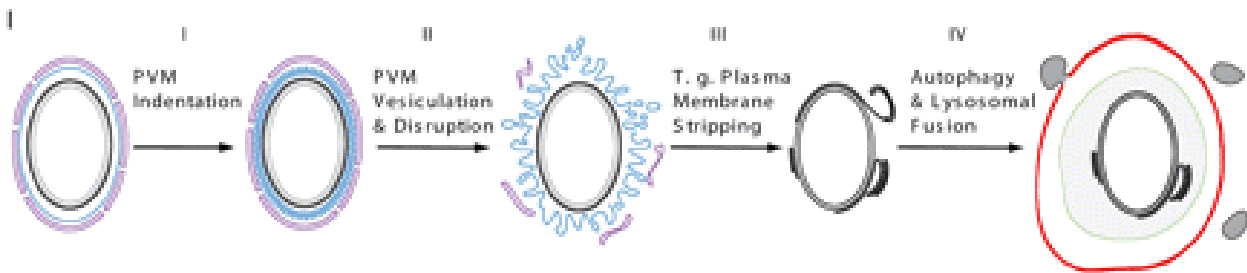


Figure 7 : Élimination autophagique de *Toxoplasma* dans les macrophages activés. Les GTPases de la famille de p47 participent à un processus d'élimination parasitaire. La mise en place de ce processus s'accompagne de la formation d'indentation au niveau de la membrane délimitant la VP (I), de sa vésiculation, puis de sa rupture (II). Le parasite est ensuite dénudé de sa membrane plasmique (III) et fusionne avec la machinerie autophagique lysosomiale (IV). Ling *et al.*, 2006.

L'IL-12 produite par les neutrophiles, les DC, les NK et les M Φ active des voies de signalisation STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) qui initie la différenciation des lymphocytes T vers une voie Th1. En réponse à cette activation, les cellules T Th1 prolifèrent et sécrètent de l'IFN γ . Cette production est accentuée par diverses cytokines telles que le TNF- α . L'IFN γ produit va induire la synthèse d'effecteurs antiparasitaires (Denkers, 2003). Parmi ces effecteurs antiparasitaires, les GTPases p47 s'accumulent au niveau de la VP de *Toxoplasma*. Ces accumulations sur la membrane délimitant la VP (MVP) provoquent l'indentation puis la vésiculation de la MVP. A son point culminant, ce processus entraîne la rupture de la VP, puis dénude le parasite de sa membrane plasmique. Les parasites sont enfin enveloppés dans les vacuoles analogues aux autophagosomes qui finalement fusionnent avec les lysosomes de la cellule hôte (Martens *et al.*, 2005 ; Ling *et al.*, 2006) (**Figure 7**).

Produites en excès, les cytokines pro inflammatoires (IL-12, TNF- α , IFN γ) deviennent toxiques, sont impliquées dans la pathologie de l'hôte et désavantagent donc le parasite en diminuant ses chances de transmission. Ainsi, la létalité des souches parasitaires de type I pourrait provenir en partie d'une sur-induction de cytokines protectrices de type I. Deux mécanismes anti-inflammatoires indépendants pallient à cette surproduction de cytokines : l'IL-10, produit par les DC, les M Φ et les cellules T, inhibe les DC, les lymphocytes T CD4+ et les M Φ ; la lipoxine A₄ (LXA₄), produite par les M Φ , paralyse transitoirement les DC en empêchant leur migration et leur production d'IL-12 (Aliberti, 2005). Ces deux mécanismes contribuent de ce fait à la survie parasitaire et à l'installation de l'infection (**Figure 8**) (Denkers, 2003).

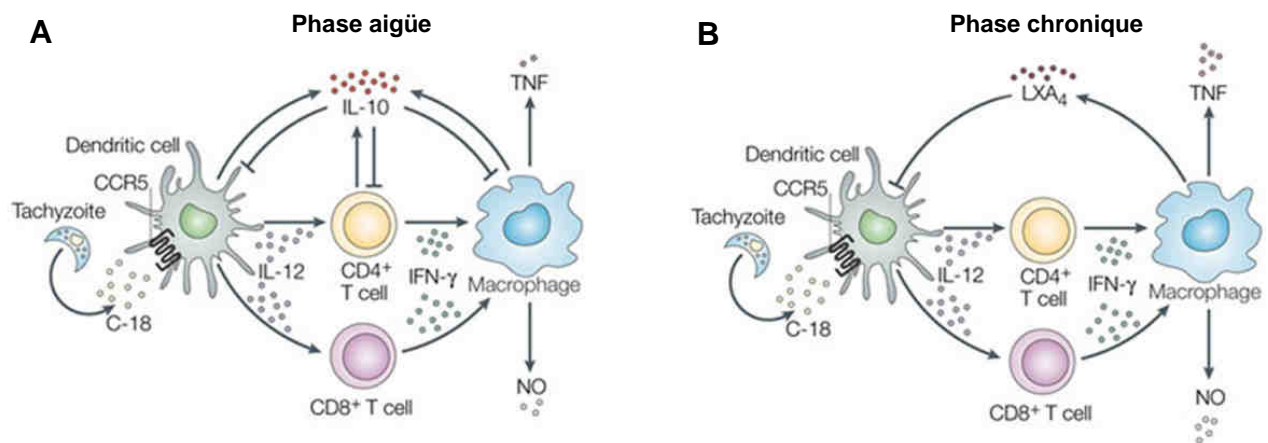


Figure 8 : Contrôle des réponses pro-inflammatoires en réponse à l'infection par *T. gondii*. (A) Les effets cytotoxiques de la phase aiguë sont contrôlés par la production d'IL-10 au niveau des sites de réplication parasitaire comme le foie et la rate. L'IL-10 régule négativement l'expression des chimokines et des cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'activité des DC, des cellules T, des NK et des M Φ . (B) Lors de la phase chronique, la lipoxine A₄ (LXA₄) est produite et contrôle les réponses induites par les cytokines pro-inflammatoires au niveau des sites où la réplication parasitaire pourrait avoir lieu tels que le système nerveux central et ce, sans interférer avec l'activité des M Φ . Aliberti, 2005.

Bien que très efficace, la réponse immunitaire n'est pas suffisante pour éliminer le parasite. Un équilibre est maintenu entre le parasite et l'hôte. Cet équilibre peut rester stable durant toute la vie de l'hôte : c'est la phase chronique de l'infection. L'infection reste latente sous le contrôle de l'IFN- γ et de l'IL-12 sécrétées par les cellules T. Les lymphocytes B activés produisent également des anticorps spécifiques ou immunoglobulines (IgA, IgE, IgM et IgG) qui ont un rôle mineur dans la lutte contre l'infection mais procurent par contre, une immunité protectrice lors d'une éventuelle réinfection (Yap and Sher, 1999).

3. Subversion de la réponse immunitaire par le parasite

Afin de persister dans son hôte, *Toxoplasma* doit limiter son élimination par les effecteurs de l'immunité, notamment en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires, sans toutefois l'empêcher complètement puisque la réponse Th1 est nécessaire au développement d'une infection chronique. Ainsi, *Toxoplasma* inhibe la cascade d'activation du NF κ B en empêchant sa translocation nucléaire (Denkers *et al.*, 2003). De manière analogue, la translocation nucléaire de STAT1 est inhibée chez les M Φ infectés et l'activité des MAPK est modulée (Denkers, 2003). Il inhibe temporairement la production d'IL-12 des M Φ infectés et supprime à long terme celle de TNF- α . Le parasite régule aussi négativement l'expression des molécules du CMH de classe I et II à la surface des M Φ infectés, d'où une présentation réduite des antigènes aux lymphocytes T. Il supprime la production d'oxydes d'azote (NO) induites par l'IFN- γ chez les M Φ (Butcher and Denkers, 2002).

Toxoplasma bloque l'apoptose des fibroblastes *via* le TNF- α et le NF κ B qui régule l'expression de nombreux gènes anti-apoptotiques tels que certains membres de la famille Bcl-2 (B-cell CCL/Lymphoma 2), des inhibiteurs d'apoptose, des molécules d'adhésion et des facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Sinai *et al.*, 2004). La prévention de l'apoptose pourrait constituer une stratégie de survie parasitaire en maintenant la viabilité cellulaire dans un environnement riche en médiateurs pro-apoptotiques.

G. DIAGNOSTICS, TRAITEMENTS ET VACCINS

En routine, le diagnostic de la toxoplasmose n'est pratiqué que chez les femmes enceintes en France, en Belgique, en Suisse, en Autriche et en Suède. Le diagnostic peut être établi à partir de diverses méthodes biologiques (inoculation d'un prélèvement à des souris), sérologiques (tests d'agglutination, d'immunofluorescence, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)), histologiques (microscopie) ou moléculaires (Polymerase Chain Reaction ou PCR). Les techniques sérologiques sont de loin les plus courantes. Elles permettent la détection des anticorps IgM caractéristiques de la phase aiguë et des anticorps IgG. Des tests d'avidité des IgG aident à dater l'infection (Hill and Dubey, 2002). L'avidité des IgG détermine la force avec laquelle les anticorps se lient aux antigènes. Faible au début de l'infection, elle devient très importante environ 5 mois plus tard. La faible avidité des IgG constitue donc un marqueur de la séroconversion toxoplasmique récente (Pfrepper *et al.*, 2005).

La sulfadiazine (antibiotique) et la pyriméthamine (inhibiteur de la dihydrofolate réductase) sont les deux drogues les plus utilisées pour le traitement de la toxoplasmose (Tenant-Flowers *et al.*, 1991). Très efficace pour empêcher la multiplication parasitaire lors de la phase aiguë de l'infection, elles ne permettent toutefois pas son éradication car elles sont inefficaces sur les kystes. De plus, la pyriméthamine agit également sur la synthèse de l'acide folique de l'hôte. Elle n'est donc utilisée qu'en dernier recours chez la

femme enceinte. D'autres drogues telles que l'atovaquone, la spiramycine et la clindamycine peuvent être utilisées pour traiter les cas difficiles. Ces traitements restent malheureusement mal tolérés, particulièrement lorsqu'ils sont utilisés sur une longue période (Hill and Dubey, 2002 ; Lavine and Azzizabalaga, 2007). Les études récentes réalisées sur les voies métaboliques de l'apicoplaste (cf chapitre II B 2) montrent que certains herbicides ou analogues enzymatiques des voies de biosynthèse lipidique pourraient constituer de nouveaux traitements antiparasitaires (Bisanz *et al.*, 2006 ; Botté *et al.*, communication personnelle).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin contre la toxoplasmose chez l'homme. Par contre, un vaccin commercial (Toxovac®, AgVax Developments Ltd.) est employé avec succès contre l'infection congénitale chez la brebis non gestante. Il repose sur l'inoculation, juste avant la gestation, d'une souche atténuée de parasite, incapable de se différencier en bradyzoïtes (Buxton and Innes, 1995). Ce vaccin n'est pas utilisable chez l'homme car la vaccination par des parasites vivants atténués pourrait entraîner des risques potentiels de réactivation. La mise au point d'un vaccin contre la toxoplasmose est actuellement un enjeu fort. Les antigènes de surface et ceux sécrétés par le parasite dont les protéines GRA des granules denses (GD), seraient de bons candidats potentiels. Certains en sont au stade expérimental sur des modèles animaux et montrent une protection significative (Bout *et al.*, 2002 ; Tarleton, 2005).

CHAPITRE II

Biologie du tachyzoïte

Toxoplasma gondii est un parasite à développement intracellulaire strict très répandu dans le règne animal. A l'intérieur de la cellule hôte, il se multiplie au sein d'une VP, compartiment non fusogénique qui joue un rôle de protection et d'échange.

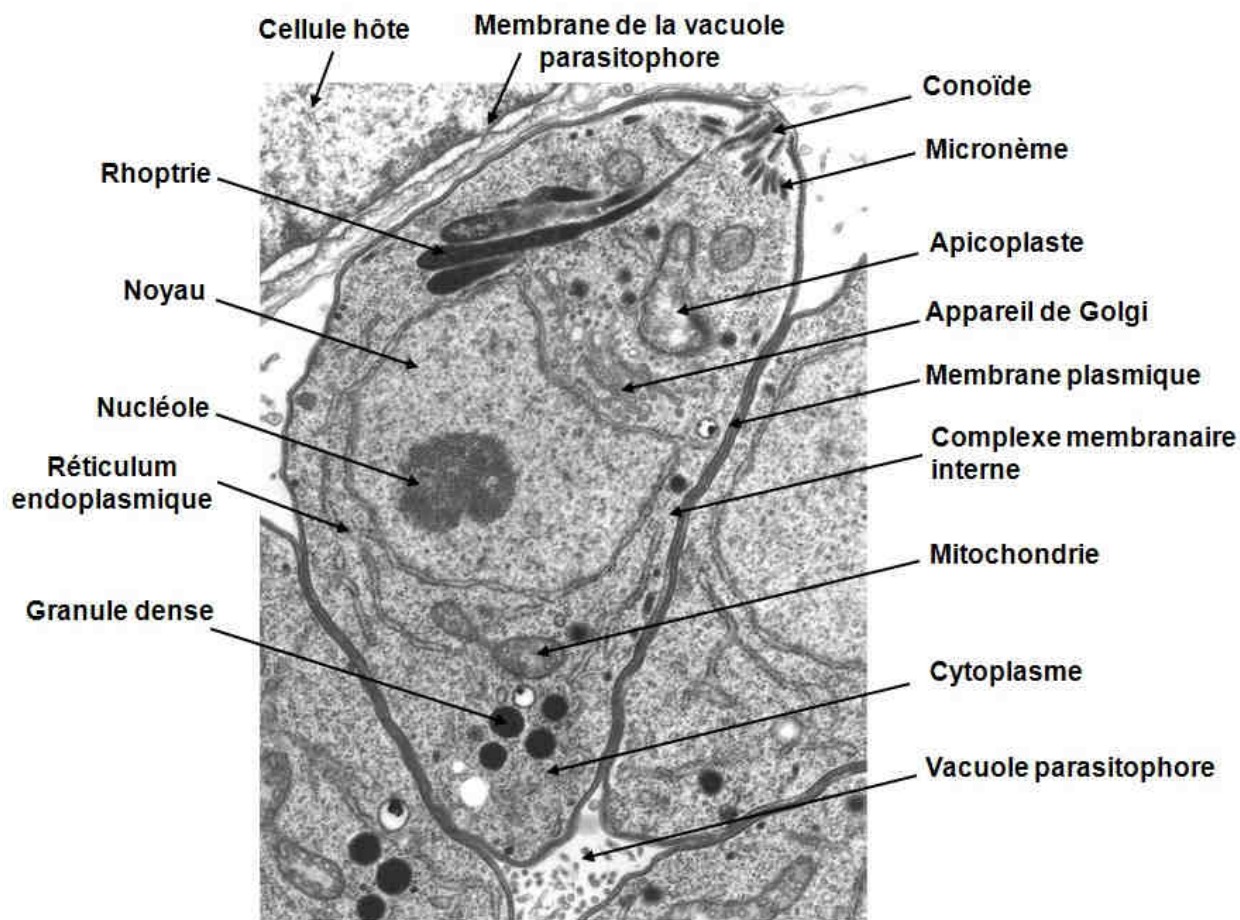


Figure 9 : Photo d'un tachyzoïte intracellulaire réalisée par microscopie électronique à transmission. Dubremetz, 2007.

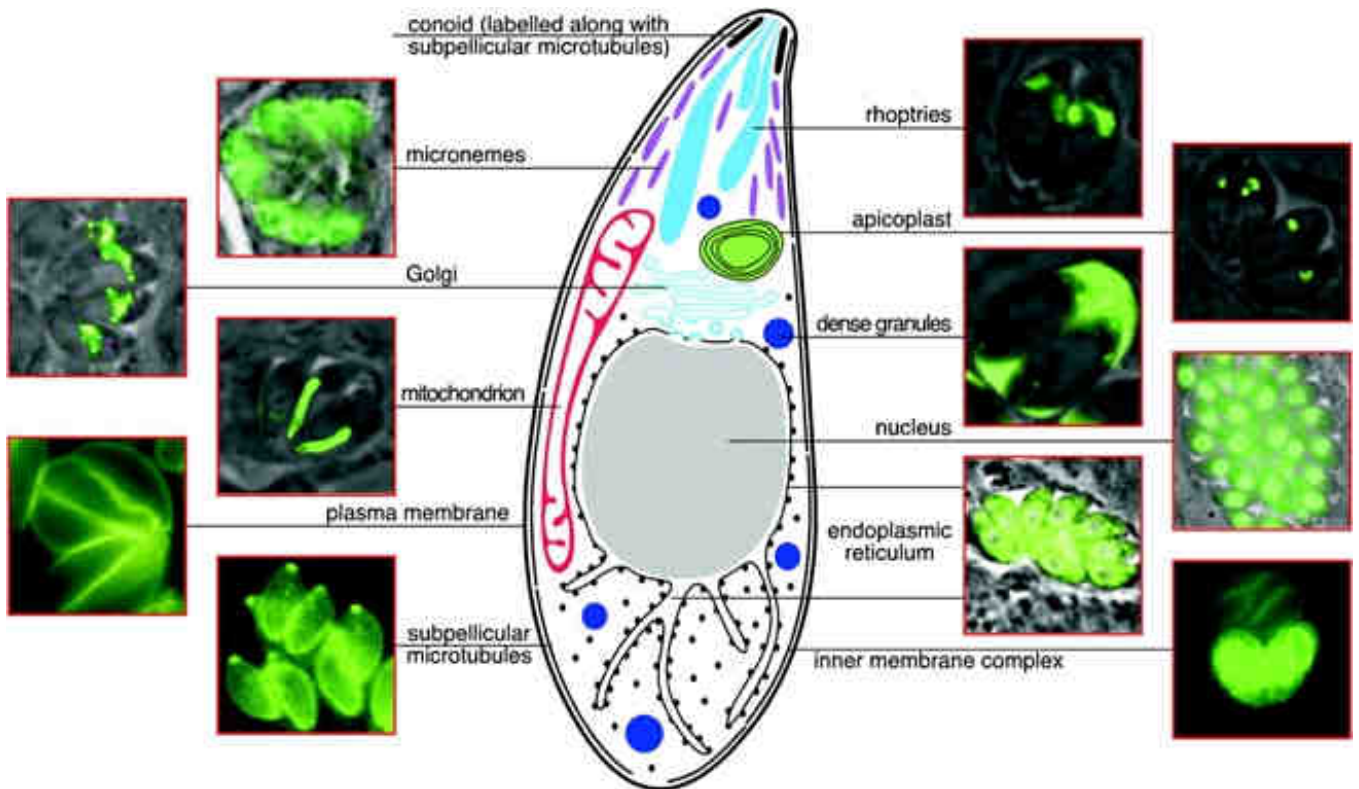


Figure 10 : Marquage protéique fluorescent des organites de *T. gondii*. La fusion entre les protéines parasitaires endogènes et la GFP (Green Fluorescent Protein), la YFP (Yellow Fluorescent Protein) ou d'autres étiquettes a été exprimée chez *T. gondii* et leur localisation a été déterminée par microscopie à fluorescence. Le marquage du conoïde et des microtubules sous-pelliculaires a été réalisé grâce à l'utilisation d'une construction YFP- α -tubuline, les micronèmes grâce à la construction MIC3-GFP, le Golgi grâce à MIC3[68-137]-GFP, la mitochondrie grâce à HSP60-GFP, la membrane plasmique avec GRA1-GFP-GPI, les rhoptries avec ROP1-GFP, les GD avec GRA1-GFP, le noyau avec PCNA-GFP, le réticulum endoplasmique avec GRA1-GFP-HDEL et le complexe membranaire interne avec IMC1-YFP. Joiner and Roos, 2002.

Le tachyzoïte de *T. gondii* a la forme d'un croissant mesurant 6 μm de long et 2 μm de large. Dépourvu d'organes locomoteurs, il est cependant mobile et se déplace à la surface de substrats ou de cellules par « gliding ». Il présente une extrémité antérieure effilée mobile contenant le complexe apical et une extrémité postérieure arrondie (Fortier and Dubremetz, 1993). Le tachyzoïte est une cellule eucaryote unique hautement différenciée. Il est délimité par une membrane plasmique associée à un complexe membranaire interne (IMC) constitué de deux membranes étroitement accolées. On retrouve dans le cytoplasme, une mitochondrie unique et les organites cellulaires classiques nécessaires pour la synthèse et le transport de protéines, distribués dans la moitié postérieure du cytosol parasite : un noyau sphérique de 1 à 2 μm de diamètre contenant un amas de chromatine ainsi qu'un nucléole localisé au centre, un réticulum endoplasmique ainsi que de nombreux ribosomes localisés près de l'enveloppe nucléaire (Hager *et al.*, 1999) et un appareil de Golgi unique situé au-dessus du noyau (Coppens *et al.*,

1999 ; Pelletier *et al.*, 2002). La particularité de ce parasite et plus généralement des *Apicomplexa*, réside dans le fait qu'il contient un plaste non photosynthétique, l'apicoplaste et trois types d'organites de sécrétion spécifiques de ce phylum : les micronèmes, les rhoptries et les GD, tous impliqués dans les étapes d'invasion et de formation de la VP. Le tachyzoïte possède également des substances de réserve telles que des grains d'amylopectine, non délimités par une membrane et des corps lipidiques (Fortier and Dubremetz, 1993). Enfin, il contient des acidocalcisomes, compartiments acides dans lesquels sont stockées d'importantes quantités de calcium, en plus de celui stocké de manière classique dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (Moreno and Zhong, 1996) (**Figures 9 et 10**).

A. LE GENOME NUCLEAIRE

A l'exception de sa division sexuée dans l'intestin du chat et juste avant la division binaire en deux cellules filles, le génome de *T. gondii* est haploïde pendant la plus grande partie de son cycle (McLeod *et al.*, 1991). Il contient 61.6 Mb répartis sur 14 chromosomes dont la taille varie entre 2 et 8 Mb. L'organisation nucléosomale est analogue à celle des eucaryotes (Meissner and Soldati, 2005 ; Khan *et al.*, 2005). Depuis 2003, le génome de *Toxoplasma* est entièrement séquencé et il est actuellement en cours d'annotation (<http://www.toxodb.org>). L'ADN génomique de *T. gondii* n'est pas méthylé et il contient de nombreuses répétitions en bases G-C (Johnson *et al.*, 1986).

Le génome parasite est composé d'environ 7000 à 8000 gènes dont la majorité ne contient pas d'introns. La plupart d'entre eux sont présents en simple copie et ont été étudiés comme cibles thérapeutiques potentielles. D'autres, par contre, sont répétés plusieurs fois. Ils codent notamment pour certaines protéines de rhoptries, pour les NTPases (protéase de Nucleoside Tri-phosphate), etc. Le gène B1 répété 35 fois est utilisé comme cible PCR lors du diagnostic de la toxoplasmose (cf chapitre I G). Les gènes ribosomiaux sont également répétés 110 fois et leur organisation et motifs de régulation analogues à ceux trouvés chez la plupart des organismes eucaryotes suggèrent un mécanisme de transcription des ARN (Acide Ribonucléique) ribosomiaux similaire et conservé (Meissner and Soldati, 2005).

Malgré la présence des trois ARN polymérases, les éléments eucaryotes classiques de la structure promotrice tels que la boîte TATA, CAAT ou les motifs SP1 ne sont pas conservés. De plus, les analyses bioinformatiques montrent que la machinerie de transcription des *Apicomplexa* apparaît basique et rudimentaire par rapport aux eucaryotes supérieurs (Meissner and Soldati, 2005).

T. gondii contient également deux génomes extra-chromosomiques, un génome mitochondrial (Borst *et al.*, 1984) ainsi qu'un génome circulaire plastidial (Fichera and Roos, 1997).

B. LES ORGANITES POSSEDANT UN GENOME EXTRA-NUCLEAIRE

1. La mitochondrie

Le tachyzoïte possède une mitochondrie unique, de forme tubulaire, plus ou moins ramifiée et entourée par une double membrane. La taille de son génome est de 6 kb. Elle est composée d'un complexe OMC (ovoid mitochondrial cytoplasmic) caractérisé par une lumière matricielle réduite et par une ou deux évaginations avec une paroi en forme de poche constituée de quatre membranes. Le complexe OMC est adjacent au Golgi et proche de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (Köhler, 2006).

La fonction majeure de la mitochondrie est métabolique : elle assure la synthèse de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). L'activité du cytochrome c est localisée au niveau de la membrane interne (Melo *et al.*, 2000). La matrice mitochondriale assure aussi l'expression des gènes de l'organite et elle est le lieu de résidence des enzymes de la voie de synthèse des acides gras FAS I (fatty acid synthetic type I) (Coppens, 2006). Plusieurs glycéro- et shingolipides y sont synthétisés : acide phosphatidique (PA), phosphatidylglycérol (PG) et cardiolipide (Bisanz *et al.*, 2007).

2. L'apicoplaste

T. gondii est caractérisé par la présence d'un plaste non photosynthétique, l'apicoplaste, acquis au cours de l'évolution après endosymbiose secondaire d'une algue rouge. Ce plaste est entouré de quatre membranes qui semblent provenir d'une enveloppe plastidiale ancestrale (les deux membranes les plus internes), de la membrane de l'algue rouge et du phagosome (les deux membranes les plus externes) (Bisanz *et al.*, 2007) (**Figure 11**).

Les parasites déléétés de leur apicoplaste et ceux dont la réplication de leur ADN plastidial a été bloquée par des quinolones ou des fluoroquinolones ne sont pas viables. L'apicoplaste a donc un rôle essentiel dans le développement parasitaire. Il possède un génome circulaire de 35 kb, riche en bases A-T, codant pour environ 60 gènes tels qu'une ARN polymérase et des gènes ribosomiaux. Cette activité de transcription/traduction peut être inhibée par de nombreux antibiotiques. Toutefois, la plupart des protéines de l'apicoplaste sont codées dans le noyau, synthétisées dans le cytoplasme au niveau des ribosomes et importées dans l'apicoplaste *via* le réticulum endoplasmique puis le Golgi. Ce ciblage se fait grâce à une séquence signal N-terminale bipartite comprenant une séquence signal de sécrétion suivie d'un signal de ciblage vers l'apicoplaste, signal exposé après le clivage du signal de sécrétion (Joiner and Roos, 2002 ; Bisanz *et al.*, 2007).

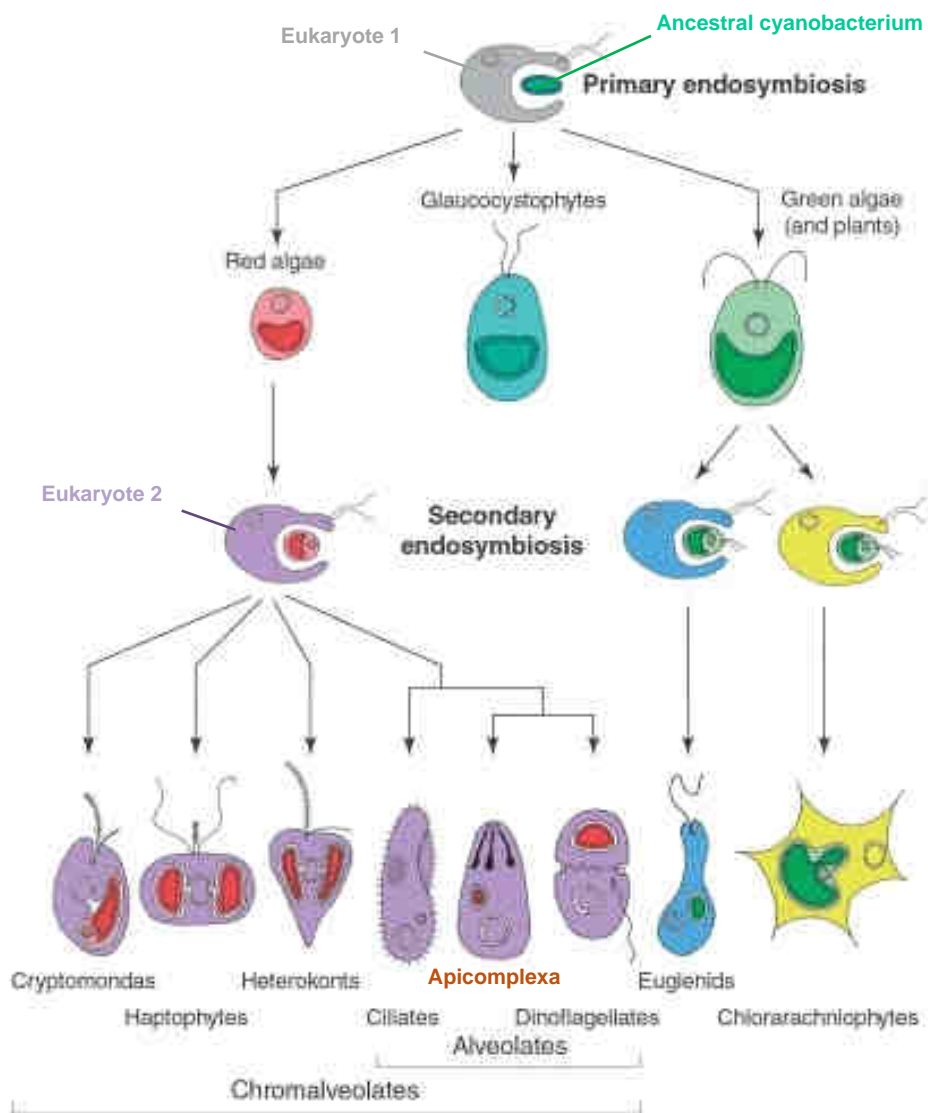


Figure 11 : Schéma de l'origine et de l'évolution des plastes au cours des endosymbioses primaires et secondaires. Une première endosymbiose entre un eucaryote ancestral et une cyanobactérie a conduit aux 3 premières lignées portant des plastes composés de 2 membranes (algues rouges, glaucocystophytes et algues vertes). Deux événements d'endosymbioses secondaires différents impliquant des eucaryotes et des algues vertes ont conduit aux Eugénides avec un plaste entouré de 2 ou 3 membranes (en bleu) et aux Chlorarachniophytes avec un plaste à 4 membranes (jaune). L'endosymbiose secondaire d'une algue rouge par un eucaryote a abouti aux Chromalveolates (en violet), et plus particulièrement aux Alveolates : les Ciliates sans plaste (*Paramecium*), les Apicomplexa (*Toxoplasma*, *Plasmodium*) avec un plaste entouré par 4 membranes ou sans plaste et les Dinoflagellates avec un plaste à 3 membranes (*Amphidinium*). D'après Archibald and Keeling, 2002.

L'apicoplaste contient les enzymes de la voie de synthèse des acides gras Fas II et DOXP (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate). Il semble donc impliqué dans la synthèse d'acides gras, plus particulièrement de lipides neutres et d'isoprénoïdes, respectivement (Waller and McFadden, 2005 ; Coppens and Vielemeyer,

2005). Dans leurs travaux, Bisanz *et al.* suggèrent que chez les parasites extracellulaires, le résidu acyl des glycérolipides de *Toxoplasma* tels que le PA, le digalactosyldiacylglycerol (DGDG) ou le PG, est synthétisé *de novo via* la voie FasII (Bisanz *et al.*, 2006). Les travaux de Mazumdar *et al.* démontrent que la voie Fas II est responsable de la biogénèse de l'apicoplaste et de la synthèse d'acide lipoïque et qu'elle est indispensable à la survie parasitaire mais que par contre, elle n'est pas impliquée dans la synthèse des résidus acyl. De plus, cette étude suggère que les glycérolipides parasitaires seraient synthétisés *via* la voie Fas I mitochondriale et/ou la voie des FAEs cytoplasmiques (fatty acyl elongases) (Mazumdar *et al.*, 2006). La présence d'un apicoplaste chez *Toxoplasma* ainsi que des lipides propres aux plantes et aux algues tels que le DGDG, montrent clairement que le parasite est capable de synthétiser certains lipides. Par contre, les données sur la synthèse des lipides de membrane chez *Toxoplasma* restent fragmentaires et parfois controversées. Elles indiquent cependant que le parasite est auxotrophe pour les stérols et que la synthèse *de novo* de lipides acylés n'est permise qu'après la récupération de nombreux précurseurs depuis la cellule hôte tels que le cholestérol, le ganglioside GM1, la sérine, l'éthanolamine et la choline. De plus, une voie xylulose dans l'apicoplaste pourrait contribuer à la production de molécules farnesyl et geranylgeranyl (Coppens, 2006). Les voies métaboliques de l'apicoplaste sont étudiées comme cibles thérapeutiques potentielles. Elles peuvent par exemple être inhibées par des herbicides (triclosan et aryloxyphenoxypropionate inhibant la synthèse des acides gras, fosmidomycin affectant la synthèse des isoprénoïdes) (Bisanz *et al.*, 2007).

C. LES ORGANITES IMPLIQUES DANS LE TRANSPORT PROTEIQUE

1. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique constitue l'intermédiaire obligatoire des voies de transport et de sécrétion protéiques vers la membrane plasmique et l'IMC, mais aussi vers l'apicoplaste, les micronèmes, les rhoptries et les GD (**Figure 12**). *Toxoplasma* possède de nombreuses protéines orthologues à des protéines impliquées dans la machinerie de translocation du réticulum endoplasmique des mammifères : COP I et II (Coat Proteins I et II), les SNARE (Soluble NSF Attachment protein Receptor), AP-1 (Adaptor Protein-1) et les protéines Rab (Chaturvedi *et al.*, 1999).

Le réticulum endoplasmique est également le lieu de synthèse de nombreux glycérolipides parasitaires : PA, phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI) et PG. Cette synthèse se fait grâce aux acétyltransférases acyl-CoA (acyl-coenzyme A) issues de la conversion dans le cytoplasme parasitaire, de l'acyl-ACP de l'apicoplaste

(Bisanz *et al.*, 2007). Les glycérolipides synthétisés sont ensuite stockés dans des corps lipidiques cytosoliques. Les acétyltransférases du réticulum endoplasmique permettent également la synthèse d'esters cholestéryls, lipides neutres les plus abondants des corps lipidiques (Nishikawa *et al.*, 2005). Enfin, la biosynthèse des GPI qui permettant l'ancrage des protéines de la membrane plasmique, est initiée dans le réticulum endoplasmique avec le transfert du N-acétylglucosamine sur le PI (Wichroski and Ward, 2003 ; Azzouz *et al.*, 2006).

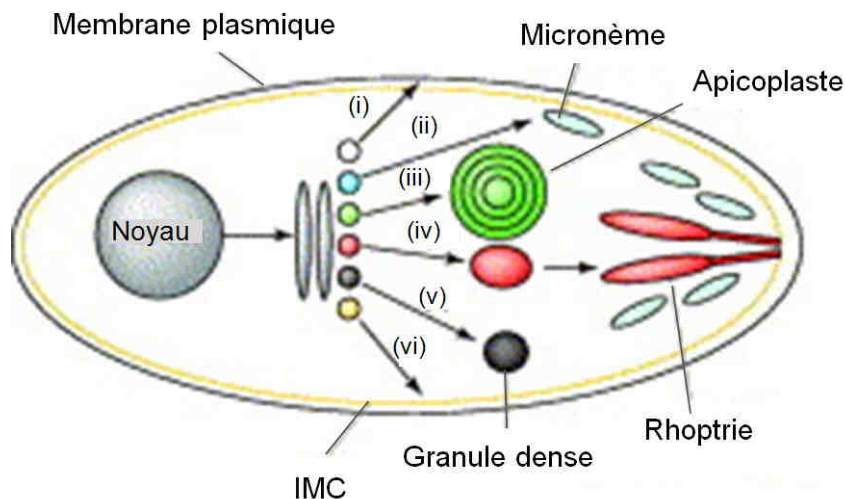


Figure 12 : Les différentes voies de sécrétion de *Toxoplasma*. Les protéines qui portent un peptide signal peuvent être triées au niveau du réticulum endoplasmique puis du Golgi avant d'être ciblées vers (i) la membrane plasmique, (ii) les micronèmes, (iii) l'apicoplaste, (iv) les rhoptries, (v) les GD ou (vi) l'IMC. D'après Keeley and Soldati, 2004.

2. L'appareil de Golgi

Le tachyzoïte possède un appareil de Golgi unique, comprenant 3 à 5 citernes, et situé au-dessus du noyau (Coppens *et al.*, 1999 ; Pelletier *et al.*, 2002). Comme chez les autres eucaryotes, il assure le tri des protéines provenant du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique, l'apicoplaste ou les organites de sécrétion : micronèmes, rhoptries et GD.

D. LE COMPLEXE APICAL

Dans son extrémité apicale, le tachyzoïte présente une structure caractéristique de tous les zoïtes des *Apicomplexa*, le complexe apical (Nichols and Chiappino, 1987). Le complexe apical comprend les rhoptries, les micronèmes, les anneaux polaires et préconoïdaux et le conoïde (**Figure 13**). Les rhoptries et

les micronèmes sont des organites de sécrétion propres au phylum des *Apicomplexa*. Ils contiennent des éléments impliqués dans la motilité, l'adhésion à la cellule hôte et l'établissement de la VP.

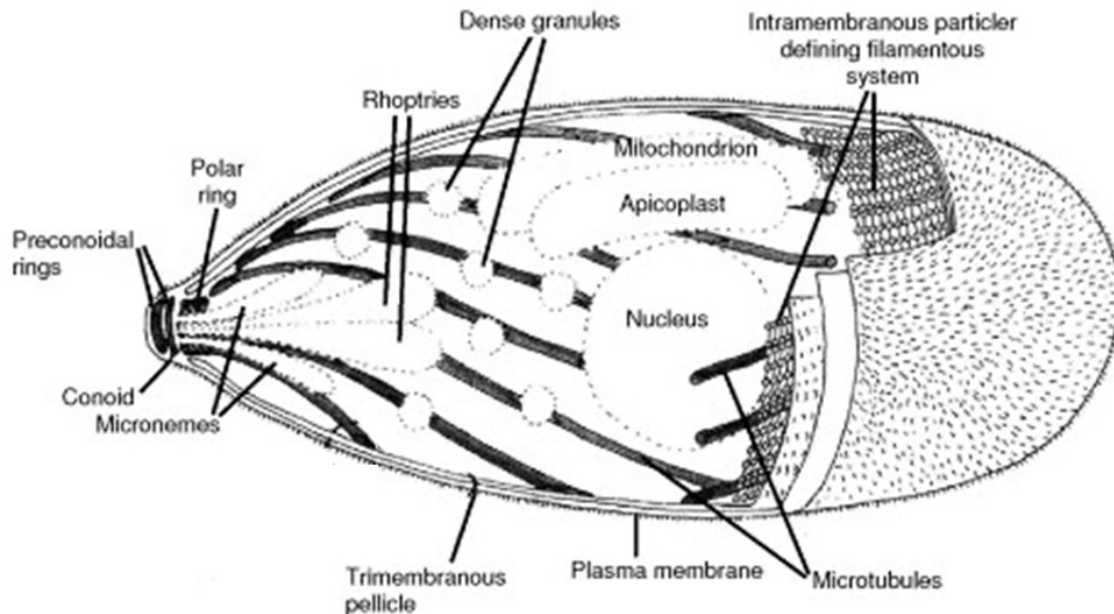


Figure 13 : Schéma de la machinerie cellulaire impliquée dans l'invasion et la motilité d'un parasite *Apicomplexa*. D'après Fowler *et al.*, 2003.

1. Le conoïde et le cytosquelette de microtubules

a) Le conoïde

Le conoïde joue un rôle mécanique dans l'invasion et permet la pénétration de la cellule hôte par le parasite. Le conoïde de *Toxoplasma* semble particulièrement adapté pour la pénétration de la barrière robuste que constitue l'épithélium intestinal des vertébrés (Mondragon and Frixione, 1996).

Le conoïde a la forme d'un cylindre légèrement conique constitué de filaments de tubuline polymérisée de 26 à 30 nm de long enroulés en spirale (Hu *et al.*, 2002). Il est limité à l'avant par deux anneaux pré-conoïdaux et à l'arrière, par deux anneaux polaires, denses aux électrons, qui l'entourent. Les anneaux polaires sont constitués de 6 à 8 microtubules (Dubey *et al.*, 1998). Le conoïde comporte également deux microtubules centraux de 400 nm de long environ, étroitement liés l'un à l'autre (**Figure 14A**). Cette structure rétractile de 250 nm de diamètre effectue des mouvements de protrusion et de rétraction dans l'anneau polaire. L'extrusion du conoïde peut être stimulée par un flux de calcium induit par l'ionomycine et inhibée par un prétraitement par la cytochalasine D qui dépolymérise le cytosquelette d'actine. Lors de

l'invasion, un flux de calcium déclenche la protrusion du conoïde et permet ainsi la formation à travers la membrane plasmique d'un canal de sécrétion des protéines de micronèmes et de rhoptries. La rétraction du conoïde a lieu à la fin de l'invasion et implique les filaments d'actine (Mondragon and Frixione, 1996) (**Figure 14**).

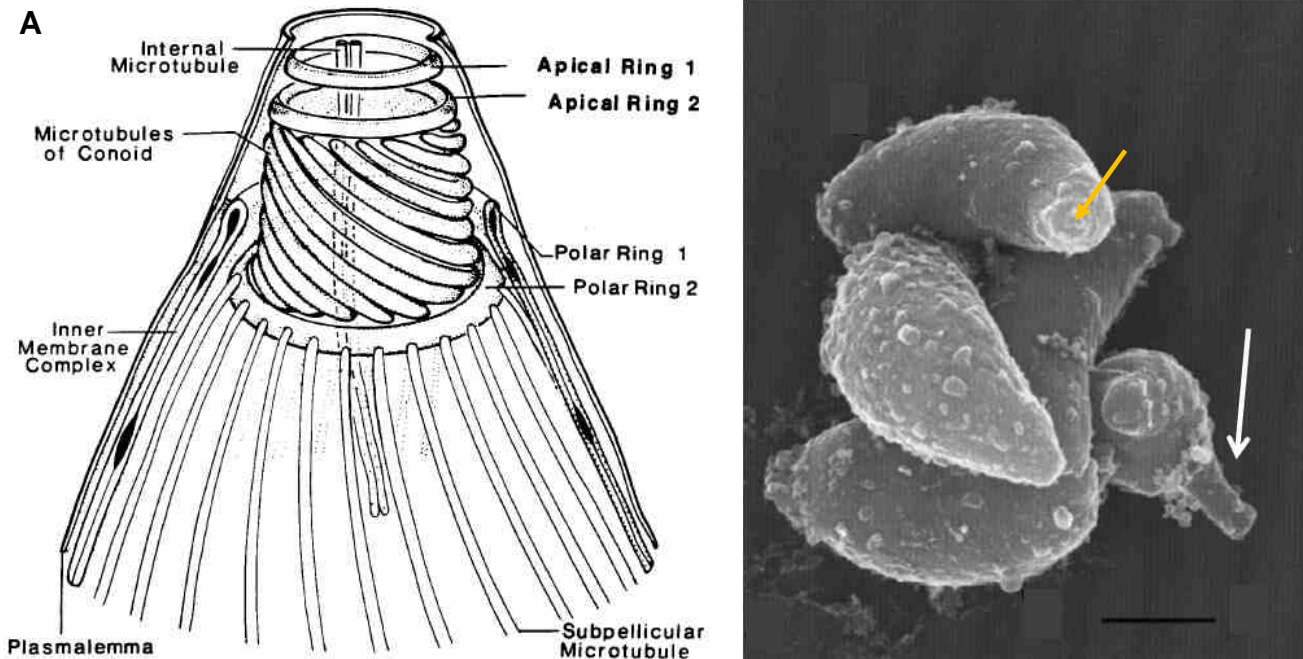


Figure 14 : Le conoïde de *T. gondii*. (A) Schéma du complexe apical : il comporte deux anneaux pré-conoïdaux à l'avant et deux anneaux polaires à l'arrière qui délimitent le conoïde en forme de cylindre. Le conoïde est constitué de microtubules enroulés en spirale. L'anneau polaire postérieur est le centre organisateur de 22 microtubules qui s'étendent le long de la face cytoplasmique de l'IMC. Dubey *et al.*, 1998. (B) Protrusion du conoïde (pointe de flèche) d'un tachyzoïte traité par le calcium ionophore (flèche blanche). La flèche orange indique le conoïde rétracté d'un tachyzoïte. Echelle : 1 µm. Monteiro *et al.*, 2001.

b) Le cytosquelette de microtubules

L'anneau polaire postérieur est le centre organisateur (MTOC, Microtubule Organizing Center) circulaire des 22 microtubules sous-pelliculaires disposés à intervalles réguliers. Ces microtubules forment une sorte de gaine légèrement spiralée responsable de l'architecture cellulaire particulière des *Apicomplexa*. Ils s'étendent le long de la face cytoplasmique de l'IMC depuis l'anneau polaire apical jusque sous le noyau, aux deux tiers environ de la longueur du parasite (**Figure 15A**). Les parasites traités par des drogues spécifiques des microtubules de type végétal ou les formes répliquatives qui ne possèdent pas de microtubules sous-pelliculaires ne sont plus polaires, mobiles ou capables d'envahir (Dubey *et al.*, 1998).

Contrairement à ceux des autres organismes, les microtubules parasitaires sont très stables et résistent à de nombreux traitements. Les protéines associées aux microtubules décorent tous les 32 nm les microtubules sous-pelliculaires qui sont connectés à l'IMC. Ces protéines seraient responsables de la grande stabilité des microtubules après leur isolement. Elles assureraient également la fine interaction entre les microtubules sous-pelliculaires et l'IMC (Morrissette and Sibley, 2002a).

Le parasite possède une autre population de microtubules : le fuseau de microtubules qui intervient lors de la mitose des parasites. Il est nucléé à partir de plaques polaires denses aux électrons, associées aux invaginations de la membrane nucléaire. Les centrioles, qui sont adjacents aux plaques polaires du fuseau de microtubules, sont formés des neuf microtubules classiques qui entourent un microtubule central. *Toxoplasma* possèdent ainsi trois MTOC différents : les plaques polaires du fuseau, les centrioles et l'anneau polaire apical. Les centrioles pourraient constituer des MTOC principaux et coordonner les plaques polaires du fuseau et l'anneau polaire apical (Morrissette and Sibley, 2002a) (**Figure 15**).

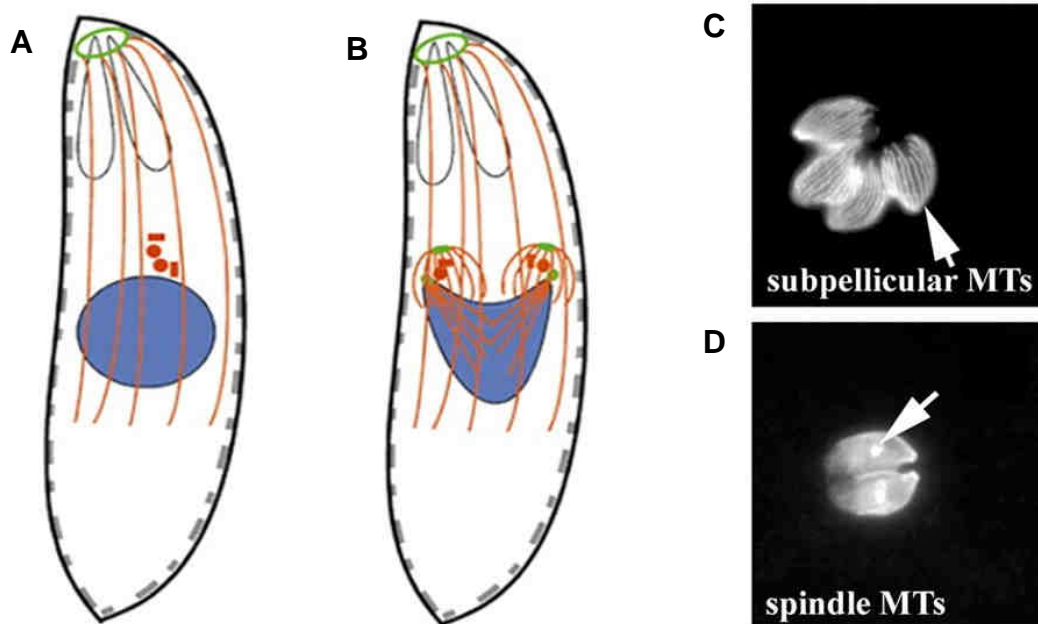


Figure 15 : *Toxoplasma* possède deux populations de microtubules. (A) Les microtubules sous-pelliculaires (rouge) sont nucléés au niveau de l'anneau polaire apical (vert) et sont situés contre l'IMC (pointillé gris). **(B)** Les microtubules du fuseau de division (rouge) sont nucléés au niveau des plaques polaires (vert). Les centrioles extranucléaires (rouge) sont proches des plaques polaires. **(C, D)** Marquage par immunofluorescence à l'aide d'un anti-tubuline des microtubules (MTs) sous-pelliculaires **(C)** (flèche) et des microtubules du fuseau **(D)** (flèche). Morrissette and Sibley, 2002b.

2. La pellicule et le cytosquelette d'actine

T. gondii est entouré d'une pellicule, complexe tri-membranaire de 60 nm d'épaisseur formé d'une membrane plasmique externe et de l'IMC constitué de deux membranes étroitement accolées (Vivier and Petitprez, 1969). La pellicule est intimement associée 1) aux microtubules sous pelliculaires et 2) à un réseau sous-pelliculaire constitué de filaments de 8 à 10 nm de diamètre, analogues à des filaments intermédiaires, qui s'étendent de la partie apicale à la partie postérieure des parasites (**Figure 16A**). Le réseau sous-pelliculaire joue un rôle dans le maintien de la forme et de la polarité parasitaire et contribue à la mobilité du parasite ou "gliding" (Morissette and Sibley, 2002a).

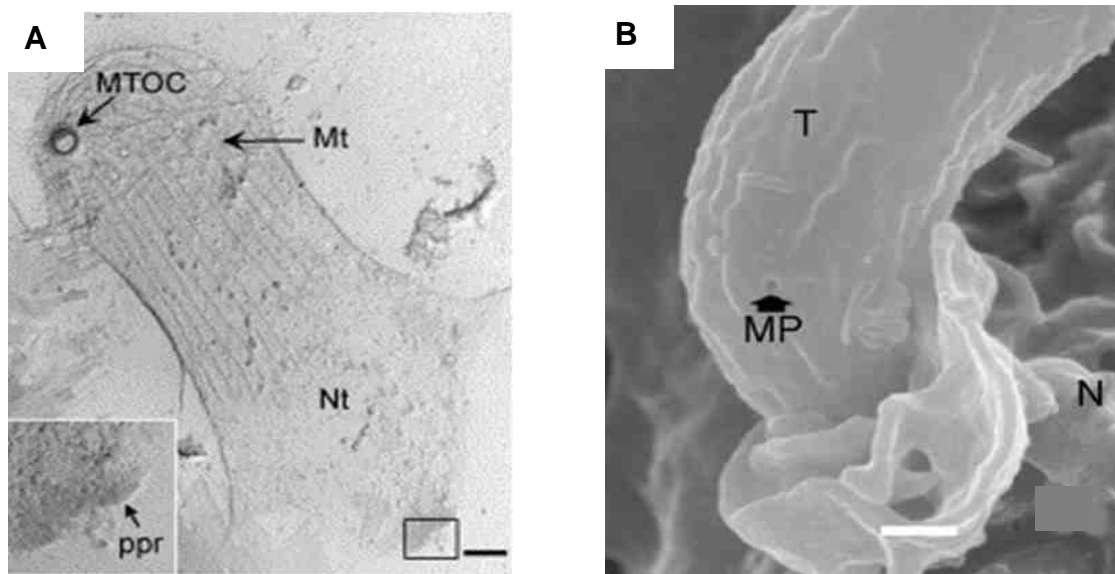


Figure 16 : Le réseau sous pelliculaire et le micropore de *Toxoplasma*. (A) Extraction du réseau sous pelliculaire : 22 microtubules sous pelliculaires (Mt) et réseau sous pelliculaire (Nt). ppr, anneau polaire postérieur. Echelle : 500 nm. Patron *et al.*, 2005. (B) Tachyzoïte (T) en train d'envahir un neutrophile (N) sur lequel on peut visualiser le micropore (MP). Echelle : 1 μ m. MacLaren *et al.*, 2004.

a) La membrane plasmique

La membrane plasmique est recouverte d'une couche de glycoprotéines qui délimite la totalité du parasite. Ces glycoprotéines sont ancrées par des GPI contenant un groupement inositol, d'une glucosamine et d'une éthanolamine (Santos de Macedo *et al.*, 2003). Plusieurs protéines de surface ont été décrites chez le tachyzoïte. Elles contiennent deux régions hydrophobes : une séquence signal N-terminale nécessaire à leur entrée dans le réticulum endoplasmique et l'ancre GPI en C-terminal (Lekutis *et al.*, 2001). Ces protéines de surface, dont SAG1 qui constitue l'antigène de surface parasitaire majeur, contribuent à l'adhésion du parasite à la cellule hôte lors du processus d'invasion (Mineo and Kasper, 1994) (cf chapitre II E 2).

b) Le complexe membranaire interne

Les deux membranes constituant l'IMC situées juste sous la membrane plasmique (**Figure 9**), sont formées par la juxtaposition de vésicules aplaties d'origine inconnue. L'IMC s'interrompt dans la partie apicale antérieure du parasite, sous les anneaux polaires, au niveau d'un micropore latéral correspondant à une invagination de la membrane externe (Nichols *et al.*, 1994) (**Figure 16B**). L'IMC s'interrompt également au niveau de la partie postérieure du parasite, ce qui permet l'invagination de la partie postérieure parasitaire dans la première heure qui suit l'invasion et au niveau de laquelle se forme le réseau de nanotubes membranaires de la VP (Sibley *et al.*, 1995) (cf chapitre III A 2 b). L'IMC s'appuie sur le cytosquelette de microtubules par l'intermédiaire de plusieurs protéines : IMC1, IMC2, IMC3, GAP45 et GAP50 (Gliding Associated Proteins), ces deux dernières glycoprotéines membranaires étant toutes deux très conservées dans l'ensemble du phylum des *Apicomplexa* (Morrissette and Sibley, 2002a ; Gubbels *et al.*, 2004).

Les membranes résistantes au détergent isolées à partir de la pellicule des parasites extracellulaires sont enrichies en cholestérol, en ganglioside GM1, en shingomyéline, phospholipides et autres lipides non identifiés parmi lesquels un lipide analogue aux digalactolipides qui se redistribue au niveau du pôle apical des parasites intracellulaires (Azzouz *et al.*, 2006 ; Botté *et al.*, soumis). Le cholestérol des membranes de la pellicule permet l'immobilisation du complexe moteur assurant le gliding et l'invasion active de la cellule hôte (Johnson *et al.*, 2007) (cf chapitre II E 3). La purification des différents types de membranes de la pellicule devrait permettre bientôt de définir le lipidome de ce compartiment spécifique aux *Apicomplexa*.

c) Les microfilaments d'actine

Chez les *Apicomplexa*, l'actine apparaît largement monomérique. L'actine monomérique est localisée au niveau de la région apicale ainsi que dans cytoplasme (Endo *et al.*, 1988 ; Heintzelman, 2006). Sa distribution n'est pas modifiée par l'action de traitements favorisant sa polymérisation tels que la phalloïdine, le MgCl₂, l'actine exogène, la spermine ou le phosphoinositide di-phosphaté PIP₂. Les microfilaments d'actine sont particulièrement courts et labiles et n'ont pu être observés en microscopie électronique qu'après traitement stabilisateur avec la jasplakinolide : les filaments d'actine sont localisés de manière singulière, entre l'IMC et la membrane plasmique (Schatten *et al.*, 2003) (**Figures 17 A et B**). La polymérisation de l'actine semble être induite par un signal généré lors de l'invasion, par l'interaction du parasite avec sa cellule hôte. Elle est initiée au niveau de la partie apicale du parasite (Shaw and Tilney, 1999), ce qui permet l'observation d'un bourgeon d'actine apical, mesurant jusqu'à 2 µm de long, et figé dans une forme artificiellement fibrillaire, lors d'un traitement par la jasplakinolide. Les filaments d'actine sont alors décorés de myosine (**Figure 17C**) (Morrissette and Sibley, 2002a). L'importante labilité des microfilaments d'actine des *Apicomplexa* suggère un recyclage important de la protéine, recyclage probablement dû à l'abondance de facteurs de dépolymérisation de l'actine (Allen *et al.*, 1997). L'instabilité de ces filaments pourrait également provenir de sa structure globale. En effet, bien qu'analogue à celle des autres actines eucaryotes, l'actine possède moins de 80 % de similarité avec les autres actines eucaryotes (les actines eucaryotes possèdent habituellement plus de 90 % de similarités). Les différences au niveau

de sa structure de surface affectent dramatiquement les interactions actine-actine ou actine-protéine liant l'actine (Dominguez, 2004).

Le recyclage des filaments d'actine au niveau de la pellicule est assuré par trois protéines liant les monomères d'actine : la profiline qui recharge les monomères d'actine/ADP (Adenosine Di-phosphate) en ATP, les facteurs dépolymérisants ADF/cofiline (Actin Depolymerizing Factor) qui séquestrent les monomères et divisent les filaments d'actine et les protéines CAP (Cyclase Associated Protein), plus petites que celles classiquement observées chez les autres organismes et dont l'unique fonction est de séquestrer les monomères d'actine (Baum *et al.*, 2006). Malgré la présence de plusieurs ARPs (Actin-Related Protein) conservées comme Arp1, les gènes des protéines du complexe Arp2/3 n'ont pas été trouvés chez les *Apicomplexa* (Gordon and Sibley, 2005). Toutefois, l'activité de nucléation des filaments d'actine pourrait être effectuée par des protéines ALP (Actin Like Protein), alternatives du complexe Arp2/3, telles qu'ALP1, ou des formines qui coiffent l'extrémité positive des filaments d'actine et contrôlent leur croissance. Uniquement identifiée chez *Toxoplasma*, la toxofiline inhibe la polymérisation de l'actine en la séquestrant et freine le désassemblage des microfilaments en les coiffant (Poupel *et al.*, 2000 ; Heintzelman, 2006).

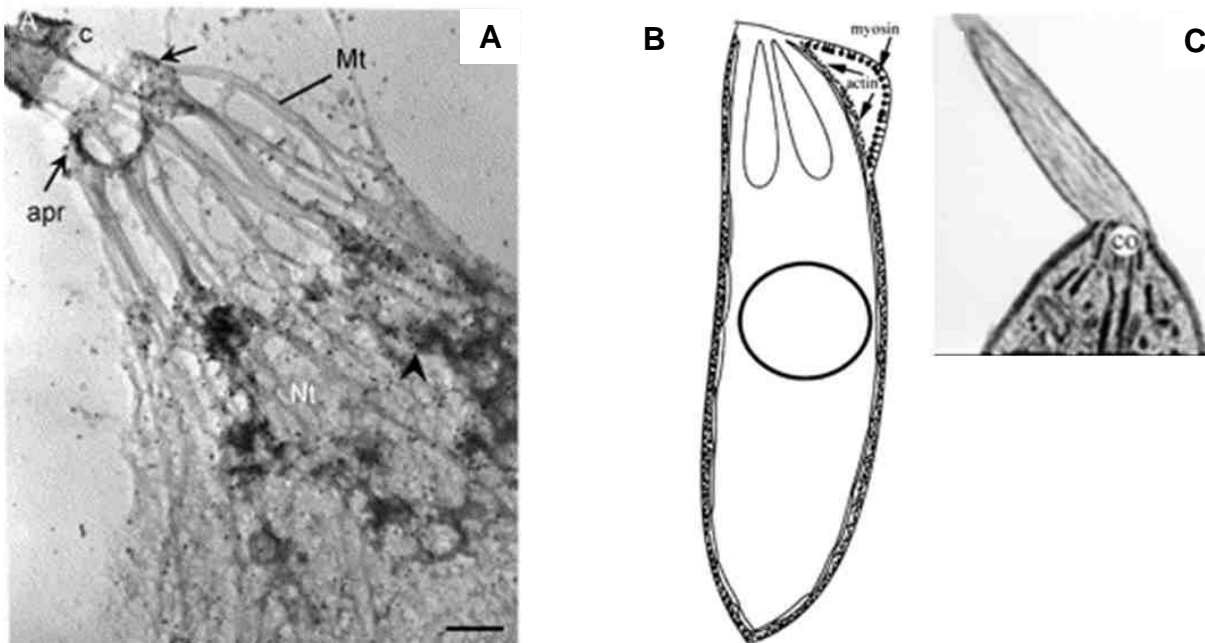


Figure 17 : Distribution de l'actine chez *Toxoplasma*. (A) Marquage de l'actine à l'aide de particules d'or (pointe de flèche) au niveau du réseau sous pelliculaire. Les microtubules sous pelliculaires ne sont pas décorés. Patron *et al.*, 2005. (B) L'actine est localisée entre la membrane plasmique et l'IMC. (C) Les filaments d'actine s'étendent au delà du conoïde (co) lorsque les tachyzoïtes sont traités avec la jasplakinolode qui induit la polymérisation de l'actine. Morrissette and Sibley, 2002a.

3. Les micronèmes

Les micronèmes sont les plus petites structures localisées dans la partie apicale des *Apicomplexa*. Présents en nombre variable (50 à 100 par parasite), ces organites ont l'aspect de courts bâtonnets de 300 à 600 nm de long et de 50 à 90 nm de large. Ils apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique à transmission (Dubremetz *et al.*, 1989) (**Figure 9**).

a) Sécrétion des micronèmes

La sécrétion des protéines de micronèmes est due à une élévation du taux de calcium intracellulaire (Carruthers and Sibley, 1999). Le taux de calcium intracellulaire est régulé d'une part, au niveau du réticulum endoplasmique par les canaux calciques en réponse à l' IP_3 ($Ins(1,4,5)P_3$) et par les canaux ryanodine en réponse à l'ADP ribose cyclique (Chini *et al.*, 2005) et d'autre part, au niveau des acidocalcisomes par les pompes ATPases (Luo *et al.*, 2005) La sécrétion des micronèmes peut être bloquée par des inhibiteurs de l' IP_3 , des antagonistes de l'ADP ribose cyclique ou par des inhibiteurs de cystéine protéase (Teo *et al.*, 2007).

b) Ciblage protéique vers les micronèmes

Actuellement, une quinzaine de protéines de micronèmes ont été caractérisées : MIC1-12, M2AP (MIC2-Associated Protein), AMA1 (Apical Membrane Antigen), SUB1 (Subtilisine) et ROM1 (Protéase rhomboïde). Plusieurs mécanismes non exclusifs les uns des autres semblent permettre le ciblage de ces protéines vers les micronèmes :

1) deux motifs de tri basés sur une tyrosine ont été identifiés au niveau du domaine cytosolique des micronèmes transmembranaires, notamment MIC2. Ces signaux pourraient favoriser l'interaction de ces protéines avec le complexe adaptateur AP au niveau du réticulum endoplasmique. Leur altération entraîne le ciblage des protéines de micronèmes dans la VP, probablement *via* les GD (Di Cristina *et al.*, 2000 ; Hoppe *et al.*, 2000) ;

2) plusieurs domaines de la protéine soluble MIC3 semblent impliqués dans son ciblage vers les micronèmes : chacun de ses domaines EGF, son domaine C-Terminal et son pro-peptide N-Terminal qui pourrait prévenir l'association protéique inappropriée de MIC3 au cours de son trafic (Striepen *et al.*, 2001);

3) trois complexes cargos de protéines de micronèmes ont été identifiés : MIC1/MIC4/MIC6, MIC3/MIC8 et MIC2/M2AP. Ces complexes sont assemblés au niveau du réticulum endoplasmique puis stockés dans les micronèmes avant d'être sécrétés. Parmi eux, la protéine transmembranaire (MIC6, MIC8 ou MIC2) qui possède la séquence signal de tri tyrosine au niveau de sa queue cytoplasmique, escorte les autres protéines du complexe vers les micronèmes (Soldati *et al.*, 2001). Certaines protéines de ces complexes ont été décrites comme formant des multimères : dimères de MIC3, hexamères de M2AP/MIC2 et de MIC1/MIC4/MIC6. L'oligomérisation et l'assemblage en complexe des protéines de micronèmes semble indispensable pour leur fonction (Cérède *et al.*, 2002 ; Dowse and Soldati, 2004).

c) Fonctions des protéines de micronèmes

La grande majorité des protéines de micronèmes possède des domaines d'adhésion analogues à ceux retrouvés chez les mammifères. Ces domaines d'adhésion impliqués dans les interactions protéine-protéine et protéine-carbohydate ainsi que dans la reconnaissance cellulaire incluent : i) des domaines homologues au facteur de croissance épidermique EGF (Epidermal Growth Factor) (MIC3, MIC6, MIC7, MIC8, MIC9 et MIC12), ii) des répétitions thrombospondine de type I (TSR) (MIC1 et MIC2), iii) des domaines intégrine A (MIC2), iv) plusieurs domaines analogues aux lectines (MIC1, MIC3 et MIC8), v) des domaines Apple (MIC4 et AMA1) et vi) des domaines MAR (Microneme Adhesive Repeat) (MIC1) qui lient les oligosaccharides sialylés de la cellule hôte (Dowse and Soldati, 2004 ; Saouros *et al.*, 2005 ; Lebrun *et al.*, 2007 ; Blumenschein *et al.*, 2007).

La plupart des protéines de micronèmes, dont MIC2 (protéine essentielle au parasite), sont des adhésines qui gouvernent la reconnaissance et l'attachement du parasite à la membrane de la cellule hôte, lors de l'invasion et du gliding (Keeley and Soldati, 2004). Les protéines de micronèmes sont sécrétées au niveau de la partie apicale du parasite, dès son contact avec la cellule hôte. Elles s'associent alors en complexe, à la membrane parasitaire. Elles y subissent un ou plusieurs clivage(s) protéolytique(s), médiés par deux protéases MPP2 et MPP3 (Microneme Protein Protease), ce qui facilite leur association aux récepteurs cellulaires (Zhou *et al.*, 2004). MIC5 semble réguler la protéolyse des protéines de surface parasitaire *via* MMP2 (Brydges *et al.*, 2006). Elles sont ensuite libérées de la surface parasitaire par MPP1 qui clive leur domaine transmembranaire. MPP1 ressemble aux protéases à sérine de la famille des rhomboïdes. Parmi les cinq protéases à sérine membranaires analogues aux rhomboïdes découvertes chez *Toxoplasma* (ROM1-5), ROM4 ou ROM5, localisées au niveau de la membrane plasmique, pourraient être responsables de l'activité de MPP1 (Dowse and Soldati, 2004 ; Dowse *et al.*, 2005).

AMA1 est différente des autres protéines de micronèmes car elle n'est pas impliquée dans le gliding ni dans les premières étapes de l'invasion parasitaire. Elle s'associe à d'autres protéines de rhoptries au niveau de la jonction mobile au travers de laquelle le parasite se propulse dans la cellule hôte (Alexander *et al.*, 2005).

Les protéines de micronèmes ont un rôle synergique et semblent permettre au parasite de multiplier les interactions récepteur-ligand. Contrairement à *Plasmodium* qui ne peut envahir que les érythrocytes, le vaste répertoire des protéines de micronèmes de *Toxoplasma* pourrait lui assurer une large spécificité d'hôtes et la capacité à se propager dans tous les organes (Cérède *et al.*, 2005).

4. Les rhoptries

T. gondii possède entre 6 et 12 rhoptries localisées à l'extrémité apicale du parasite (**Figure 9**). Ces organites ont une forme de massues allongées dans le sens antéropostérieur, d'une longueur de 1 à 4 μm (Vivier and Petitprez, 1972). Ils présentent une extrémité antérieure allongée et effilée en forme de canal traversant l'intérieur du conoïde et se prolongent vers la partie apicale du parasite par un pédoncule. Ce

pédoncule est associé à la jonction mobile lors de l'invasion. L'extrémité postérieure plus large paraît spongieuse en microscopie électronique (Dubremetz, 2007).

a) Biosynthèse des rhoptries

La voie de biosynthèse des rhoptries passe par la formation de précurseurs appelés pré-rhoptries, larges vésicules contenant un matériel dense et hétérogène et qui se développent grâce à la fusion de petites vésicules provenant du Golgi. Les pré-rhoptries évoluent en organites matures après la condensation et l'élongation du pédoncule des rhoptries (Dubremetz, 2007) (**Figure 18**). Il a été proposé que la voie de trafic vésiculaire médiée par AP-1, généralement associée au mécanisme de tri dans les lysosomes, était impliquée dans la biogénèse des rhoptries. Les rhoptries seraient des lysosomes modifiés, hypothèse renforcée par le fait que les rhoptries constituent le compartiment le plus acide de *T. gondii* (Ngo *et al.*, 2004).

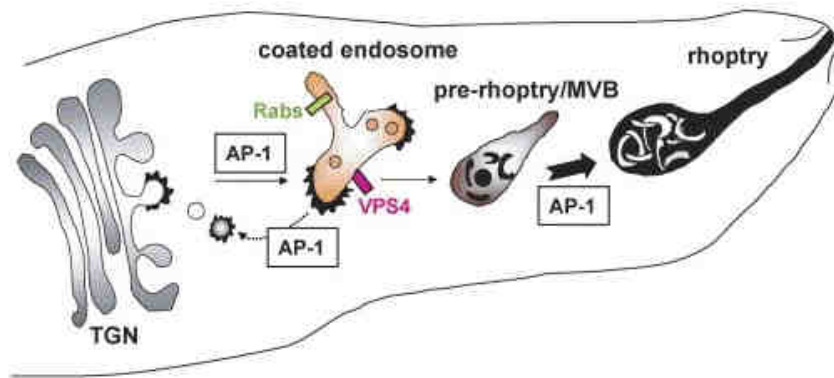


Figure 18 : Modèle de la voie de biosynthèse des rhoptries des *Apicomplexa*. La biogénèse des rhoptries est permise grâce au trafic vésiculaire médié par AP-1, généralement associé au mécanisme de tri des lysosomes. Les protéines de rhoptries transitent par la voie endosomale depuis le réseau trans-Golgi (TGN) via un corps multivésiculaire (MVB) ou rhoptrie immature. La protéine chaperone VSP4 (vacuolar sorting protein 4) pourrait réguler la dynamique membranaire de la voie endosomale des rhoptries et/ou permettre le transport du cholestérol. Le cholestérol pourrait être impliqué dans l'organisation des MVB et dans le tri et le transport des protéines de rhoptries vers les rhoptries matures. Coppens and Vielemeyer, 2005.

b) Ciblage des protéines de rhoptries

La réalisation du protéome des rhoptries a permis à la mise en évidence d'une trentaine de protéines (Bradley *et al.*, 2005). Détectées dans la matrice des rhoptries, les protéines de la partie postérieure plus large sont appelées protéines ROP (ROP1-18 et ROP2L1-6 (ROP2-Like)) alors que celles localisées dans le pédoncule sont appelées protéines RON (RON1-5). Les protéines ROP et RON sont issues du tri latéral des protéines stockées dans les pré-rhoptries (Dubremetz, 2007). Les protéines de rhoptries sont stockées avec des hydrolases habituellement spécifiques des lysosomes (Que *et al.*, 2002). A l'exception de ROP5,

les protéines des rhoptries sont toutes synthétisées sous la forme de pré pro-protéines. Leur peptide signal N-terminal est d'abord clivé dans le réticulum endoplasmique, lors de leur trafic vers les rhoptries. Leur pro-domaine est ensuite clivé par des protéases dans les rhoptries, notamment par la subtilisine SUB2 ou la cathepsine toxopain-1 ou CBP1 (Miller *et al.*, 2003 ; Que *et al.*, 2002). Ces protéases sont impliquées dans la biogénèse des rhoptries (Dubremetz, 2007). L'étude du rôle des différents domaines de la protéine soluble ROP1 a montré que le peptide signal et le pro-domaine des rhoptries assuraient le trafic de ROP1 vers les rhoptries (Bradley and Boothroyd, 2001 ; Striepen *et al.*, 2001). Dans les protéines membranaires de la famille de ROP2, deux domaines de la région C-Terminale, l'un basé sur une tyrosine et potentiellement associé à la protéine adaptatrice AP-1, l'autre basé sur une di-leucine, sont responsables du trafic de ces protéines jusqu'aux rhoptries matures (Hoppe *et al.*, 2000 ; Ngo *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que, comme pour les protéines de micronèmes, plusieurs mécanismes régiraient le ciblage des protéines vers les rhoptries.

c) Fonctions des protéines de rhoptries

Les protéines sécrétées des rhoptries contrôlent l'invasion active dans la cellule hôte et la formation de la VP (Ngô *et al.*, 2004). La plupart des protéines ROP et RON possèdent peu d'homologies avec des protéines de fonction connue.

Les protéines ROP sont des protéines membranaires qui possèdent soit un domaine transmembranaire de type I, soit une ancre GPI. Les 12 membres de la famille de ROP2 présentent des domaines kinases au niveau de leur région C-Terminale mais seules ROP16, ROP17, ROP18 et ROP2L4 ont conservé la boucle glycine et l'acide aspartique, critiques pour l'activité phosphotransférase. ROP17 et ROP18 possèdent une activité kinase *in vitro* (El Hajj *et al.*, 2006 ; 2007 ; Lebrun *et al.*, 2007). Les rhoptries délivrent leur contenu juste sous le conoïde, au moment de l'invasion, laissant derrière eux des organites vides, mais dont la forme et l'intégrité membranaire demeurent (Perkins, 1992). Leur sécrétion requiert l'attachement apical du parasite (Mital *et al.*, 2005). Les protéines de rhoptries sont sécrétées dans des petites vésicules qui vont fusionner avec la MVP. De nombreuses protéines ROP sont ainsi associées à la MVP, en association avec les constituants de la cellule hôte. ROP2, plus particulièrement, permet l'étroit contact entre les mitochondries de l'hôte et la VP et avec ROP4, elle est impliquée dans l'acquisition de la lactoferrine cellulaire (Dubremetz, 2007 ; Dziadek *et al.*, 2007). Les kinases ciblées à la MVP pourraient être responsables des cascades de signalisation conduisant à la résistance de la cellule hôte aux conducteurs d'apoptose (cf chapitre I F 3) (Molestina and Sinai, 2005).

Les protéines RON possèdent des motifs favorisant les interactions protéine-protéine. Elles ont été décrites en complexe avec AMA1 au niveau de la jonction mobile formée lors de l'entrée du parasite dans la cellule hôte (Alexander *et al.*, 2005).

Parmi les quelques protéines ROP atypiques, la phosphatase PP2Chn avec sa séquence NLS bipartite, est ciblée comme la kinase ROP16, dans le noyau de la cellule hôte. Elles pourraient réguler les voies de signalisation de la cellule hôte, par exemple contrôler son cycle cellulaire (Gilbert *et al.*, 2007). La toxofiline, protéine spécifique de *Toxoplasma* qui lie l'actine G de mammifère *in vitro* (Poupel *et al.*, 2000), a été

identifiée comme étant une protéine de rhoptries (Bradley *et al.*, 2005). Elle pourrait être sécrétée dans la VP et pourrait jouer un rôle dans la polymérisation de l'actine des cellules hôtes. Son activité pourrait être contrôlée par des caséine kinases II et la PP2C (Delorme *et al.*, 2003). La protéine NHE2 impliquée dans l'osmotolérance a été localisée dans les rhoptries. Elle pourrait réguler le pH des rhoptries lors de leur biogénèse et lors du clivage des protéines ROP (Karasov *et al.*, 2005). Enfin, la protéine Rab11 est une petite GTPase qui pourrait réguler le trafic des protéines de rhoptries (Bradley *et al.*, 2005).

Le vaste répertoire des protéines de rhoptries pourrait dériver d'une pression de sélection afin d'assurer les propriétés spécifiques des *Apicomplexa* telles que la formation de kystes ou la prolifération singulière des tachyzoïtes par endodyogénie, processus de division propre à *Toxoplasma* et ses plus proches cousins.

d) Les lipides des rhoptries

Les rhoptries permettent le stockage de certains lipides (Foussard *et al.*, 1991). Elles sont caractérisées par un taux très important de cholestérol et de phospholipides tels que le PC et le PA ou encore les lysophospholipides. Par contre, elles ne contiennent pas de PS, de PI ou de sphingomyéline. Le ratio lipide/protéine suggère que les lipides des rhoptries sont dans un état non lamellaire. La sécrétion du cholestérol libre, du PA et du PC pourrait faciliter la formation de la MVP. Le cholestérol pourrait également être impliqué dans la biogénèse des rhoptries en contribuant à la définition de la morphologie des rhoptries et en modulant le trafic des corps multi vésiculaires connectés aux rhoptries matures (Coppens and Vielemeyer, 2005).

E. LE PROCESSUS D'INVASION

Le succès intracellulaire des parasites *Apicomplexa* repose sur l'efficacité et la rapidité de leur processus d'invasion de la cellule hôte (moins de 20 secondes). Contrairement aux autres protozoaires, les *Apicomplexa* ne possèdent ni flagelle, ni cil, n'effectuent pas de mouvement amoéboïde et font pourtant preuve d'une très grande mobilité. Le mode de locomotion basé sur l'actine parasitaire, est différent de celui de nombreux pathogènes et il est indépendant du calcium de l'hôte. Le processus de glissement du parasite ou gliding de *Toxoplasma* n'entraîne pas de déformations du parasite, contrairement aux amibes et aux cellules de vertébrés qui émettent des lamellipodes et/ou des pseudopodes au cours de leur déplacement. Le gliding permet au toxoplasme de se rendre jusqu'à la membrane de la cellule hôte. Il pénètre alors la cellule hôte selon un processus différent de l'endocytose ou de la phagocytose qui sont utilisées par les virus, les bactéries ou par *Trypanosoma* (Antoine *et al.*, 1998 ; Finlay and Cossart, 1997 ; Sibley and Andrews, 2000) : aidé par ses protéines de surface et par la sécrétion calcium-dépendante des protéines de micronèmes, le parasite utilise son moteur d'acto-myosine pour pénétrer la cellule hôte. Ce processus d'invasion active, différent de l'invasion induite par les bactéries, se déroule avec une apparence

passivité de la cellule hôte : pas de renflements de la membrane, pas de réorganisation des microfilaments d'actine et pas de phosphorylation des tyrosines cellulaires (Morisaki *et al.*, 1995). L'invasion de la cellule hôte coïncide avec la formation de la VP *via* la sécrétion des protéines de rhoptries. En effet, le parasite se propulse au travers d'une jonction mobile et entraîne la membrane de la cellule hôte qui va former la MVP. Le parasite se trouve rapidement isolé du cytoplasme de l'hôte dans la VP, compartiment spécialisé d'origine mixte (parasitaire et cellulaire), non-fusogénique, dans lequel il va se développer (**Figure 19**) (Sibley, 2003 ; Lebrun *et al.*, 2007).

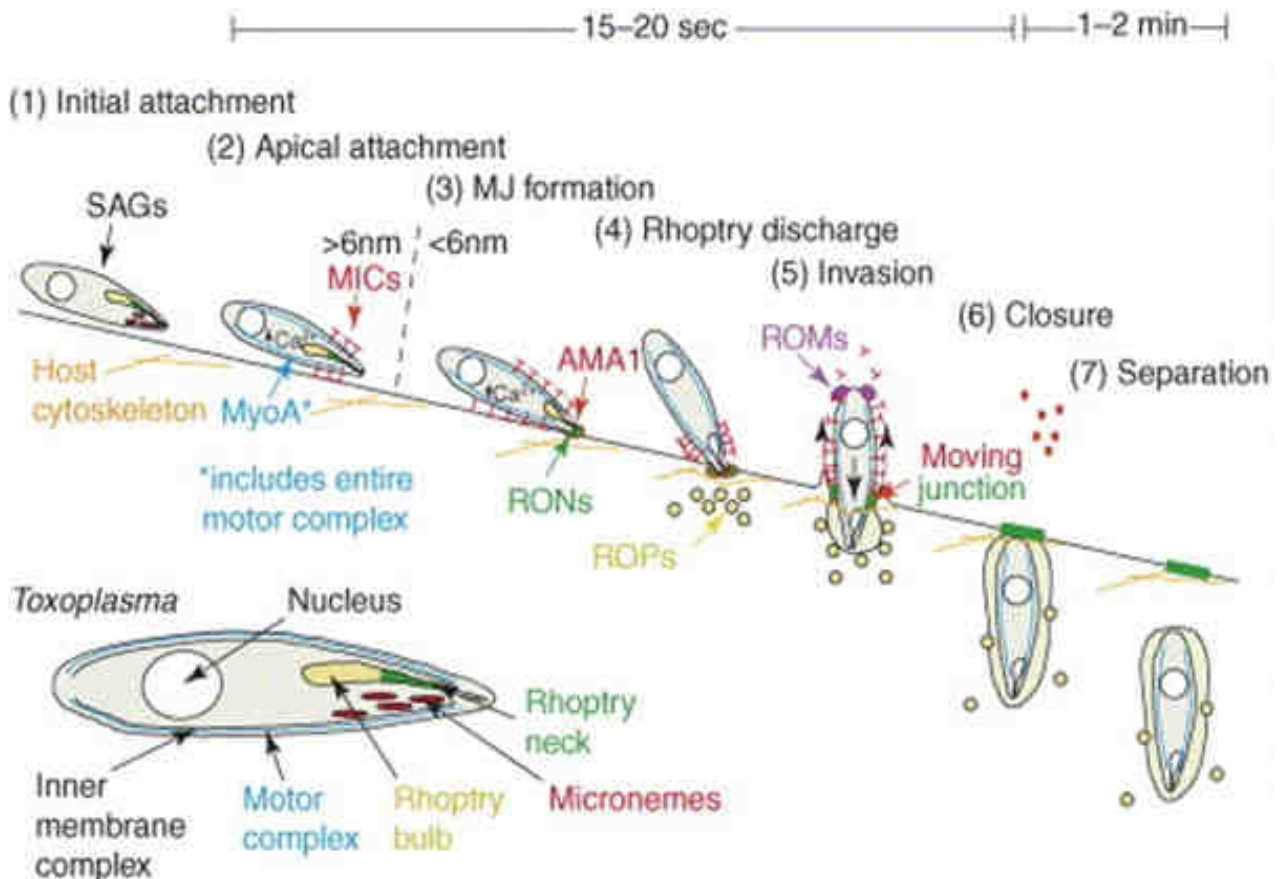


Figure 19 : Modèle d'invasion de *Toxoplasma* en 7 étapes. (1) L'attachement initial à la cellule hôte implique la reconnaissance des récepteurs de surface cellulaires par les protéines de surface SAGs. (2) Les protéines MICs sécrétées en réponse à un flux de calcium s'accumulent à la surface du parasite au niveau apical (en forme de T rouge) et permettent son attachement à l'hôte. (3) Après l'extrusion du conoïde, la jonction mobile (vert et anneau rouge) se forme avec la sécrétion des protéines RONS (vert) qui s'associent avec la protéine de micronèmes AMA1 (cercles rouges). Une interface d'interaction avec la cellule hôte inférieure à 6 nm et en forme de petit anneau est ainsi créée. (4) Les protéines ROPs (jaune) sont sécrétées dans le cytoplasme de l'hôte au niveau du site d'invasion. Certaines ROPs restent associées à de petites vésicules qui fusionnent avec la membrane de la VP en cours de formation, alors que d'autres ROPs restent solubles et pourraient cibler d'autres sites à l'intérieur de la cellule hôte. (5) Le parasite pénètre activement l'hôte et pousse (flèches latérales) les MICs transmembranaires et/ou l'anneau AMA1-RON vers la partie postérieure du parasite en invaginant la membrane de la cellule hôte pour créer la VP. Une ou plusieurs protéases rhomboïdes (ROM; violet) clivent et libèrent les MICs de la partie postérieure. Lors de l'invasion, la VP en cours de formation traverse le cytosquelette de l'hôte (orange), probablement *via* l'ancrage de certaines molécules du cytosquelette. Alors que le parasite accomplit les étapes 2 à 5 en 15 à 20 s, les dernières étapes, la cloture et la séparation nécessitent 1 à 2 min (6-7). La cloture implique la fission de la VP avec la membrane de la cellule hôte. Cette étape pourrait être facilitée par un complexe résiduel de la jonction mobile ou d'autres protéines parasitaires ou cellulaires. Carruthers and Boothroyd 2007.

1. Le gliding

In vivo, les mouvements des parasites par glissement ou « gliding » sont associés à l'invasion de la cellule hôte mais ils peuvent être visualisés *in vitro* sur un substrat. Les mouvements du gliding ne nécessitent pas l'intervention de flagelle mais dépendent du substrat et d'un flux de calcium. Le gliding chez *Toxoplasma* consiste en trois types de mouvements différents : circulaires (1.5 $\mu\text{m}/\text{seconde}$), hélicoïdaux (1-3 $\mu\text{m}/\text{seconde}$) ou de 360° autour de la partie postérieure fixe (0.5 révolutions/seconde) (Sibley, 2003) (**Figure 20A**). Cette vitesse de déplacement montre que le parasite est extrêmement rapide (10 à 50 fois plus qu'une amibe ou qu'un kératinocyte). Le gliding et l'invasion sont associées à la translocation, de la partie apicale jusqu'à la partie postérieure du parasite, de protéines de micronèmes à la surface parasitaire (cf chapitre II D 3). Ces protéines de micronèmes, comme les antigènes de surface SAGs (cf chapitre II D 2 a), sont déposés tout au long d'une traînée formée par les parasites en mouvements (**Figure 20B**) (Carruthers *et al.*, 1999). Ces mouvements suggèrent l'existence d'un puissant mécanisme de propulsion au niveau de la pellicule du parasite. Ce complexe moteur a été appelé le glideosome (Johnson *et al.*, 2007 ; Heintzelman, 2006).

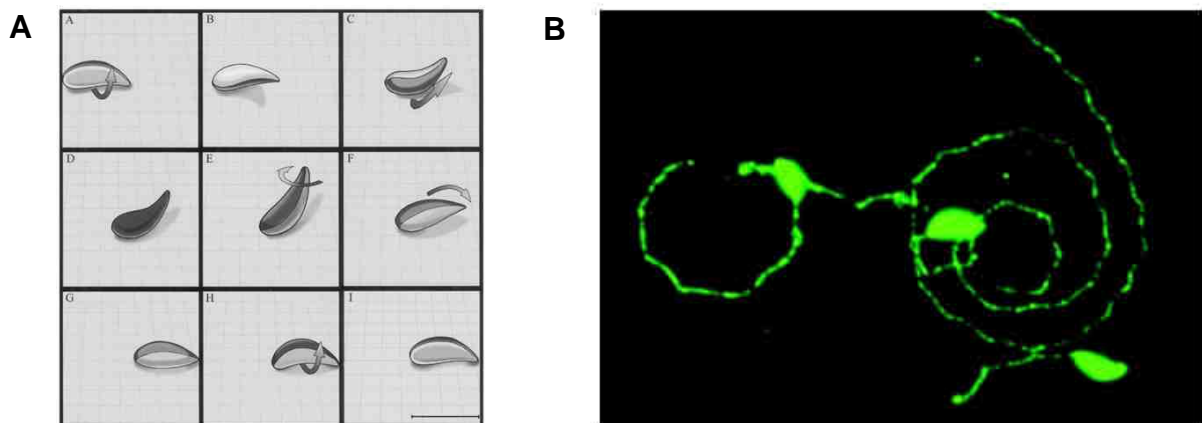


Figure 20 : Le gliding chez *Toxoplasma*. (A) Schéma des mouvements hélicoïdaux effectués par le parasite. Hakansson *et al.*, 1999. (B) Visualisation par immunofluorescence à l'aide d'un anti-SAG1, de la trace laissée par le parasite en mouvement sur une lame de verre recouverte de sérum. Sibley, 2003.

2. L'attachement du parasite à la cellule hôte et l'engagement vers l'invasion cellulaire

L'invasion est précédée d'une étape de reconnaissance entre le parasite et la cellule-hôte. Cette reconnaissance implique des interactions entre des ligands en surface parasitaire et les récepteurs à la surface de la cellule hôte. L'efficacité de l'attachement du parasite sur la cellule hôte semble dépendre du niveau d'expression des récepteurs cellulaires. Cet attachement est maximal pendant la phase S du cycle

de la cellule hôte (Grimwood and Smith, 1996). L'interaction hôte - parasite implique notamment des protéines de surface parasitaire, des lectines, des protéines de la matrice extracellulaire et des protéines de micronèmes. Elle s'accompagne de la réorientation du parasite qui est suivie par l'extrusion du conoïde et la sécrétion des protéines du pédoncule des rhoptries (RON) associées à la jonction mobile en formation.

a) L'attachement initial

Les protéines de surface du toxoplasme (cf chapitre II D 2 a) et plus particulièrement les protéines SAGs, participent à l'attachement initial du parasite à la cellule hôte. Les protéines SAGs établissent des liaisons réversibles, latérales et de faible affinité avec la cellule hôte. Le parasite semble ainsi inspecter la surface de l'hôte afin de choisir le site optimal d'invasion (Carruthers and Boothroyd, 2007). L'attachement initial des parasites à la cellule hôte est permis par la liaison des protéines SAGs, et plus particulièrement SAG3, aux glycosaminoglycanes (GAG) présents à la surface cellulaire. La redondance des protéines de surface parasitaire qui lient différents GAG pourrait être en partie responsable de la spécificité d'invasion des différents stades parasitaires pour certains types cellulaires (Naguleswaran *et al.*, 2003 ; Vonlaufen *et al.*, 2004). Certaines protéines de la matrice extracellulaire semblent être aussi impliquées dans l'attachement initial du parasite à l'hôte. En effet, la laminine recouvrant les parasites sert de ligand aux récepteurs Intégrine $\beta 1$ de la membrane des cellules-hôte. Le collagène IV est également impliqué dans l'interaction hôte - parasite (Furtado *et al.*, 1992a). L'ensemble des mécanismes responsables des interactions parasite-cellule hôte et parasite-matrice extracellulaire restent encore inconnus.

b) L'attachement apical

Après cette étape d'attachement initial, le parasite se lie à la cellule hôte *via* sa partie apicale. Cette liaison est assurée par certaines protéines de micronèmes (MIC1, MIC2, MIC4 et MIC3), associées en complexe à la membrane parasitaire après leur sécrétion (cf chapitre II D 3). En effet, les protéines de micronèmes ont conservé des domaines d'adhésion (thrombospondine, EGF, lectine) qui sont généralement impliqués dans les interactions protéine/protéine ou protéine/carbohydate. MIC2, par exemple, lie les récepteurs cellulaires tels qu'ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) ou l'héparine (Brossier and Sibley, 2005). L'attachement apical du parasite à l'hôte *via* au moins trois complexes de protéines de micronèmes différents semble impliquer des récepteurs cellulaires différents. Cette redondance pourrait permettre au parasite d'interagir avec une grande variété de cellules hôtes ou de créer une interface de liaison particulièrement robuste (Carruthers and Boothroyd, 2007).

c) L'engagement vers l'invasion

Une fois associé à la cellule hôte, le parasite se réoriente et s'engage dans le processus d'invasion *via* l'extrusion dépendante du calcium de son conoïde (cf chapitre II D 1 a). L'extrusion du conoïde permet

l'établissement d'une troisième étape d'attachement entre le parasite et la cellule hôte et d'une zone de contact très fine entre la partie apicale parasitaire et l'hôte (**Figure 21**). La protéine de micronèmes AMA-1 (cf chapitre II D 3) et au moins trois protéines du pédoncule des rhoptries (RON2, 4 et 5) (cf chapitre II D 4) sont associées en complexe au niveau de cette zone de contact appelée jonction mobile (Carruthers and Boothroyd, 2007).

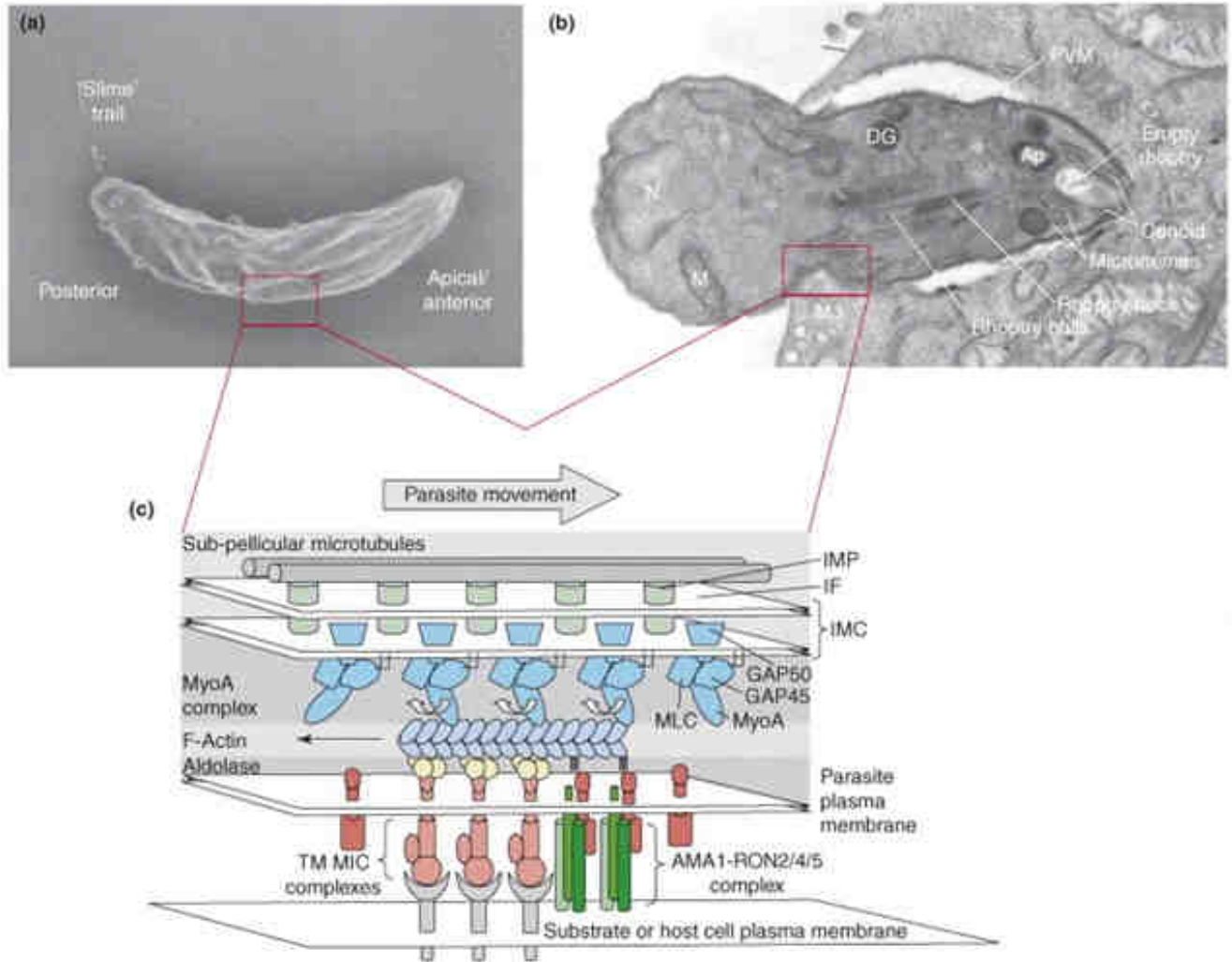


Figure 21 : Gliding et invasion chez *Toxoplasma*. (a) Tachyzoïte en mouvement laissant une trace derrière lui. Le rectangle représente la zone de contact du parasite avec le substrat. (b) Parasite pénétrant dans une cellule épithéliale. Le rectangle représente la jonction mobile (MJ), site de contact entre la membrane plasmique parasitaire et la membrane de la cellule hôte. N, noyau ; M, mitochondrie ; Ap, apicoplaste ; PVM, membrane de la VP. (c) Modèle de la machinerie mise en place lors du gliding ou de l'invasion. Les protéines de micronèmes sont liées aux récepteurs de la cellule hôte et interagissent avec les filaments d'actine (actine-F) via l'aldolase. La myosine MyoA, ancrée à l'IMC par MLC1, GAP45 et GAP50 glisse le long des filaments d'actine-F, entraîne les protéines de micronèmes vers la partie postérieure du parasite et permet à celui-ci de se propulser à l'intérieur de la cellule hôte. Le complexe AMA-1/RON2/RON4/RON5 situé au niveau de la jonction mobile ne participe pas au processus d'invasion. IMP, protéines de l'IMC ; IF, filaments intermédiaires ; TM, transmembrane. Carruthers and Boothroyd, 2007.

3. Le glideosome et l'invasion active du parasite

L'invasion de la cellule hôte est un évènement essentiel pour le tachyzoïte car il ne peut se développer et proliférer qu'intracellulairement, au sein de la vacuole parasitophore (VP). Le glideosome est le complexe protéique entre l'IMC et les microfilaments d'actine reliés à la membrane plasmique, qui assure la motilité parasitaire nécessaire au processus d'invasion. Le gliding et l'internalisation de *Toxoplasma* dans sa cellule hôte sont possibles grâce à la mobilisation de son cytosquelette d'actine lié à la myosine MyoA. Ces processus peuvent en effet être inhibés par des inhibiteurs de myosine. Parmi les myosines de classe XIV de *T. gondii*, seule MyoA (93 kDa) est localisée juste au dessous de la membrane plasmique. Les myosines de *Toxoplasma* sont les plus petites myosines jamais identifiées. Contrairement aux myosines classiques eucaryotes, MyoA est composée d'une grosse tête directement suivie d'une queue très courte. La directionnalité de MyoA sur l'actine a permis d'orienter les filaments d'actine : leur extrémité positive est tournée vers la partie postérieure du parasite (Meissner *et al.*, 2002a). Alors que la tête de MyoA est liée à l'actine, sa queue est liée à l'enzyme glycolytique aldolase. Le fait que *Toxoplasma* utilise une enzyme glycolytique pour son mécanisme d'invasion est très singulier. L'aldolase parasite est localisée au niveau apical. Elle se redistribue au niveau du glideosome lors de l'invasion (Jewett and Sibley, 2003). L'aldolase forme un pont entre l'actine et la queue cytoplasmique des protéines de micronèmes transmembranaires, notamment MIC2, qui se lie à la cellule hôte ou aux composants de la matrice extracellulaire (Keeley and Soldati, 2004). Myo A est ancrée aux protéines IMC-1 et IMC-3 de l'IMC par l'intermédiaire de protéines intermédiaires : MLC1 (Myosin Light Chain) associée à IMC1, GAP45 et GAP50 (Gliding Associated Proteins), protéine intégrale de membrane qui ancre le glideosome à l'IMC (Gaskins *et al.*, 2004 ; Johnson *et al.*, 2007 ; Heintzelman, 2006).

Dès leur activation par un flux de calcium intracellulaire, des protéines kinases initient le gliding et l'invasion en phosphorylant GAP45, GAP50, MLC1 et MyoA. Dès la polarisation du réseau de filaments d'actine formé, le moteur est engagé et fournit une traction unidirectionnelle sur les myosines motrices, ce qui permet la génération de la force responsable du gliding. Les myosines ne peuvent apporter seules une force motrice suffisante. La polymérisation de l'actine au niveau de la partie apicale du parasite contribue au mouvement en propulsant le filament et ses éléments associés vers l'extrémité postérieure du parasite. Ce mouvement vers la partie postérieure, basé sur le moteur actine-myosine, s'accompagne de celui des protéines de micronèmes qui entraînent le parasite à l'intérieur de la cellule hôte (Baum *et al.*, 2006) (**Figure 21**). Les protéines de micronèmes redistribuées à la partie postérieure du parasite sont ensuite clivées au niveau de leur domaine transmembranaire par des protéases rhomboïdes, notamment MPP1 dont l'activité pourrait être assurée par ROM4 ou ROM5 (cf chapitre II D 3). Le parasite ainsi libéré de ces attaches peut progresser dans la cellule hôte en établissant de nouveaux contacts (Brossier and Sibley, 2005 ; Dowse *et al.*, 2005).

Le cytosquelette de la cellule hôte et plus particulièrement les filaments d'actine, semblent également participer à l'invasion parasitaire et à la formation de la VP *via* diverses projections cellulaires qui englobent comme un gant la surface du parasite. Ces contacts établis par la cellule hôte peuvent se faire avec le conoïde ou la région postérieure du parasite, mais sont plus fréquemment latéraux (MacLaren *et al.*, 2004) (**Figure 22**).

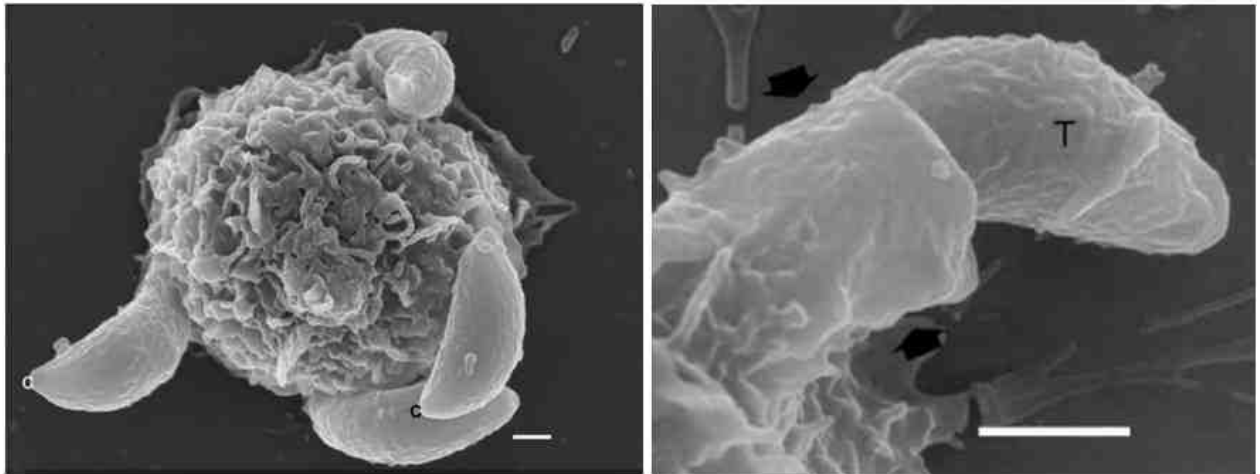


Figure 22 : Invasion de neutrophiles par *Toxoplasma*. L'invasion cellulaire est facilitée par les projections du cytosquelette comme les filipodes qui parviennent à englober le parasite (T) tel un gant. C, conoïde. Echelle : 1 μ m. MacLaren *et al.*, 2004.

4. La formation de la vacuole parasitophore

Lors de l'entrée du parasite dans la cellule hôte, la membrane de la cellule hôte se déforme en s'invaginant pour former la région d'étriquetement membranaire située entre la membrane parasitaire et la membrane de la cellule hôte que constitue la jonction mobile. Une constriction du parasite encerclant celui-ci peut apparaître lorsque celui-ci progresse au travers de la jonction mobile. En glissant le long de cette zone de contact selon un axe antéro-postérieur, *T. gondii* emmène une partie de la membrane plasmique de la cellule hôte pour en faire la membrane vacuolaire. Il forme ainsi la VP qui l'entoure progressivement (Sibley, 2003) (**Figure 23**).

Plusieurs éléments de la jonction mobile ont été récemment identifiés : les protéines RON du pédoncule des rhoptries y sont associées en complexe. Ce complexe est ancré à la jonction mobile par la protéine de micronèmes AMA1 (Alexander *et al.*, 2005 ; Lebrun *et al.*, 2007). La force de propulsion du parasite dans la cellule hôte pourrait être assurée par la liaison d'une ou plusieurs de ces protéines aux molécules de surface cellulaire. La translocation de la jonction mobile au cours de l'invasion pourrait être permise par l'association de la protéine AMA-1 au glideosome, notamment MIC2 (Lebrun *et al.*, 2005).

Lors de l'invasion, la plupart des protéines de la membrane de la cellule hôte sont exclues au niveau de la jonction mobile qui empêche leur diffusion latérale (De Carvalho and De Souza, 1989). Le mécanisme d'exclusion des protéines de l'hôte de la membrane de la VP en formation semble être basé ou facilité par la présence de membranes résistantes au détergent ou rafts, l'attachement du cytosquelette et la multimérisation moléculaire. La VP en formation est dépourvue des protéines de surface (ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1), Intégrine β 1, récepteur aux facteurs de croissance (Fc), molécules du CMH de classe I ou II, CD44, ATPase...), du contenu des vacuoles endocytaires classiques (LAMP

(Lysosome-Associated Membrane Protein), récepteur mannose-6-PO₄, récepteur de la transferrine). De plus, la VP ne possède pas les molécules régulatrices (Rab5, NSF) qui gouvernent la fusion endocytaire. La VP n'est donc plus reconnue par les machineries de fusion endo et exocytaire de la cellule hôte et le parasite peut s'abriter dans cette niche cellulaire non fusogénique qui garde un pH neutre. Par contre, les protéines insérées par un ancrage GPI et la plupart des lipides de la membrane cellulaire tels que le ganglioside GM1 et le cholestérol peuvent passer la jonction mobile (Mordue *et al.*, 1999 ; Charron and Sibley, 2004). La VP est donc une néoformation d'origine mixte (parasitaire et cellulaire) qui joue un rôle prépondérant dans la protection du parasite vis-à-vis de la cellule hôte et dans les échanges établis entre parasite et cellule hôte.

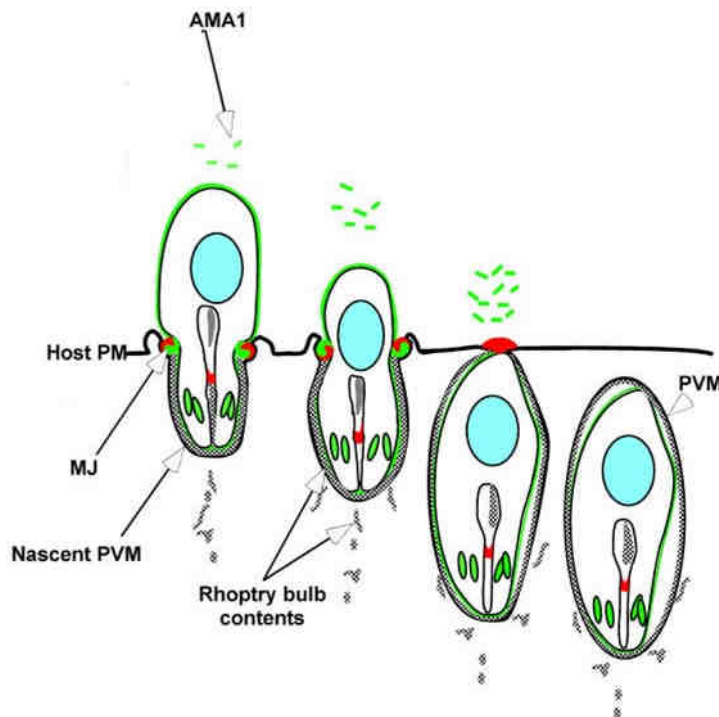


Figure 23 : Formation de la VP de *Toxoplasma*. Lors de l'invasion cellulaire, le parasite se propulse au niveau de la jonction mobile (MJ) qui exclut la plupart des protéines cellulaires et où est localisé le complexe AMA1 (vert) / protéines RON2/4/5 (rouge). Le parasite emmène ainsi une partie de la membrane de la cellule hôte (Host PM) qu'il modifie de façon à en faire la membrane de la VP (PVM) qui l'entoure progressivement. Le contenu des rhoptries (protéines ROP et lipides) est sécrété et s'associe à la membrane de la VP en formation (gris). Parallèlement à l'entrée du parasite dans la cellule hôte, les protéines RON associées à AMA-1 migrent vers la partie postérieure du parasite et forment un anneau au niveau de l'interface de constriction avec la membrane de l'hôte. La libération de ce complexe dans le milieu extracellulaire s'accompagne de l'isolement de la VP dans la cellule hôte. D'après Alexander *et al.*, 2005.

Au moment de l'invasion, les rhoptries paraissent se vider de leur contenu au niveau d'un pore de 40 nm qui connecte le contenu des rhoptries avec le cytoplasme de la cellule hôte (Dubremetz, 2007). Les protéines et lipides sécrétés des rhoptries (cf chapitre II D 4) sont sécrétés sous forme de vésicules qui fusionnent avec la MVP en y ajoutant leur contenu de façon à former une membrane hybride. Certaines vésicules peuvent aussi être observées dans le cytoplasme de la cellule hôte (Hakansson *et al.*, 2001)

(Figure 24). Une fois la VP formée, elle subit une dernière étape de maturation qui est caractérisée par la sécrétion des protéines de GD (cf chapitre III). Le parasite dans sa VP, migre près du noyau de la cellule hôte où il commence à se multiplier.

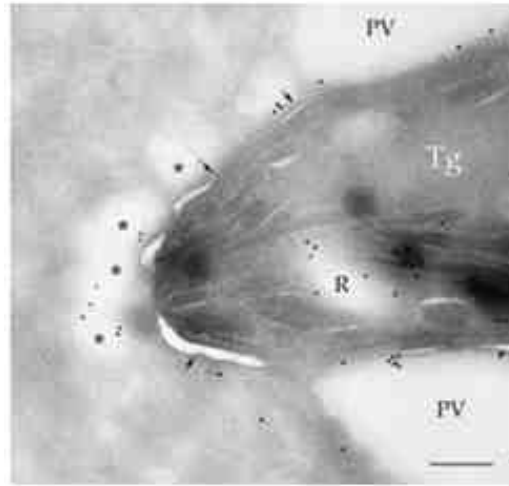


Figure 24 : Sécrétion vésiculaire du contenu des rhoptries lors de l'invasion cellulaire de *Toxoplasma*. Les vésicules de sécrétion dérivées des rhoptries contiennent des protéines ROP (*) (marquage immunogold à l'aide d'un anti-ROP1) et sont adjacentes à la VP (PV) mais en dehors de ce compartiment (flèches pointant la MVP). R, rhoptry. Echelle : 250 nm. Hakansson *et al.*, 2001.

F. LA MULTIPLICATION INTRACELLULAIRE DES PARASITES

Après sa pénétration à l'intérieur de la cellule hôte, le parasite perd toute mobilité et commence à se multiplier par endodyogénie (**Figure 25**). Ce mode de division constitue une particularité de *Toxoplasma* puisque la grande majorité des parasites *Apicomplexa* se multiplient par schizogonie. L'endodyogénie permet la formation, à l'intérieur de chaque parasite, de deux cellules filles, à la suite d'une fission binaire avec une simple répllication des chromosomes suivie d'une mitose et d'un bourgeonnement parasitaire. La division parasitaire implique un remodelage membranaire avec une intense production de lipides membranaires, une fission synchronisée des organites dupliqués comme la mitochondrie et l'apicoplaste, une duplication orchestrée des compartiments membranaires connectés au système endomembranaire. L'appareil de Golgi est le premier organite à se diviser par fission médiane. Il forme alors deux complexes au dessus du noyau (Dubey *et al.*, 1998). La portion antérieure du complexe membranaire interne et les microtubules sub-pelliculaires apparaissent dans les cellules filles sous la forme de dômes, au dessus du noyau (Dubey *et al.*, 1998). Sans qu'il y ait condensation des chromosomes, le noyau prend la forme d'un fer à cheval dont les extrémités se glissent dans les structures en forme de dôme formées par les IMC fils

au niveau de la partie antérieure. L'IMC et les microtubules s'étendent vers la partie postérieure et entourent le noyau qui se divise en deux. Les cellules filles s'accroissent jusqu'à atteindre la taille de la cellule mère. L'IMC de la cellule mère disparaît et sa membrane plasmique devient celle des cellules filles. La multiplication des parasites s'accompagne de la formation d'un corps résiduel issu du reste de la membrane plasmique de la cellule mère. Ce corps résiduel relie la partie postérieure des tachyzoïtes dans la VP (Sibley, 2003).

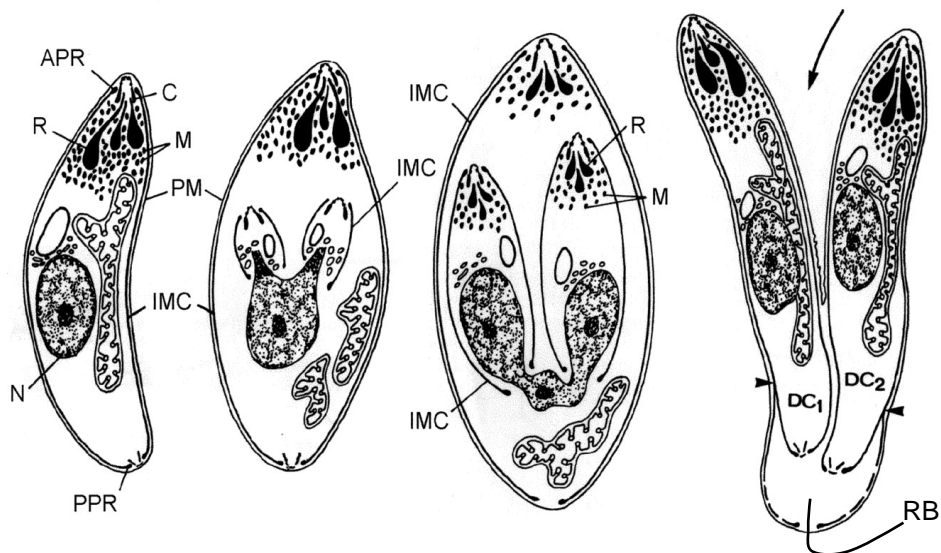


Figure 25 : Multiplication par endodyogénie de *T. gondii*. L'endodyogénie se déroule sans perte de la forme de la cellule mère et de la polarité apicale. La formation d'un noyau (N) courbe s'accompagne de l'apparition sous la forme de dômes, des deux complexes membranaires internes (IMC) associés aux microtubules sous-pelliculaires des cellules filles (DC1 et DC2). Les cellules filles se développent entourées de leurs propres microtubules sous-pelliculaires et de leur propre IMC. APR, anneau polaire apical ; C, conoïde ; R, rhoptries ; M, micronèmes ; PM, membrane plasmique ; PPR, anneau polaire postérieur. Delbac *et al.*, 2001.

Les parasites s'organisent à l'intérieur de la vacuole parasitophore en forme de rosette (**Figure 26A**). La vitesse de multiplication est variable selon la souche parasitaire et dure de 5 à 10 heures (Jones and Hirsch, 1972). Les souches virulentes se multiplient plus rapidement *in vitro* que les souches non virulentes (Marioka and Ohtomo, 1995). Tous les parasites d'une même vacuole se divisent de manière synchrone. Au fur et à mesure des cycles d'endodyogénie, le volume occupé par la vacuole parasitophore s'accroît. Après six à huit cycles d'endodyogénie, 64 à 256 tachyzoïtes vont sortir de la cellule hôte et sont capables d'infecter les cellules environnantes (**Figure 26B**). La perméabilité de la membrane de la VP augmente avec le développement des parasites, entraînant une hausse de la concentration calcique vacuolaire. Cette augmentation rapide et transitoire du calcium intra-vacuolaire suit une déplétion du taux de potassium de la cellule hôte qui accompagne la rupture de la membrane plasmique de l'hôte. L'augmentation du taux de calcium intracellulaire s'accompagne d'une activation transitoire des NTPases vacuolaires et provoque

l'induction de la sortie de la VP par le parasite. Juste avant la rupture de la membrane de la VP, les parasites alors immobiles s'activent, étendent leur conoïde et sont libérés de la cellule. La reprise des mouvements parasitaires semble liée aux variations de la teneur en calcium intracellulaire. Le parasite traverse d'abord la MVP *via* une jonction mobile différente de celle permettant l'entrée dans la cellule hôte (toujours formée des protéines RON mais dépourvue de la protéine AMA1). Le parasite traverse ensuite successivement le cytoplasme puis la membrane plasmique de la cellule-hôte, provoquant des lésions irrémédiables au niveau de la membrane cellulaire (Sibley, 2003).

En présence d'une réponse immunitaire (cf chapitre I F), les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes et s'enkystent (**Figure 26C**). La modification de la structure de la VP conduit à la formation de la paroi du kyste (Weiss and Kim, 2000).

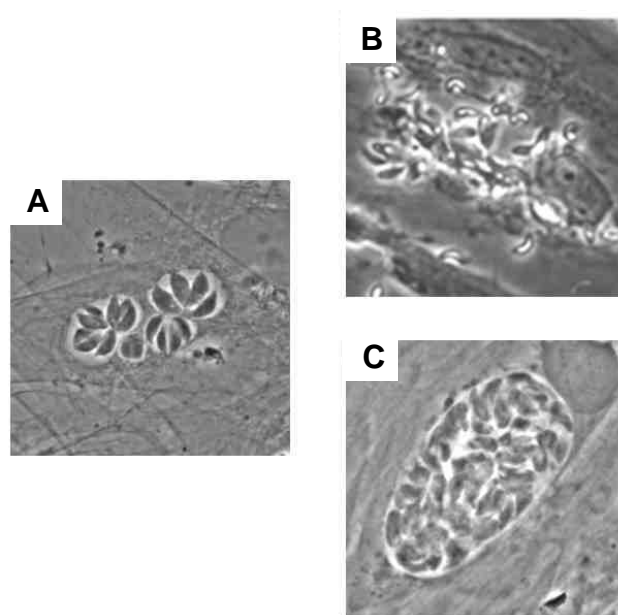


Figure 26 : Nouveau cycle d'invasion cellulaire ou enkystement ? (A) VP contenant 8 tachyzoïtes intracellulaires. **(B)** Evasion des tachyzoïtes prêts à envahir une nouvelle cellule. Moudy *et al.*, 2001. **(C)** Kyste immatures contenant des bradyzoïtes en cours de différenciation.

CHAPITRE III

La vacuole parasitophore et les protéines de granules denses

La VP de *Toxoplasma* mesure environ 9-10 μm de diamètre lorsqu'elle comporte 8 parasites. Formée lors de l'invasion active du parasite à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte, elle est rapidement remaniée par le parasite de façon à exclure la plupart des protéines transmembranaires de la cellule hôte à l'exception des protéines GPI-ancrées et de la plupart des lipides (Mordue *et al.*, 1999 ; Charron and Sibley 2004). La MVP est ainsi modifiée par le parasite afin d'éliminer les protéines cellulaires impliquées dans la fusion avec les vésicules endocytaires et les lysosomes. Les protéines et lipides sécrétés des rhoptries s'insèrent ensuite, pour la plupart, à la MVP. La VP subit enfin une étape de maturation grâce aux protéines sécrétés à partir des GD. Les protéines s'associent pour la plupart, aux trois systèmes membranaires de la VP : la MVP, le réseau de nanotubes membranaires (RNM) et les profondes invaginations de la MVP dans l'espace vacuolaire qui contiennent toutes un microtubule central de l'hôte (HOST). La VP constitue une niche à l'interface parasite/cellule hôte qui offre protection et nutriments pour assurer la multiplication efficace du parasite dans l'hôte.

A. LA VACUOLE PARASITOPHORE

Tous les parasites du phylum des *Apicomplexa* n'ont pas développé la même VP. Les VP de *Toxoplasma* et de *Plasmodium*, par exemple, correspondent à deux stratégies de parasitisme intracellulaire différentes, bien que la formation initiale de ces VP soit conduite par le même processus d'invasion active. La maturation des VP de *Toxoplasma* et *Plasmodium* est différente en termes d'architecture et de métabolisme. Elle s'accompagne de deux modes distincts de multiplication parasitaire : l'endodyogénie *versus* la schizogonie.

La VP de *Toxoplasma* échappe à la reconnaissance et à la fusion avec les endosomes et lysosomes de la cellule hôte. Elle semble donc coupée des sources potentielles de nutriments que pourraient lui apporter les voies endo- ou exocytaires de la cellule hôte. Toutefois, elle ne constitue pas un compartiment complètement isolé. Le pH neutre de la VP ainsi que la présence d'inhibiteurs de protéases dans le

compartiment vacuolaire suggèrent qu'elle n'est pas un compartiment de dégradation mais plutôt une zone d'interface entre le parasite et la cellule hôte qui pourrait permettre, *via* différents systèmes membranaires, le piégeage de divers nutriments de l'hôte, nécessaires au développement parasitaire.

1. Modifications de la cellule hôte suite à la formation de la vacuole parasitophore

a) Redistribution du cytosquelette contre la vacuole parasitophore

Dès 4 à 6 heures d'infection, les microtubules de la cellule hôte commencent à entourer la VP et 24 heures après l'invasion, la VP mature est complètement incluse dans un réseau de microtubules cellulaires (**Figure 27**) (Cintra and De souza, 1985 ; Andrade *et al.*, 2001 ; Sehgal *et al.*, 2005). Ces amas de microtubules cellulaires, ainsi que la vimentine associée aux filaments intermédiaires de la cellule hôte, sont co-distribués contre la VP (Halonen and Weidner, 1994). Par contre, les microfilaments cellulaires d'actine restent inchangés. La morphologie des microtubules est également modifiée : les microtubules cellulaires qui entourent la VP se raccourcissent. En plus de leur association contre la VP, les microtubules de l'hôte se glissent dans de profondes invaginations de la MVP et constituent les HOST (cf chapitre III A 2 a) (Coppens *et al.*, 2006). Les MTOC des cellules infectées se détachent de l'enveloppe nucléaire et s'associent à la VP. Des extensions membranaires de la MVP (EVP) dans le cytosol de la cellule-hôte pourraient assurer ce recrutement. Ces EVP (**Figure 39A**) ont été observées dès les premières études par immunofluorescence sur les protéines de GD (Dubremetz *et al.*, 1993) mais elles 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 EVP membranaires restent à déterminer (Coppens *et al.*, 2006).

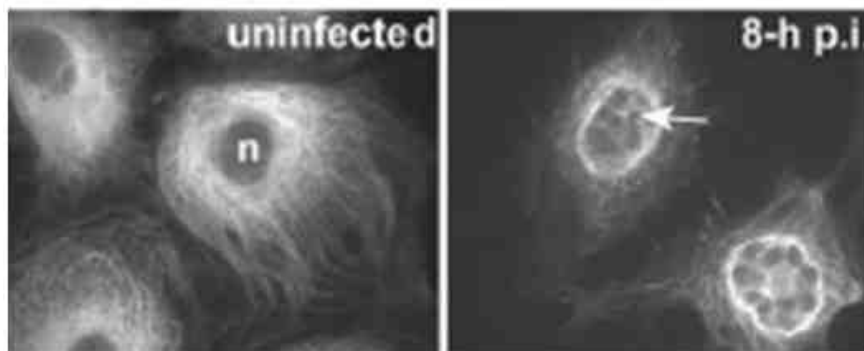


Figure 27 : Réorganisation des microtubules de l'hôte dans les cellules infectées par *Toxoplasma*. Immunofluorescence sur cellules exprimant une α -tubuline fusionnée à la YFP montrant que le réseau microtubulaire de la cellule hôte se réorganise autour de la VP. Les flèches indiquent la VP. n, noyau. Coppens *et al.*, 2006.

b) Redistribution des endo-lysosomes

Dès le début de son développement dans la cellule hôte, la VP est entourée des endo-lysosomes de la cellule hôte. Les structures endo-lysosomiales de l'hôte distribuées autour de la VP sont souvent associées aux microtubules, en contact direct avec la MVP ou avec les HOST. Elles sont également détectées dans l'espace vacuolaire et pourraient être récupérées à des fins trophiques, plus particulièrement pour piéger des lipides ou dérivés lipidiques (Coppens *et al.*, 2006) (**Figure 28**).

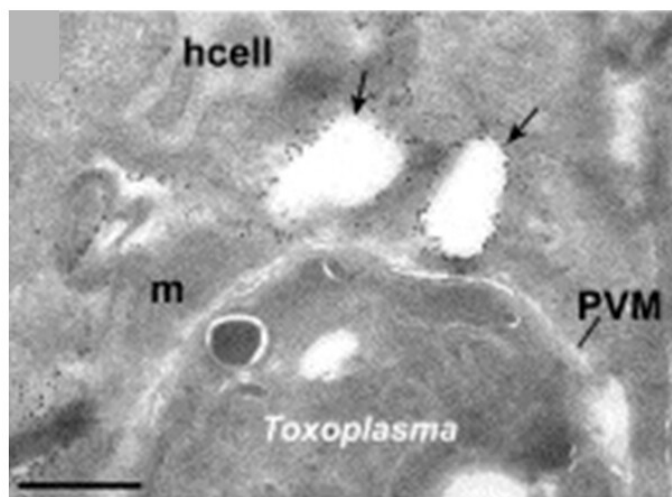


Figure 28 : Association des endo-lysosomes de la cellule hôte avec la VP. Marquage immunogold à l'aide d'un anti-Lamp1. Les flèches indiquent les structures Lamp1 positives. hcell, cellule hôte ; m, mitochondrie. Echelle : 0.5 µm. Coppens *et al.*, 2006.

c) Redistribution des mitochondries et du réticulum endoplasmique

Les mitochondries et le réticulum endoplasmique de la cellule hôte sont recrutés contre la membrane de la VP (De Melo *et al.*, 1992 ; Schatten and Ris, 2004 ; De Melo and De Souza, 1997) (**Figure 29**). Ce recrutement se fait par un processus dynamique médié par les microtubules et les protéines moteurs cytoplasmiques de la cellule hôte telles que la kinésine (Sinai *et al.*, 1997). ROP2, avec sa région mimant la séquence d'import mitochondriale transloquée au-delà de la membrane externe des mitochondries de l'hôte, est impliquée dans la rétention de mitochondries contre la MVP (Sinai and Joiner, 2001 ; Dubremetz, 2007). En effet, l'annulation de la synthèse de ROP2 par l'utilisation d'ARNs anti-sens entraîne des anomalies morphologiques avec l'absence de recrutement des mitochondries de l'hôte. Par contre, la VP est toujours associée au réticulum endoplasmique de l'hôte (Nakaar *et al.*, 2003). L'appareil de Golgi cellulaire, normalement localisé dans la région péri-nucléaire grâce aux microtubules centrosomiaux, est fragmenté en petites unités à la surface de la VP. Par contre, les peroxyosomes de l'hôte ne semblent pas altérés suite à l'infection par *Toxoplasma* (Coppens *et al.*, 2006).

Le parasite pourrait trouver dans cette association, les produits nécessaires à son métabolisme avec des échanges facilités en ATP et en nutriments, ainsi qu'une source potentielle de lipides. En effet, les mitochondries cellulaires semblent être l'unique source d'acide lipoïque, lipide que le parasite est incapable de synthétiser (Crawford *et al.*, 2006). De la même manière, le réticulum endoplasmique cellulaire pourrait constituer une source de phospholipides (Gupta *et al.*, 2005). Etroitement associé aux mitochondries cellulaires, *via* la MVP, le parasite pourrait donc facilement interférer avec les voies métaboliques mitochondriales ainsi qu'inhiber les voies apoptotiques cellulaires (cf chapitre I F 3) (Sinai *et al.*, 2004 ; Martin *et al.*, 2007).

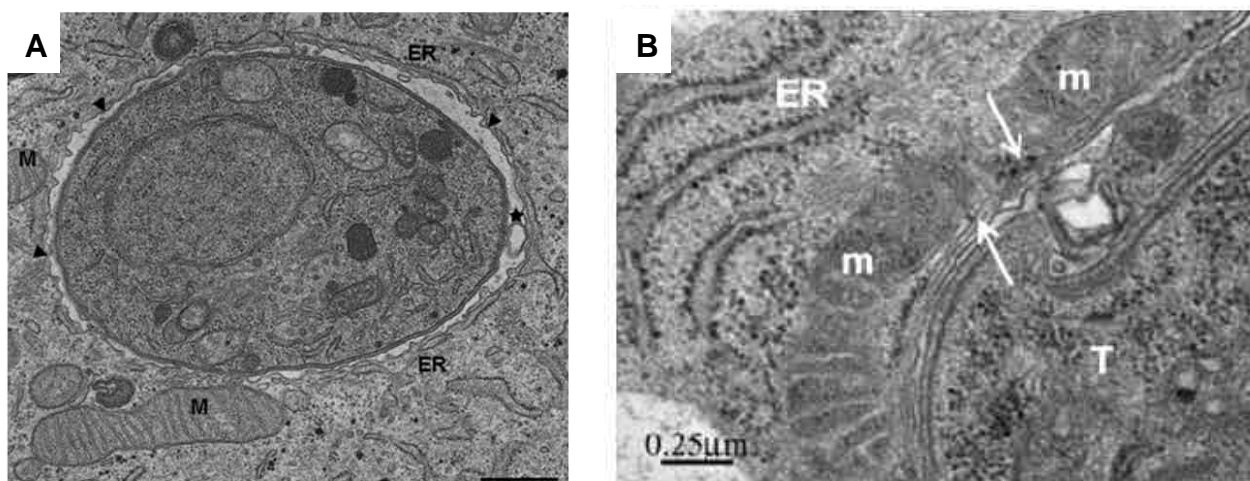


Figure 29 : Association des mitochondries et du réticulum endoplasmique de la cellule hôte avec la VP. (A) 10 minutes après le début de l'invasion, l'espace vacuolaire étroit entre le parasite et la MVP irrégulière (pointes de flèche) comporte alors peu d'éléments intra-membranaires (étoile) et n'a pas encore recruté les mitochondries et le réticulum endoplasmique de la cellule hôte. M, mitochondries ; ER, réticulum endoplasmique. Echelle : 0.5 µm. Lemgruber *et al.*, 2007. **(B)** Mitochondries de l'hôte apposées contre la MVP. Les éléments du réticulum endoplasmique (flèches) sont situés entre la MVP et la membrane externe mitochondriale. T, tachyzoite ; ER, réticulum endoplasmique ; m, mitochondries. Magno *et al.*, 2005a.

2. Deux systèmes de tubules membranaires dans la vacuole

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

La MVP est caractérisée par de profondes invaginations jusqu'à 1.2 µm de longueur dans l'espace vacuolaire. Ces invaginations contiennent toutes un microtubule central de l'hôte, suggérant une interaction dynamique entre les microtubules de l'hôte et la VP. Ces structures appelées HOST (Host Organelles Sequestering Tubulo-structures) permettent l'accumulation dans la VP, de vésicules d'origine cellulaire (endo-lysosomes) qui permettraient au parasite de répondre à ses besoins croissants en nutriments, notamment en cholestérol. Les HOST sont striés périodiquement d'un manteau de 20 à 25 nm d'épaisseur. Ce manteau abondant est régulièrement espacé et associé à des constriction locales au niveau des

HOST. Ces constriction sont modérées et la MVP n'est pas en contact physique direct avec le microtubule au centre des HOST mais invariablement séparée par environ 15 à 20 nm. Les HOST décorés de leur manteau ont un diamètre compris entre 95 et 115 nm. GRA7 (cf chapitre III C) est l'un des composants du manteau protéique décorant les HOST. Ce manteau protéique qui joue le rôle de « garrot » le long des tubules membranaires constituant les HOST, permettrait la séquestration des vésicules d'endocytose d'origine cellulaire (cf chapitre III A 1 b) (Coppens *et al.*, 2006) (**Figure 30**).

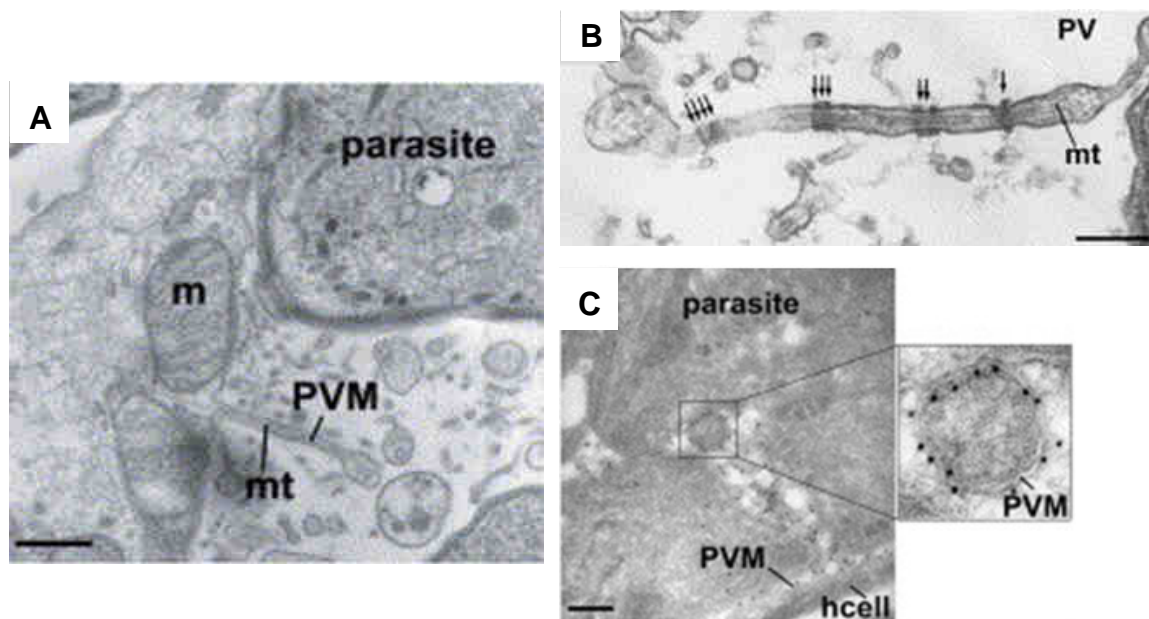


Figure 30 : Les HOST. (A) La section longitudinale montre une invagination de la MVP dans l'espace vacuolaire avec un microtubule de l'hôte au centre. Echelle : 0.25 μ m. mt, microtubule de l'hôte ; m, mitochondrie. **(B)** Les HOST sont striés périodiquement d'un manteau qui entraîne une légère constriction à son niveau. Echelle : 150 nm. **(C)** GRA7 est détectée par immunogold au niveau de structures vésiculaires analogues aux extrémités des HOST. Echelle : 150 nm. m, mitochondrie cellulaire ; mt, microtubule ; hcell, cellule hôte. Coppens *et al.*, 2006.

b) Le réseau de nanotubes membranaires

Dès la première heure d'invasion, le compartiment vacuolaire de *Toxoplasma* est également structuré par le RNM. L'origine et les composants tant protéiques que lipidiques de ce RNM demeurent en grande partie, inconnus. Il est tout d'abord organisé en structures multi lamellaires au niveau d'une invagination postérieure de la membrane plasmique du parasite (**Figure 31A**) puis il se déploie dans la VP ; il remplit progressivement tout l'espace entre les parasites, espace qui se réduit au fur et à mesure des endodyogénies. Le RNM persiste tout au long du développement parasitaire dans la vacuole (Sibley *et al.*, 1995) (**Figures 31 B et C**).

Le RNM constitue une structure homogène formée d'une unique membrane formant des tubules de 30 à 50 nm de diamètre et de 200-500 nm de long et faiblement décoré de particules intra-membranaires

(Magno *et al.*, 2005b ; Sibley *et al.*, 1986 ; Lemgruber *et al.*, 2007). Un petit « dot » dense aux électrons est observé au centre des tubules du RNM. La membrane de ces tubules a une épaisseur d'environ 8 nm alors que l'épaisseur de la membrane de la VP est de 13 nm (Magno *et al.*, 2005b).

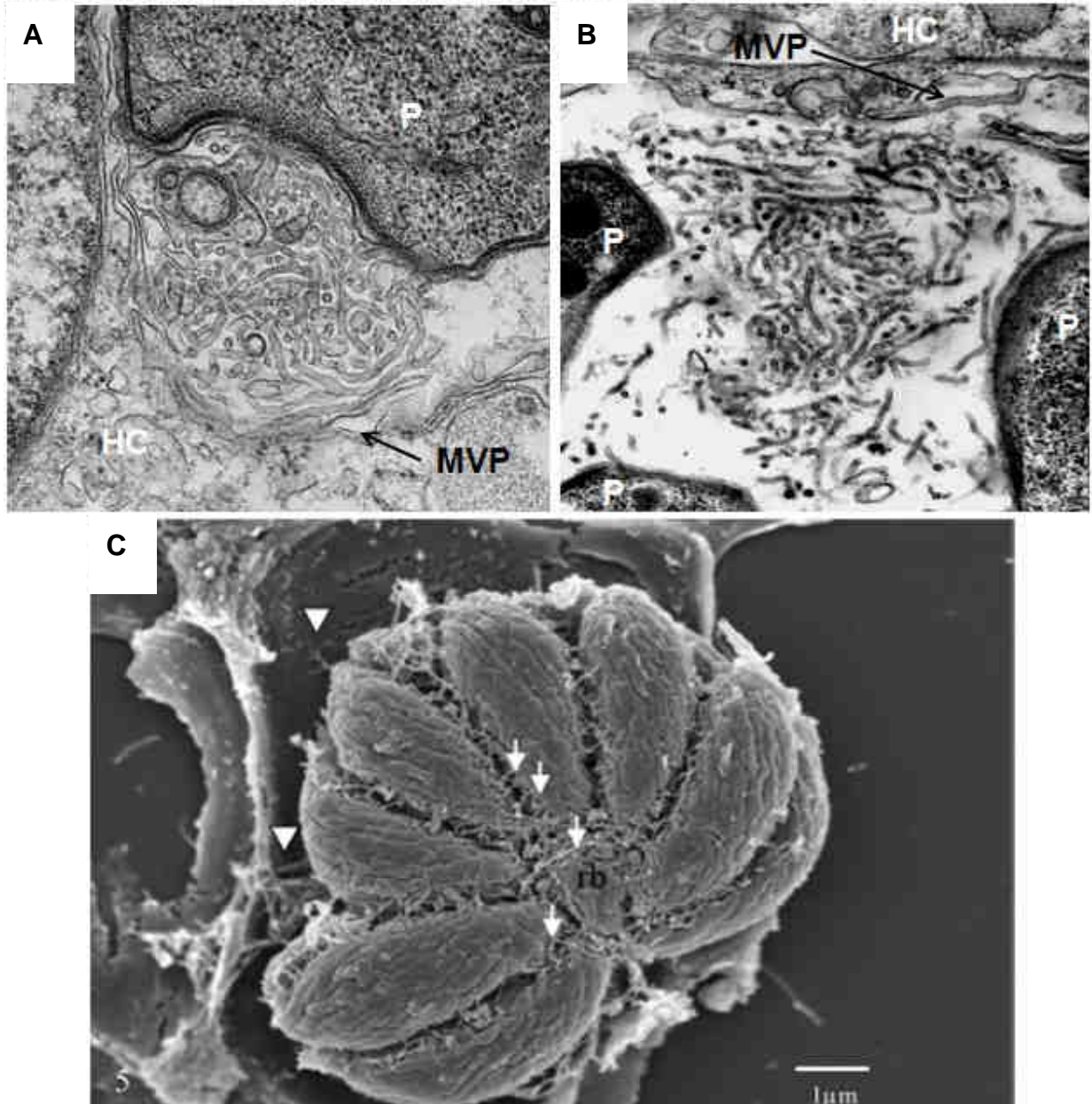


Figure 31 : Le RNM au cours du développement parasitaire. (A) Dans la première heure qui suit l'invasion, un amas de vésicules membranaires est localisé au niveau de l'invagination postérieure de la membrane du parasite (P). HC, cellule hôte. Echelle : 500 nm. Mercier *et al.*, 2002. **(B)** A partir de ce matériel vésiculaire, le RNM va se déployer dans la VP et en occuper tout l'espace. P, parasite ; HC, cellule hôte. Echelle : 500 nm. Mercier *et al.*, 2002. **(C)** 24 heures après l'invasion, le RNM connecte la MVP à la membrane des parasites (pointes de flèches). La VP contient plusieurs parasites unis *via* leur extrémité postérieure par le corps résiduel (rb) et maintenus aux autres par le RNM (flèches). Magno *et al.*, 2005b.

Après une heure d'invasion, des vésicules membranaires, sans contact direct avec le parasite, sont observées dans la VP. Le RNM permet l'ancrage du parasite à ces structures membranaires et à la MVP. Après 24 heures de multiplication parasitaire et plusieurs endodyogénies, les tachyzoïtes sont connectés au corps résiduel au niveau de leur extrémité postérieure (cf chapitre II F) et sont reliés entre eux par les tubules du RNM. Ces tubules sont abondants autour du corps résiduel et semblent renforcer son attachement aux parasites. Ils diffusent autour de la membrane plasmique parasitaire en la recouvrant partiellement. Le RNM établit des connexions entre chaque cellule fille. Pendant que la VP s'élargit en volume d'un facteur de 2^3 , les parasites se multiplient jusqu'à 2^5 en nombre. Cette importante augmentation du nombre de parasites par rapport à la relativement faible croissance du volume de la VP est potentiellement due au maintien des parasites dans la VP par le corps résiduel d'une part, et le RNM d'autre part (Magno *et al.*, 2005b) (**Figure 31**).

En entourant étroitement les parasites, le RNM pourrait jouer un rôle structural pour assurer la cohésion des parasites lors de leur division synchronisée (Muniz-Hernandez *et al.*, en préparation). Le RNM pourrait également avoir un rôle trophique : il pourrait permettre l'import de lipides et/ou d'autres nutriments du cytosol de l'hôte vers le parasite ou permettre l'export des protéines et/ou des lipides du parasite vers la MVP et/ou la cellule hôte, constituant ainsi un relais entre les vésicules d'origine cellulaire endocytées dans la VP (HOST) et la membrane parasitaire (Coppens *et al.*, 2006).

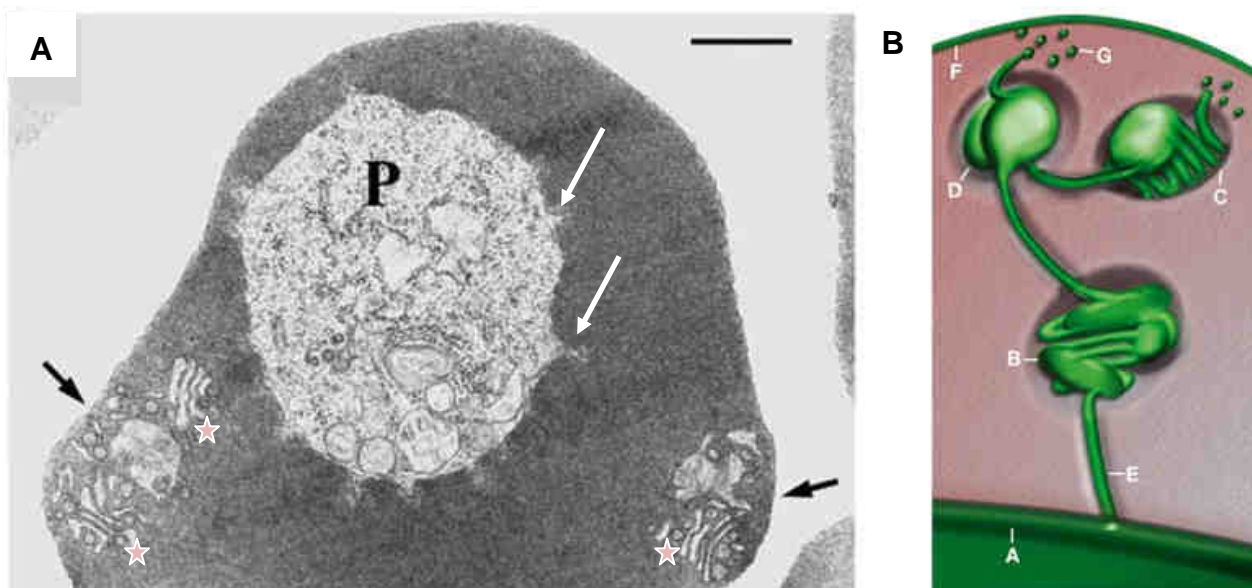


Figure 32 : Le réseau tubulovésiculaire de *Plasmodium* sp. (A) Erythrocyte infecté par un trophozoïte de *Plasmodium falciparum*. De courts tubules sont détectés dans le prolongement de la MVP (flèches blanches) et les clefs de Maurer (étoiles roses) sont visibles dans le cytoplasme du globule rouge, sous les protubérances de surface ou knobs (flèches noires). P, parasite. Echelle : 500 nm. **(B)** Modèle de transport protéique à la surface des érythrocytes infectés par *Plasmodium* sp. Le réseau tubulovésiculaire s'étend à partir de la MVP (A) et consiste en de simples tubes membranaires (E) prolongés par les sacculles membranaires des clefs de Maurer à la morphologie variée (B, C, D). De petites vésicules (G) issues des clefs de Maurer fusionnent avec la membrane de l'érythrocyte (F). Wickert *et al.*, 2003.

Associé aux HOST et aux EVP, le RNM pourrait constituer l'équivalent toxoplasmique du réseau tubulovésiculaire associé à la VP de *Plasmodium* sp. (Lanzer *et al.*, 2006 ; Przyborski *et al.*, 2003). Le réseau tubulovésiculaire est formé de deux types de projections membranaires continues dans le cytoplasme de l'érythrocyte : de courts et larges tubes qui prolongent la MVP, suivis des clefs de Maurer qui s'étendent jusqu'à la membrane plasmique de l'érythrocyte, sans toutefois s'y connecter (Lauer *et al.*, 1997 ; Haldar *et al.*, 2005) (**Figure 32B**). Le rôle du réseau tubulovésiculaire est notamment de récupérer des nutriments à partir de la cellule hôte, des composants de rafts principalement qui, initialement sur la membrane des érythrocytes, sont internalisés dans la VP en formation et/ou dans le réseau tubulovésiculaire (Lauer *et al.*, 2000). Le réseau tubulovésiculaire est aussi le compartiment de tri des protéines destinées aux structures protubérantes de la surface de l'érythrocyte (knob) et l'équivalent fonctionnel du réseau *trans*-Golgi mammifère. Il assure donc aussi l'export de protéines au delà de la MVP de *Plasmodium* sp. vers la surface du globule rouge (Cooke *et al.*, 2004 ; Van Ooij and Haldar, 2007) (**Figure 32**).

3. La vacuole parasitophore, une interface d'échange entre le parasite et la cellule hôte

La MVP constitue l'interface d'échange entre le parasite intracellulaire et le cytoplasme de la cellule hôte. Peu de choses sont connues sur son fonctionnement. En effet, les analyses moléculaires, cellulaires et biochimiques sur ce compartiment sont difficiles car jusqu'à présent, il n'a pas été possible de purifier des VP matures à partir des cellules hôtes (cf chapitre III A 1 c).

A l'intérieur de la cellule hôte, *Toxoplasma* modifie la MVP de manière à permettre la diffusion libre de petites molécules (< 1300 Da), sans spécificité de charge, au niveau de pores (Schwab *et al.*, 1994). Les protéines de GD et les protéines de rhoptries associées à la MVP (cf chapitre III C 1) pourraient être impliquées dans la formation de ces pores. La VP est donc perméable à de petits nutriments comme les ions, l'ATP, les sucres simples, les acides aminés, les bases nucléotidiques et les cofacteurs. Toutefois, le parasite nécessite d'autres nutriments qui ne peuvent passer librement au niveau de ces pores.

Toxoplasma se divise toutes les 6 à 9 heures jusqu'à l'obtention exponentielle de 64 à 256 parasites dans une seule VP (chapitre II F). La VP est donc un compartiment dynamique, qui comprend de nombreuses structures membranaires (MVP, HOST, RNM) (cf chapitre III B). Lors des divisions parasitaires, le volume de la VP augmente et les parasites requièrent d'importantes quantités de lipides. Les lipides de la VP dérivent en partie du parasite, principalement des rhoptries. Le parasite peut synthétiser suffisamment de PE mais seulement 50 % de la quantité de PS et 5-10 % de celle de PC nécessaires lors d'une division parasitaire. Il est de plus dépourvu des enzymes qui synthétisent les stérols. Il est donc auxotrophe en choline, mais aussi en cholestérol et a besoin de les récupérer chez l'hôte (Mordue *et al.*, 1999 ; Charron and Sibley, 2002 ; Coppens, 2006).

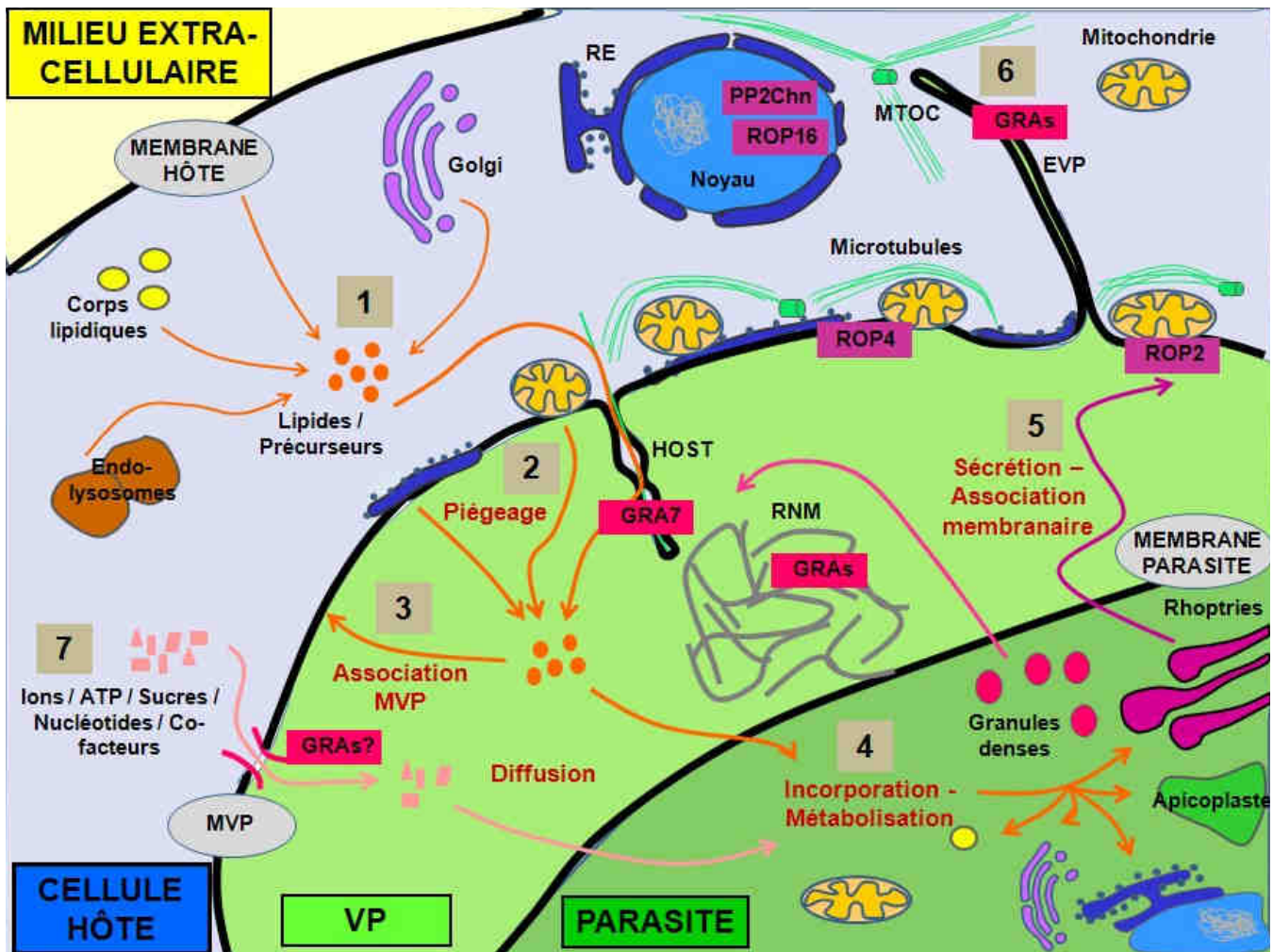


Figure 33 : La MVP, interface d'échange entre le parasite et la cellule hôte. (1) Le parasite récupère de nombreux lipides et précurseurs lipidiques depuis la membrane plasmique, les corps lipidiques, les endo-lysosomes et le Golgi de l'hôte. Ce piégeage est notamment possible grâce aux HOST et à la protéine de granules denses GRA7 associée aux HOST. **(2)** Les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE) cellulaires recrutés contre la MVP, via ROP2 pour les mitochondries, pourraient aussi constituer des sources de lipides. **(3)** Certains de ces lipides sont directement incorporés dans la MVP lors de la formation de la VP. **(4)** Lipides et précurseurs lipidiques récupérés depuis la cellule hôte sont métabolisés dans le parasite et ciblés vers les corps lipidiques, le réticulum endoplasmique/Golgi et les rhoptries. **(5)** Les lipides et protéines des rhoptries sont sécrétés dans la VP et s'associent à la MVP dont ils modifient la composition. **(6)** Certaines protéines de rhoptries sont détectées au-delà de la MVP, dans le noyau de la cellule hôte. Elles pourraient y être ciblées via les EVP qui semblent aussi être impliquées dans le recrutement des MTOC de l'hôte contre la VP. **(7)** Le parasite bénéficie aussi de petits solutés dont le poids moléculaire inférieur à 1300 Da les laisse librement diffuser au niveau de pores dans la MVP. Ces pores pourraient être constitués de protéines de granules denses (GRAs).

Ainsi, *Toxoplasma* récupère une grande variété de lipides depuis la membrane plasmique, les corps lipidiques, le Golgi et les endo-lysosomes de l'hôte : phospholipides, lipides neutres comme le cholestérol ou le ganglioside GM1 (Coppens, 2006 ; Nishikawa *et al.*, 2005 ; Charron and Sibley, 2002 ; Martin *et al.*, 2007). Plus particulièrement, le cholestérol serait récupéré depuis la voie des LDL (low-density lipoprotein),

via les HOST (Coppens *et al.*, 2006). Les autres lipides sont directement incorporés dans la MVP lors de l'invasion (Coppens and Joiner, 2003 ; Charron and Sibley, 2004). *Toxoplasma* récupère également des acides gras exogènes (Quitnat *et al.*, 2004) et malgré sa capacité à synthétiser de manière autonome des phospholipides, il acquiert à partir de l'hôte, certains précurseurs de glycérolipides tels que la sérine, l'éthanolamine ou la choline. Ces précurseurs lipidiques sont internalisés dans le parasite avant d'être métabolisés et incorporés dans des phospholipides complexes. Ils sont ensuite transloqués vers les compartiments spécifiques que constituent la membrane plasmique, le réticulum endoplasmique/Golgi, les corps lipidiques ou les rhoptries. Après sécrétion, certains de ces lipides permettent probablement la modification de la composition lipidique de la MVP (Charron and Sibley, 2002 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Bisanz *et al.*, 2006 ; Coppens, 2006).

Certains de ces lipides et d'autres sources potentielles de nutriments semblent être recrutées depuis les mitochondries ou le réticulum endoplasmique de la cellule hôte redistribués contre la MVP. L'inactivation de ROP2 qui est impliquée dans la rétention des mitochondries de l'hôte contre la MVP entraîne la formation d'une VP anormale dépourvue de marqueurs mitochondriaux cellulaires et contenant des quantités réduites de cholestérol (Nakaar *et al.*, 2003). D'autres protéines de rhoptries sont impliquées dans la récupération de nutriments depuis la cellule hôte. Comme ROP2, ROP4 permet la récupération par le parasite de la lactoferrine cellulaire (Dziadek *et al.*, 2007). ROP4 est phosphorylée au niveau de la MVP par la cellule infectée (Carey *et al.*, 2004). Ceci suggère que la communication entre le parasite et la cellule hôte est à double sens. La présence de protéines de rhoptries (ROP16 et PP2Chn) (Gilbert *et al.*, 2007 ; Dubremetz, 2007) au niveau du noyau cellulaire confirme cette hypothèse. Ces protéines pourraient être transportées dans le noyau de l'hôte *via* les EVP. Au même titre que les HOST impliqués dans le piégeage du cholestérol, le RNM pourrait lui aussi participer à cette communication cellule/parasite (**Figure 33**).

B. LES GRANULES DENSES

D'abord décrits chez les mérozoïtes de *Sarcocystis tenella*, les GD ou corps denses chez *Sarcocystis* sont des organites cytoplasmiques sphériques de 200 nm de diamètre distribués de chaque côté du noyau. Alors qu'on en retrouve peu chez *Eimeria*, *Toxoplasma* et *Neospora* en possèdent environ vingt. Chez *Sarcocystis*, les GD sont particulièrement abondants et peuvent ainsi être purifiés sur un gradient de sucrose (Dubremetz and Dissous, 1980). Chez les autres parasites, ils n'ont pas pu être purifiés.

Contrairement aux rhoptries (cf chapitre II D 4), aucun GD immature n'a jamais été observé à la sortie du réseau *trans*-Golgi de *Toxoplasma*. Les protéines sécrétées des GD suivent la voie de sécrétion classique *via* le réticulum endoplasmique puis l'appareil de Golgi et possèdent un peptide signal hydrophobe N-terminal. L'addition d'un peptide signal en position N-terminale à diverses protéines solubles suffit à assurer le ciblage de ces protéines dans les GD puis leur sécrétion dans la VP. Par contre, l'addition d'une ancre GPI cible ces mêmes protéines à la membrane plasmique *via* des vésicules de transport (Karsten *et*

al., 1998). Ce phénomène semble donc indiquer que les GD constituent la voie de sécrétion constitutive par défaut des protéines solubles.

1. Sécrétion constitutive ou sécrétion régulée ?

Un pic de sécrétion des GD est observé dans la première heure qui suit la formation de la VP (Dubremetz *et al.*, 1993 ; Carruthers and Sibley, 1997), suggérant un mécanisme de régulation de la sécrétion directement lié à la formation de la VP.

En faveur de la voie de sécrétion constitutive, la fusion de la membrane des GD avec la membrane plasmique est aidée ou accentuée par des protéines impliquées dans le transport protéique entre le réticulum endoplasmique et le Golgi : des petites GTPases de la famille des Rab, les facteurs accessoires solubles de la machinerie NSF (N-ethylmaleimide Soluble Factor), SNARE/SNAP (Soluble NSF Associated Protein SNAP) (Chaturvedi *et al.*, 1999) et ARF-1 (ADP-ribosylation factor 1) (Liendo *et al.*, 2001). De plus, la protéine Rab6 régule le transport rétrograde des protéines de GD vers le Golgi car sa surexpression empêche la sécrétion des protéines de GD solubles qui sont alors ramenées vers le Golgi et le réticulum endoplasmique (Stedman *et al.*, 2003). Toutefois, même si les protéines de GD GRA4 et GRA7 possèdent au niveau de leur queue cytoplasmique, un motif tyrosine de liaison à la protéine adaptatrice AP-1, celui-ci n'est pas reconnu par l'orthologue toxoplasmique d'AP-1 (Ngo *et al.*, 2003).

En faveur d'une sécrétion régulée, la Brefeldine A (qui bloque la sécrétion constitutive des protéines en désorganisant l'appareil de Golgi) n'a pas d'effet sur la libération des protéines stockées dans les GD (Coppens *et al.*, 1999). Chez les cellules de mammifère, l'événement régulé de fusion des granules de la matrice dense avec la membrane plasmique suit un pic du taux de calcium intracellulaire. Chez *Toxoplasma*, une stimulation par le calcium n'a aucun effet sur l'exocytose des GD (Chaturvedi *et al.*, 1999) alors qu'elle initie la sécrétion des micronèmes (Carruthers and Sibley, 1999). Par contre, le sérum inactivé par la chaleur induit la sécrétion des GD (Darcy *et al.*, 1988 ; Coppens *et al.*, 1999). Cependant, en présence de sérum délipidé, les protéines transmembranaires de GD ne sont plus sécrétées (thèse de P ; Ruffiot, Université Joseph Fourier, juillet 2007). De plus, les protéines sériques les plus communes telles que la BSA, les IgG, la transferrine et diverses cytokines ne peuvent induire la sécrétion des GD (Coppens *et al.*, 1999).

Deux mécanismes distincts pourraient donc être responsables de la sécrétion des GD en fonction de leur niveau de compaction dans les GD : les protéines périphériques, non compactées, pourraient être sécrétées selon un mécanisme constitutif, dépendant de ARF-1, au cours du développement intracellulaire (Liendo *et al.*, 2001), tandis qu'un mécanisme régulé par un mécanisme inconnu, insensible à l'ARF-1, pourrait rapidement après l'invasion, assurer la sécrétion rapide des protéines de GD, au moment où ces protéines sont requises pour constituer une VP fonctionnelle.

2. Les protéines stockées dans les granules denses présentent un haut niveau de compaction

Les GD présentent un contenu homogène et très dense aux électrons en microscopie électronique à transmission, d'où leur nom. Ils ressemblent, de par leur morphologie, aux granules impliqués dans la sécrétion régulée chez les cellules de mammifère. Chez les organismes supérieurs, la condensation des protéines dans les vésicules de sécrétion s'accompagne de changements dans le granule en voie de sécrétion tels que l'acidification ou l'augmentation de la concentration en cations bivalents tels que le calcium (Chanat and Huttner, 1991).

Chez *T. gondii*, la plupart des protéines de GD identifiées, sont prédites pour être des protéines transmembranaires de type I. Toutefois, la plupart de ces protéines sont présentes à la fois sous forme soluble et agrégée (Labruyère *et al.*, 1999). Des interactions hydrophobes entre domaines transmembranaires pourraient être responsables de la compaction de ces protéines dans les GD.

Les GD ne constituant pas un compartiment acide, l'acidification ne peut être impliquée dans la condensation des protéines de GD. Même si les GD ne constituent pas le compartiment le plus riche en calcium (contrairement aux acidocalcisomes, au réticulum endoplasmique et à la membrane plasmique ; (Moreno and Docampo, 2003 ; Arrizabalaga and Boothroyd, 2004)), le calcium pourrait malgré tout être impliqué dans l'agrégation des protéines de GD.

C. LES PROTEINES DE GRANULES DENSES



Figure 34 : Sécrétion du contenu des GD au niveau de la partie apicale du parasite (flèches). D, GD ; R, rhoptries. Echelle : 350 nm. De Souza, 2006.

INTRODUCTION - CHAPITRE III

La vacuole parasitophore et les protéines de granules denses

Nom (PM)	Domaines	Localisation dans VP	Fonction et propriétés	Référence
GRA1 (23)	2 Liaisons Ca ²⁺	Soluble, faiblement associée au RNM	Homéostasie du calcium dans VP ? Immunogène.	Cesbron-Delauw <i>et al.</i> , 1989 Supply <i>et al.</i> , 1999
GRA2 (28)	2 hélices alpha-amphipatiques	Soluble, RNM	Formation RNM. Virulence. Immunogène.	Parmley <i>et al.</i> , 1993 Mercier <i>et al.</i> , 1993 Mercier <i>et al.</i> , 1998b, 2002 Golkar <i>et al.</i> , 2007a ; 2007b
GRA3 (24)	TM, motif de rétention RE	Soluble, MVP, RNM	Virulence souches type II.	Bermudes <i>et al.</i> , 1994a Ossorio <i>et al.</i> , 1994 Henriquez <i>et al.</i> , 2005 Craver and Knoll, 2007
GRA4 (40/41)	TM, liaison ATP	Soluble, RNM	Fixation ATP/GTP ? Immunogène.	Mevelec <i>et al.</i> , 1992 ; 1998 ; 2005 Labruyère <i>et al.</i> , 1999
GRA5 (21)	TM, homologie avec GRA6	Faiblement soluble, MVP, RNM	?	Lecordier <i>et al.</i> , 1993, 1999 Mercier <i>et al.</i> , 2001
GRA6 (32)	TM, homologie avec GRA5	Soluble, RNM	Stabilise RNM. Virulence	Lecordier <i>et al.</i> , 1995 Mercier <i>et al.</i> , 2002
GRA7 (29)	TM, RGD	Soluble, HOST, RNM, MVP	Tubulation des HOST. Séquestration vésicules de l'hôte au niveau des HOST ?	Bonhomme <i>et al.</i> , 1998 Fischer <i>et al.</i> , 1998 Jacobs <i>et al.</i> , 1998 Coppens <i>et al.</i> , 2006
GRA8 (40)	TM	Soluble, MVP	?	Carey <i>et al.</i> , 2000
GRA9 (41)	1 Hélice alpha-amphipatique	Soluble, RNM	?	Nockemann <i>et al.</i> , 1998 Adjogble <i>et al.</i> , 2004
GRA10 (36)	2 TM, RGD	MVP	?	Ahn <i>et al.</i> , 2005
NTPase-I (67)	Liaison ATP	Soluble, MVP, RNM	Apyrase. Récupération purines ? Modulation de la sortie des parasites hors de la VP ? Réplication parasitaire.	Asai <i>et al.</i> , 1995 Bermudes <i>et al.</i> , 1994b Nakaar <i>et al.</i> , 1999 Silverman <i>et al.</i> , 1998
NTPase-II (67)	Liaison ATP	Soluble, MVP, RNM	Apyrase. Récupération purines ? Modulation de la sortie des parasites hors de la VP ? Réplication parasitaire.	Asai <i>et al.</i> , 1995 Bermudes <i>et al.</i> , 1994b Nakaar <i>et al.</i> , 1999 Silverman <i>et al.</i> , 1998
Cy-18 (18)	PPIase	?	Isomérase ? Immunophiline.	High <i>et al.</i> , 1994
PI-1 (30)	Kazal inhibiteur	Soluble	Protection contre enzymes gastriques ou parasitaires ?	Pszenny <i>et al.</i> , 2000 ; 2002 Morris <i>et al.</i> , 2002
PI-2 (25)	Kazal inhibiteur	Soluble	Protection contre enzymes gastriques ou parasitaires ?	Morris and Carruthers, 2003
14-3-3 (36)	?	?	Immunité de l'hôte ?	Assossou <i>et al.</i> , 2003 ; 2004
CPC1 (31)	Cathepsine C	?	Protéase dans VP. Invasion. Prolifération intracellulaire.	Que <i>et al.</i> , 2007
CPC2 (41)	Cathepsine C	?	Protéase dans VP. Invasion. Prolifération intracellulaire.	Que <i>et al.</i> , 2007
? (36 ou 38)	?	?	Phosphatase	Metsis <i>et al.</i> , 1995

Table 1 : Les protéines de GD décrites chez *T. gondii*. PM, poids moléculaire en kDa ; TM, domaine transmembranaire ; RE, réticulum endoplasmique ; PPIase, peptidyl-prolyl *cis-trans* isomérase.

La sécrétion des protéines de GD a lieu au niveau de la partie apicale du parasite après fusion de la membrane du GD avec la membrane plasmique, probablement au niveau de la jonction entre les deux plaques de l'IMC (**Figure 34**).

Excepté quelques protéines présentant une activité enzymatique, la majorité des protéines de GD n'ont pas d'homologie avec des protéines de fonction connue. Selon la nomenclature proposée par L.D. Sibley, ces protéines sont appelées protéines GRA (Sibley *et al.*, 1991). Ainsi, parmi les protéines de GD, on peut définir deux groupes (**Table 1**) : les protéines GRA qui n'ont pas de fonction connue et qui ont un profil commun ; les protéines qui ont des homologies avec des protéines déjà caractérisées comme les cyclophilines ou d'autres qui possèdent une activité enzymatique, les NTPases, les inhibiteurs de sérine protéase et les cathepsines.

1. Les protéines GRA

a) Caractérisation moléculaire des protéines GRA

Les gènes de neuf protéines GRA (GRA1-9) ont été clonés et séquencés. Ces protéines sont stockées dans les mêmes GD. Récemment, une nouvelle protéine qui pourrait être une protéine GRA, « GRA10 », a été identifiée (Ahn *et al.*, 2005). Toutefois, sa localisation dans les GD est à confirmer.

✓ Peptide signal N-Terminal

Les protéines GRA forment un groupe de petites protéines de 21 à 41 kDa avec une séquence N-terminale hydrophobe caractéristique d'un peptide signal. Le site prédit de clivage est environ entre le 19^{ème} et 27^{ème} acide aminé et suit la règle décrite pour l'enzyme signal peptidase de type I (-3, -1, Stoud and Walter, 1999). La seule exception à cette règle est la protéine GRA6 qui possède un long peptide signal. La séquence de GRA6 mature étant inconnue, on ne peut exclure une absence de clivage de ce peptide signal atypique. Cependant, le long peptide signal de GRA6 est fonctionnel et permet le ciblage d'une protéine indicatrice dans la VP, *via* les GD (Balbeur and Cesbron-Delauw, non publié). Le peptide signal N-Terminal des protéines GRA est responsable du ciblage des protéines solubles vers la voie de sécrétion des GD (Karsten *et al.*, 1998).

✓ Domaines hydrophobes

A l'exception de GRA1, les protéines GRA contiennent toutes, des régions hydrophobes dans leur région centrale, encadrées par deux domaines hydrophiles. Ces domaines hydrophobes centraux sont soit des segments transmembranaires (GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8 et « GRA10 »), soit des hélices alpha-amphipatiques (GRA2 et GRA9). Ces domaines hydrophobes confèrent une propriété membranaire aux protéines GRA sécrétées dans la VP (Henriquez *et al.*, 2005 ; Mercier *et al.*, 2005 ; Ahn *et al.*, 2005). Toutefois, GRA4 fait exception à la règle puisqu'elle semble être associée aux membranes de la VP par des interactions protéine-protéine (Labruyère *et al.*, 1999). Peu d'études ont cherché à identifier les

domaines potentiellement impliqués dans le tri de ces protéines vers les GD. Toutefois, le remplacement du domaine hydrophobe central de GRA4 par celui d'autres protéines membranaires montre que la sécrétion des protéines de GD semble dépendre de la longueur de leur domaine transmembranaire (Karsten *et al.*, 2004).

✓ **Domaines particuliers**

L'analyse des séquences en acides aminés et la recherche de motifs spécifiques a permis d'identifier deux « EF-Hands » dans GRA1 (acides aminés 149-180 et 197-223) qui se sont avérées liées aux propriétés de liaison du calcium de la protéine (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989). Un motif spécifique de ciblage dans la membrane du réticulum endoplasmique est détecté au niveau de la partie C-terminale de GRA3 (Henriquez *et al.*, 2005). Toutefois, chez les parasites délétés de GRA3, le réticulum endoplasmique de l'hôte reste recruté contre la VP comme chez les parasites sauvages (Craver and Knoll, 2007). GRA4 possède une boucle P riche en glycine qui pourrait être impliquée dans la fixation de l'ATP/GTP (acides aminés 307-314). GRA7 et « GRA10 » comportent un motif d'adhésion RGD (acides aminés 170-172 et 150-152, respectivement) (Mercier *et al.*, 2005 ; Ahn *et al.*, 2005) (**Figure 35**). GRA7 pourrait également posséder un domaine de liaison aux phosphoinositides (PIs). En effet, en utilisant la technique de « lipides-overlay », Coppens *et al.* ont montré que GRA7 interagit avec les lipides chargés tels que le PA, les sulfatides, le PI et divers dérivés phosphorylés du PI. De plus, GRA7 se lie fortement aux liposomes composés de 10 % de PA, de PI ou de dérivés mono- ou di-phosphatés du PI, notamment le PI(4,5)P₂ (Coppens *et al.*, 2006).

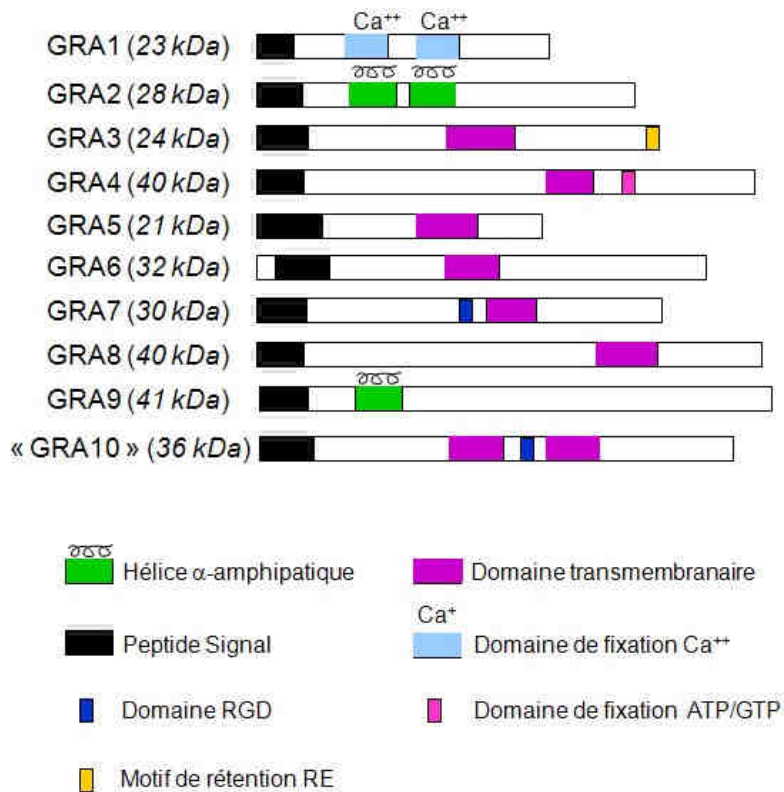


Figure 35 : Les différents domaines des protéines GRA de *Toxoplasma*. RE, réticulum endoplasmique. D'après Mercier *et al.*, 2005.

✓ **Modifications post-traductionnelles**

Une des caractéristiques communes aux protéines GRA est la différence observée entre leur poids moléculaire théorique, calculé à partir de la séquence en acides aminés, et le poids moléculaire de la protéine native, estimé par SDS-PAGE à partir d'un lysat de tachyzoïtes. L'abondance relative de résidus proline dans la séquence des protéines GRA pourrait influencer sur leur différence de poids moléculaire. Cette différence suggère également l'existence de modifications post-traductionnelles. De nombreux sites de N- et O-glycosylation sont prédits dans la séquence en acides aminés des protéines GRA mais peu de protéines GRA ont été détectées comme étant réellement glycosylées (GRA2, Zinecker *et al.*, 1998 ; GRA4, Achbarou *et al.*, 1991). Malgré le fait que les signaux de N-glycosylation soient reconnus par la machinerie de *Toxoplasma* (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993), les seuls glycanes détectés sur les protéines GRA sont des O-glycanes. Les phosphorylations peuvent aussi contribuer à cette différence entre le poids moléculaire apparent et le poids moléculaire théorique des protéines GRA. Des sites potentiels de phosphorylation sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine sont prédits dans leur séquence mais seules GRA2 (Mercier and Sibley, non publié) et GRA6 (Labruyère *et al.*, 1999) ont été décrites comme étant phosphorylées lors de leur sécrétion dans la VP, alors que la phosphorylation de GRA9 a lieu dans le cytoplasme du parasite (Adjogble *et al.*, non publié) et que GRA1 et GRA5 ne sont pas marquées par le [³²P]-ATP (Mercier and Sibley, non publié). Les kinases impliquées dans ces modifications n'ont pas été identifiées mais l'implication de la protéine kinase C et/ou de la caséine kinase II est soupçonnée (Mercier *et al.*, 2005). Des sites de sumoylation potentielle sont également prédits dans la séquence des protéines GRA1, GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9.

b) Régulation de l'expression des gènes des protéines GRA

Très représentés dans les dbESTs, les ARNm codant pour GRA1, GRA2, GRA6 et GRA7 sont particulièrement abondants (Ajioka *et al.*, 1998 ; Kissinger *et al.*, 2003). Les gènes *GRA* sont uniques dans le génome haploïde du tachyzoïte et non regroupés. *GRA2*, *GRA3* et *GRA6* sont localisés sur le même chromosome X mais éloignés les uns des autres. *GRA1* et *GRA7* sont sur les chromosomes liés à la virulence (VIII et VII respectivement) (Howe *et al.*, 1996 ; Su *et al.*, 2002). Les gènes de *GRA2* et *GRA9* possèdent un intron unique. Il n'est pas rare de trouver plusieurs codons ATG initiateurs potentiels de la traduction mais l'alignement des séquences N-terminales des *GRA* montre que l'ATG réellement utilisé pour la traduction des gènes suit les règles de Kozacs (Seeber, 1997). De longues régions 5' non transcrites de plusieurs centaines de paires de bases et riches en A/T sont décrites. Le site de polyadénylation est aussi localisé plusieurs centaines de paires de bases après le codon STOP (Mercier *et al.*, 2005).

Peu d'études ont été réalisées sur le contrôle de l'expression des gènes *GRA*. Un motif heptanucléotidique commun (WGAGACG) constitue l'élément minimal fonctionnel conduisant à la transcription. Il est identifié en amont des gènes *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* et *GRA6*. Ce motif heptanucléotidique fonctionne d'une manière indépendante de l'orientation et par effet additionnel, comme les motifs riches en G/C qui conduisent l'expression dans les cellules de mammifère (Mercier *et al.*, 1996). Les analyses *in silico* ont montré la

présence de 1 à 3 motifs dans les 300 paires de bases localisées en amont de l'ATG de tous les gènes *GRA* à l'exception de *GRA9* où ce motif est localisé dans les 40-50 paires de bases en amont de l'ATG (Mercier *et al.*, 2005). Quoique fréquemment observé, ce motif ne semble pas absolument nécessaire puisque l'expression des NTPases est indépendante de ce motif (Nakaar *et al.*, 1999).

c) Le polymorphisme des gènes *GRA* chez les différentes souches parasitaires

Peu de marqueurs sont utilisés pour classer les différentes souches parasitaires en fonction des trois groupes I, II et III (Howe and Sibley, 1995). Les variations de polymorphisme facilitent la distinction des différents isolats et la compréhension de leur variation de virulence. Dans les gènes des protéines de GD, on répertorie deux allèles de *GRA4* (Meisel *et al.*, 1996) et neuf allèles de *GRA6*, avec une délétion spécifique dans la partie C-terminale de *GRA6* dans les isolats non virulents (Fazaeli *et al.*, 2000). Un peptide, correspondant au domaine C-terminal de *GRA6*, et réagissant seulement avec le sérum des souris infectées par des souches de type I ou III, peut être utilisé avec des peptides dérivés de *GRA3*, *GRA7* et *SAG2*, pour discriminer les isolats de type II des autres groupes chez la souris (Kong *et al.*, 2003).

d) Implication des protéines *GRA* dans la virulence du parasite

L'implication de certaines protéines *GRA* dans la virulence parasitaire a été observée après l'annulation de leur expression. Ainsi, alors que 100% des souris infectées par la souche sauvage meurent en 2 semaines, 30 à 60% des souris infectées par les souches de type I délétées de *GRA2* et/ou *GRA6* survivent à l'infection aiguë et développent une infection chronique caractérisée par la présence de structures kystiques dans leur cerveau (Mercier *et al.*, 1998b ; Mercier *et al.*, résultats non publiés) (**Figure 36**). De plus, les souris SCID (qui n'ont pas de lymphocytes et qui sont donc incapables de développer une réponse immunitaire spécifique normale) ont une espérance de vie prolongée lorsqu'elles sont infectées par la souche Δ *GRA2* plutôt que par la souche sauvage (Mercier *et al.*, résultats non publiés). Ceci suggère que les protéines *GRA2* et *GRA6* jouent un rôle immunomodulateur au cours des premières heures / jours de l'infection parasitaire (Mercier *et al.*, 2007).

De la même manière, le rôle de *GRA3* dans la virulence des souches parasitaires de type II a été analysé : les souris survivent à l'infection par la souche Δ *GRA3*, même lorsqu'elles sont infectées avec une dose de parasites quatre fois supérieure à celle nécessaire pour tuer la moitié des souris infectées par la souche sauvage. *GRA3* joue donc un rôle dans l'infection aiguë des souches de type II (Craver and Knoll, 2007).

Après de nombreux passages, les souches parasitaires de type I en culture *in vitro* deviennent moins virulentes. Cette atténuation de virulence semble se traduire par la diminution de l'expression de *GRA7* (Neudeck *et al.*, 2002) et potentiellement d'autres protéines sécrétées (Nischik *et al.*, 2001). *GRA7* pourrait donc aussi être impliquée dans la virulence parasitaire. Cependant, la culture de parasites non soumis aux

pressions de sélections classiques *in vivo* pourrait aussi expliquer à elle seule, cette atténuation de virulence.

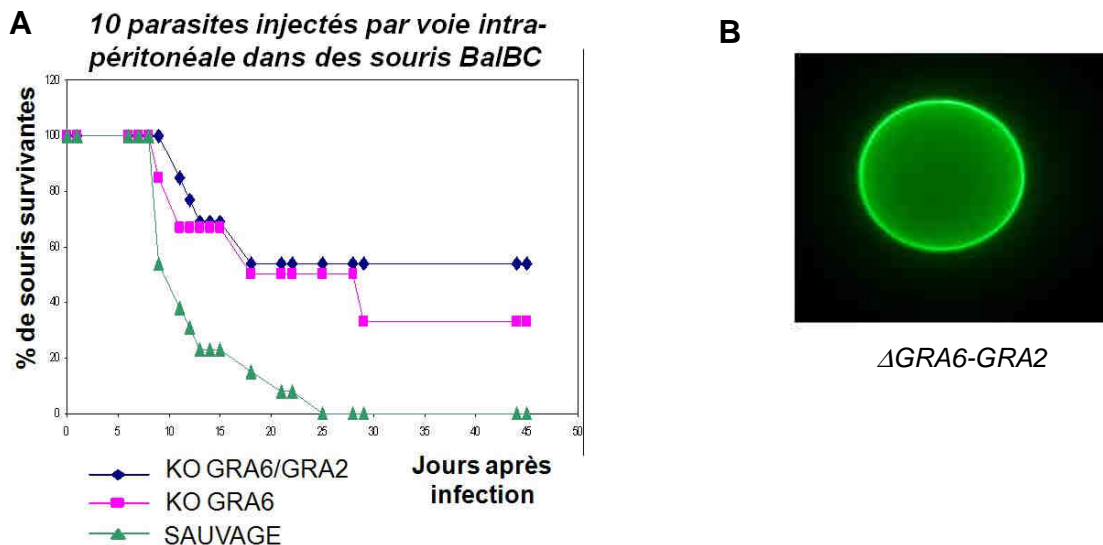


Figure 36 : Virulence des souches parasitaires Δ GRA6 et Δ GRA6-GRA2 chez la souris. (A) La délétion des gènes *GRA2* et/ou *GRA6* permet la survie de 30 à 60% des souris infectées. **(B)** L'infection chronique développée par les souris survivantes se caractérise par la présence de kystes dans leur cerveau. (Mercier *et al.*, résultats non publiés).

e) Les protéines GRA et l'immunité

La plupart des études réalisées afin de définir le rôle des protéines de GD dans la réponse immunitaire utilisent un mélange d'antigènes tel qu'un extrait soluble de tachyzoïtes (STAGs, Soluble Tachyzoite Antigen) (Hakim *et al.*, 1991) ou les antigènes excrétés et obtenus après induction de la sécrétion parasitaire par le sérum (ESAs, Excreted-Secreted Antigens). Cette préparation antigénique est en effet enrichie en protéines de GD (Darcy *et al.*, 1988). Deux protéines STAGs, la cyclophiline Cy-18 et la profiline, contrôlent la production et la sécrétion de l'IL-12 par les DC murines, lors du premier jour d'infection, *via* le recrutement du récepteur TLR11 et du récepteur aux chimokines CCR5 (Aliberti *et al.*, 2003 ; Yarovinsky *et al.*, 2005). De plus, les ESAs de *Toxoplasma*, *via* leur liaison à CCR5, contrôlent le recrutement des DC immatures chez l'homme (Diana *et al.*, 2005). Plus précisément, des peptides de GRA5 sont capables d'induire la migration des DC *in vitro*. Cet effet est encore plus marqué avec des peptides de GRA5 de type II (Cesbron-Delauw *et al.*, résultats non publiés) (cf chapitre I F). Les protéines GRA pourraient donc être des immunorégulateurs importants de la première phase de l'infection toxoplasmique (Mercier *et al.*, 2007).

Au début de l'infection, les ESAs induisent une réponse anticorps protectrice chez les souris, les rats et chez l'homme (Darcy *et al.*, 1988 ; Decoster *et al.*, 1988) ainsi qu'une réponse cellulaire T protectrice surtout étudiée chez les rats (Duquesne *et al.*, 1990 ; Zenner *et al.*, 1999). Plusieurs études soulignent l'immunogénicité importante de certaines protéines GRA : GRA1 (Supply *et al.*, 1999), GRA2 (Golkar *et al.*, 2007b), GRA4 (Mévelec *et al.*, 1992 ; Chardes *et al.*, 1993 ; Reichmann *et al.*, 1997). De plus, les sérums

de souris atteintes d'une infection toxoplasmique aiguë induisent une forte réponse contre les antigènes de GRA6 et GRA7 (Gatkowska *et al.*, 2006). La fraction des STAGs entre 26 et 40 kDa ainsi que les protéines recombinantes GRA1, GRA6 et GRA7 induisent la production des cellules régulatrices T CD4+ CD25+ chez les femmes enceintes (Fatoohi *et al.*, 2004). Les cellules T CD4+ CD25+ seraient impliquées dans la protection du fœtus en cas de primo-infection au cours de la grossesse (Fatoohi *et al.*, 2002). Les ESAs, et plus particulièrement GRA2, initient la production de cytokines spécifiques de la voie Th0 au cours de la phase chronique de la toxoplasmose par les cellules T CD4+ : production d'IFN- γ et d'IL-4 (Prigione *et al.*, 2000).

f) L'utilisation des protéines GRA dans les tests diagnostics et les stratégies vaccinales

A cause de leur importante immunogénicité, les protéines de GD pourraient être utilisées dans les tests diagnostics basés sur l'utilisation de protéines recombinantes. De nombreuses combinaisons d'antigènes sécrétés et/ou les antigènes de surface produits sous forme de protéines recombinantes en bactéries ont été testées (Redlich and Muller, 1998 ; Jacobs *et al.*, 1999 ; Lecordier *et al.*, 2000 ; Aubert *et al.*, 2000 ; Ferrandiz *et al.*, 2004 ; Pietkiewicz *et al.*, 2004 ; Golkar *et al.*, 2007b). La combinaison de GRA3 et GRA7 ou GRA1, GRA7 et SAG1 dans des tests d'avidité des IgG permet la détection d'au moins 85 % des sérums positifs (Beghetto *et al.*, 2003 ; Pietkiewicz *et al.*, 2007). Lors du test de onze antigènes comprenant GRA4, GRA6, GRA7 et GRA8, il a été montré que les IgG de faible avidité reconnaissent GRA7 et GRA8 avant de reconnaître la protéine cytoplasmique MAG1 et éventuellement la protéine de surface SAG1 (Pfrepper *et al.*, 2005). Par contre, les IgG de haute avidité, caractéristiques d'une infection chronique, reconnaissent SAG1 et GRA7 mais ni ROP1, ni GRA8. La protéine GRA2 s'avère être un très bon marqueur de la phase aiguë de l'infection (Golkar *et al.*, 2007a). Les protéines de GD pourraient, aux vues de ces résultats, être incluses et commercialisées dans des kits de diagnostic toxoplasmique (Mercier *et al.*, 2007).

L'immunisation par des protéines de GD (sous forme native ou recombinantes) telles que GRA1, GRA2 ou GRA4 (Supply *et al.*, 1999 ; Sharma *et al.*, 1984 ; Brinkmann *et al.*, 1993 ; Cesbron-Delauw *et al.*, 1996 ; Golkar *et al.*, 2007b ; Mevelec *et al.* 1998 ; Martin *et al.*, 2004) protège les souris de manière significative contre l'infection létale par *Toxoplasma* et réduit la transmission congénitale chez le rat (Zenner *et al.*, 1999). Les vaccins à ADN permettant l'expression de GRA1, GRA7 et ROP2 induisent une forte réponse anticorps et réduisent le taux de kystes cérébraux produits après infection par la souche virulente IPB-G (Vercammen *et al.*, 2000). L'immunisation à l'aide de plasmides ADN codants pour GRA1 favorise le développement de la réponse cellule T CD8+ cytotoxique ainsi que la réponse cellule T CD4+ productrice d'IFN- γ (Scorza *et al.*, 2003). L'ADN nu de GRA4 induit une protection partielle contre les infections non létales (Desolme *et al.*, 2000). Certaines protéines GRA pourraient donc constituer de bons candidats dans la recherche d'un vaccin contre l'infection toxoplasmique. Toutefois, leur effet protecteur n'est pas total et semble devoir être combiné à celui d'autres candidats. Ainsi, la combinaison de l'ADN codant pour GMCSF

(qui facilite le recrutement et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes) et une version mutée des gènes *SAG1* et *GRA4* pourrait constituer un candidat vaccinal très prometteur (Mevelec *et al.*, 2005).

2. Les autres protéines de granules denses

Plusieurs protéines ayant une activité enzymatique ou présentant une homologie avec des protéines de fonction connue ont été décrites dans les GD. Parmi ces protéines, on trouve deux isoformes d'inhibiteur à sérine protéase, deux isoformes de Nucléoside Tri-Phosphatase (NTPases), une cyclophiline, une protéine 14.3.3 (protéine ubiquitaire impliquée dans le métabolisme des cellules eucaryotes) et deux cathepsines C (Mercier *et al.*, 2005 ; Que *et al.*, 2007). Une autre protéine encore non identifiée et possédant une activité phosphatase a également été localisée dans les GD (Metsis *et al.*, 1995).

a) Les cyclophilines

Chez les cellules eucaryotes, les cyclophilines sont souvent considérées comme des immunophilines et sont impliquées dans la réponse immunitaire (cf chapitre I F). Elles possèdent également une activité isomérase qui permet le repliement des protéines riches en résidus proline.

Deux gènes codant pour les cyclophilines (*Cy-18* et *Cy-20*) sont retrouvés chez *Toxoplasma* mais un seul, *Cy-18*, code pour une protéine localisée dans les GD et présentant un peptide signal qui cible la protéine dans la VP (High *et al.*, 1994).

Les cyclophilines sont hautement conservées et ubiquitaires chez tous les organismes étudiés. Identifiées au départ comme des protéines cytoplasmiques capables de se lier à la drogue immunosuppressive cyclosporine A, les cyclophilines sont associées à une activité isomérase peptidyl-prolyl *cis/trans in vitro* (PPlase ou rotamase). *In vivo*, les cyclophilines ont tout d'abord été impliquées dans la conformation des protéines et sont aujourd'hui impliquées dans la médiation des interactions protéine-protéine dans des complexes protéiques. Leurs sites actifs se lient spécifiquement aux séquences peptidiques contenant des prolines (Galat, 2003). Elles pourraient donc aider à la conformation des protéines riches en proline comme *GRA4*, *GRA8* ou *GRA10* afin de faciliter leur trafic (Carey *et al.*, 2000).

b) Les NTPases

Les NTPases sont des apyrases très abondantes (1-2 % de la quantité protéique totale de *Toxoplasma*) (Stedman and Joiner, 1999 ; Asai *et al.*, 1983, 1995 ; Nakaar *et al.*, 1999). Deux isoformes d'hydrolase nucléoside triphosphate NTPase-I et NTPase-II, légèrement différentes au niveau génétique (97 % d'identité) sont décrites chez les tachyzoïtes de *Toxoplasma* (Asai *et al.*, 1983, 1995 ; Bermudes *et al.*, 1994b). Elles proviennent de trois gènes répétés en tandem (*NTP1*, 2 et 3) dont l'un (*NTP2*) ne semble pas permettre de synthèse protéique. Le gène codant pour NTPase-II (*NTP1*) est présent dans toutes les souches de *T. gondii* alors que le gène codant pour NTPase-I (*NTP3*) n'est présent que dans les souches

virulentes (Bermudes *et al.*, 1994b ; Asai *et al.*, 1995). NTPase-I et NTPase-II possèdent un peptide signal N-terminal qui les cible vers la voie de sécrétion et trois domaines hydrophobes dont seul le dernier est suffisamment important pour correspondre à une région transmembranaire. Elles sont majoritairement solubles dans la VP et faiblement associées au RNM et à la MVP. Ces deux apyrases possèdent également un domaine partiel de liaison de l'ATP : une boucle riche en glycine, caractéristique des protéines liant l'ATP, et un domaine liant le β -phosphate retrouvé chez les membres de la famille hexokinase-actine-HSP70 (Bermudes *et al.*, 1994b).

NTPase-I et NTPase-II hydrolysent une variété de nucléosides triphosphates : NTPase-I est uniquement et faiblement active contre les nucléosides di-phosphates comme l'ADP alors que NTPase-II possède des activités équivalentes contre les nucléosides di- et tri-phosphates (Asai *et al.*, 1995). L'activation des NTPases requiert la présence de di-thiols (Asai *et al.*, 1983 ; Bermudes *et al.*, 1994b). La réduction du taux de NTPase par l'utilisation d'ARN anti-sens montre que cette inhibition s'accompagne d'une diminution de la capacité de répllication des parasites. Ceci suggère donc que les NTPases pourraient être impliquées *in vivo*, dans plusieurs fonctions essentielles au parasite (Nakaar *et al.*, 1999).

La présence d'un pore dans la membrane de la VP (Schwab *et al.*, 1994) pourrait faciliter l'entrée depuis le cytoplasme de la cellule hôte dans la VP de petits nutriments, comme l'ATP, vital pour le parasite. *Toxoplasma*, comme les autres *Apicomplexa*, est auxotrophe pour les purines. Les NTPases pourraient donc être utilisées par le parasite dans le but de récupérer des purines depuis la cellule hôte. Elles pourraient ainsi permettre la dégradation de l'ATP en ADP puis en AMP et enfin, en adénosine qui pourraient alors être transportés au delà de la membrane plasmique du parasite *via* des transporteurs d'adénosine de faible affinité (Stedman and Joiner, 1999). Toutefois, la régulation fine des NTPases dans la VP est nécessaire afin d'éviter la déplétion rapide du stock d'ATP vacuolaire, ce qui conduirait à la sortie prématurée du parasite de la VP (Silverman *et al.*, 1998).

c) Les inhibiteurs de sérine protéase

Les GD de *Toxoplasma* contiennent des inhibiteurs de sérine protéase : PI-1 et PI-2. Ces deux protéines sont exprimées chez tous les stades parasitaires. Elles possèdent un peptide signal N-terminal et trois paires de résidus cystéine qui permettent de les classer parmi les inhibiteurs de la famille Kazal. Une fois les ponts disulfures formés, ces protéines adoptent une structure rigide qui permet l'exposition de leur site actif. PI-1 et PI-2 sont détectées sous forme soluble dans la VP après l'invasion de la cellule hôte et dans les produits de sécrétion parasitaire. PI-1 est un inhibiteur à large spectre capable de neutraliser *in vitro* la trypsine et la chymotrypsine, enzymes protéolytiques du petit intestin, et l'élastase qui est produite par les neutrophiles recrutés sur les sites d'infection. Par contre, PI-2 est spécifique de la trypsine (Morris and Carruthers, 2003). Actives contre des enzymes digestives, PI-1 et PI-2 pourraient être libérées dans l'environnement extracellulaire lors de la lyse de la cellule hôte, ce qui protégerait le parasite des protéases lorsqu'il traverse l'espace gastro-intestinal juste après l'infection. Elles pourraient également protéger le parasite des protéases qui pourraient entrer dans la VP lors de l'invasion ou moduler l'action des protéases

sécrétées par le parasite dans la VP (Pszenny *et al.*, 2000, 2002 ; Morris *et al.*, 2002 ; Morris and Carruthers, 2003).

d) Les cathepsines

Deux cathepsines C, CPC1 et CPC2, localisées dans les GD et sécrétées dans la VP ont été récemment décrites. Les cathepsines C sont des protéases à cystéine de la famille papaïne qui incluent les cathepsines B, L, K, H et S. CPC1 et CPC2 possèdent un peptide signal N-terminal suivi d'une pro-région à deux domaines qui est clivée au niveau du domaine le plus N-terminal, et d'une région catalytique composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. Ces deux cathepsines C ne sont synthétisées que chez les tachyzoïtes et semblent donc régulées négativement chez les bradyzoïtes. Contrairement aux endopeptidases de la famille papaïne, CPC1 et CPC2 possèdent une activité exopeptidase et clivent les dipeptides préférentiellement composés d'un résidu basique en pénultième position de l'extrémité N-terminale libre des protéines et/ou peptides de la VP. Chez les parasites délétés de CPC1, la fonction de CPC2 peut se substituer à celle de CPC1. L'inhibition de l'activité de CPC1 et CPC2 s'accompagne d'une diminution de l'invasion, de la croissance et de la prolifération intracellulaire des parasites (Que *et al.*, 2007). Les substrats physiologiques de ces protéases restent actuellement inconnus ainsi que leur lieu d'activité (GD et/ou VP).

e) Les protéines 14-3-3

Les protéines 14-3-3 constituent une famille de protéines ubiquitaires chez les eucaryotes. Elles sont impliquées dans la transduction de signal, le contrôle du cycle cellulaire, le transport vésiculaire, l'apoptose, les réponses aux facteurs de croissance et l'oncogenèse. Deux isoformes de la protéine 14-3-3 ont été décrites chez les tachyzoïtes de *Toxoplasma* : une isoforme de 31 kDa associée aux rafts dans le parasite et une isoforme de 36 kDa associée aux GD, aux membranes et également localisée dans le cytoplasme parasitaire. Cette dernière isoforme de 36 kDa est sécrétée dans la VP et détectée dans les produits de sécrétion parasitaire. Une importante immunoréactivité est observée entre cette isoforme de 14-3-3 et les sérums humains récupérés lors d'infection toxoplasmique aiguë. L'isoforme de 36 kDa de 14-3-3 pourrait ainsi être impliquée dans l'immunité de l'hôte (Assossou *et al.*, 2003 ; 2004)

3. L'association membranaire post-sécrétoire des protéines GRA

Deux types de protéines ont été détectés jusqu'à présent dans la VP : les protéines de rhoptries associées à la MVP et les protéines de GD. L'analyse des compartiments subcellulaires du parasite et de la VP a montré que les protéines GRA sont stockées dans les GD à la fois sous formes solubles et agrégées (Sibley *et al.*, 1995 ; Labruyère *et al.*, 1999). Aucune des protéines GRA n'a été vue associée aux

membranes des GD. Par contre, elles sont détectées dans la matrice des GD. Elles sont ensuite secrétées dans la VP sous forme soluble à 100 000 g (Lecordier *et al.*, 1999 ; Adjogble *et al.*, 2004). Puis, à l'exception de GRA1, PI-1, PI-2, NTPase-I et NTPase-II qui demeurent soluble dans la matrice vacuolaire (Sibley *et al.*, 1994, 1995 ; Pszeny *et al.*, 2000 ; 2002 ; Morris and Carruthers, 2003 ; Bermudes *et al.*, 1994b), les protéines de GD s'associent spécifiquement aux différents systèmes membranaires de la VP.

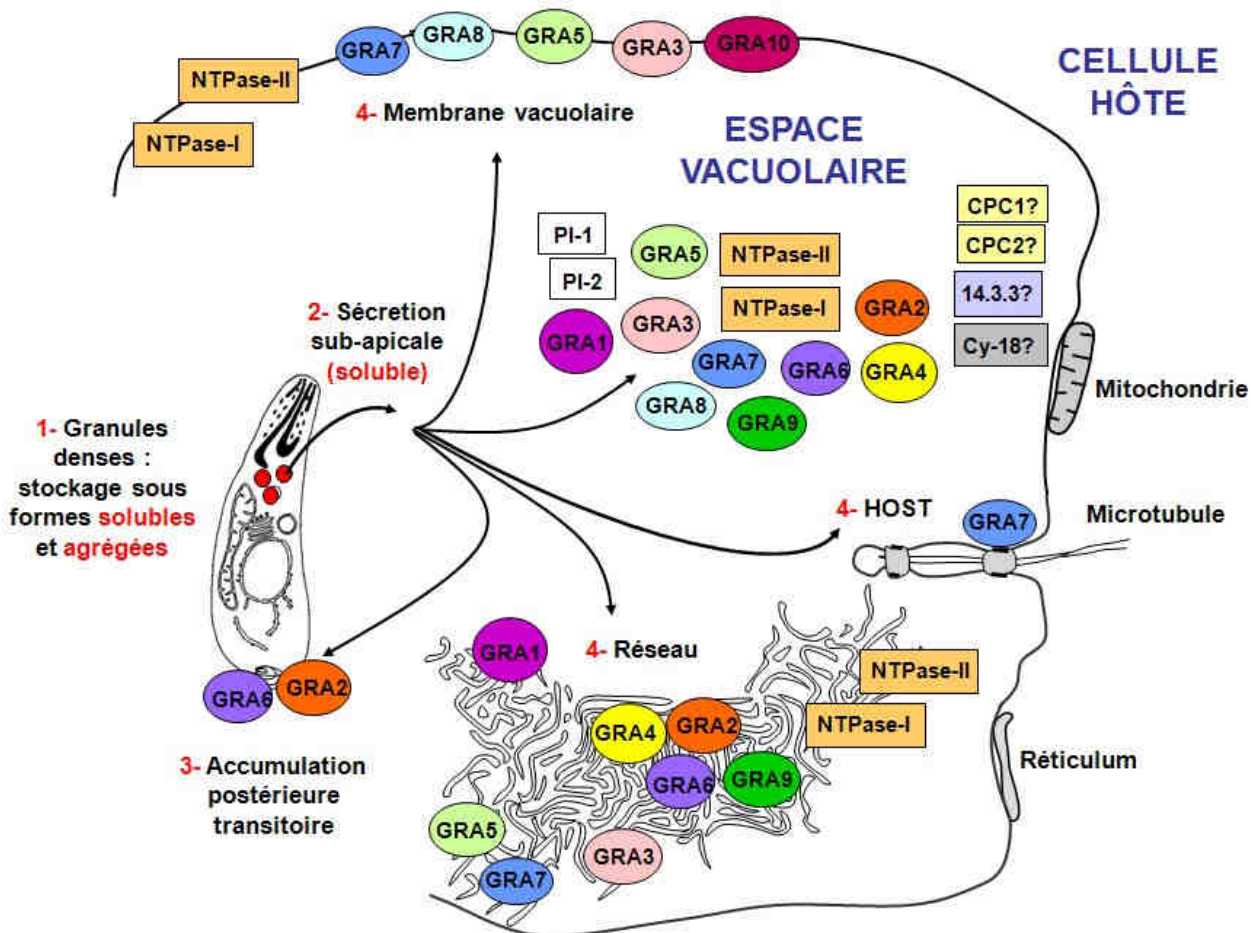


Figure 37 : Ciblage spécifique des protéines de GD dans la VP du tachyzoïte. Dans le parasite, les protéines de GD sont stockées dans les mêmes GD, à la fois sous forme soluble et agrégée. Lors de la première heure qui suit l'invasion, elles sont secrétées sous forme soluble à 100 000 g dans la VP, au niveau de la partie sub apicale du parasite. GRA2 et GRA6 présentent la particularité de s'accumuler de manière transitoire à la partie postérieure du parasite, au niveau de vésicules à partir desquelles va se constituer le RNM. Dans la vacuole mature, GRA3, GRA5, GRA7, GRA8, « GRA10 » et une fraction des NTPase-I et II sont associées au niveau de la MVP. GRA7 est également détectée au niveau des HOST. GRA2, GRA4, GRA6, GRA9 et une fraction de GRA1, GRA3, GRA5, GRA7 et des NTPase-I et II s'associent aux membranes du RNM. GRA1, les NTPases-I et II, PI-1 et PI-2 et une fraction de GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8 et GRA9 sont détectées solubles dans le compartiment vacuolaire. CPC1 et CPC2, Cy-18 et 14-3-3 sont secrétés dans la VP mais leur localisation exacte reste à être déterminée.

Même si les protéines Cy-18, 14-3-3, CPC1 et CPC2 sont secrétées dans la VP, leur localisation exacte dans ce compartiment reste à être précisée (High *et al.*, 1994, Assossou *et al.*, 2003 ; 2004 ; Que *et al.*,

2007). Ainsi, une fraction de GRA1, GRA3, GRA5, GRA7 et des NTPase-I et II mais surtout GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9 sont associées au RNM (Charif *et al.*, 1990 ; Dubremetz *et al.*, 1993 ; Sibley *et al.*, 1994 ; Lecordier *et al.*, 1995 ; Bonhomme *et al.*, 1998 ; Labruyère *et al.*, 1999 ; Adjogble *et al.*, 2004). Dans ces membranes, GRA2, GRA4 et GRA6 ont été décrites comme formant un complexe protéique multimérique (Labruyère *et al.*, 1999). GRA3, GRA5, GRA7, GRA8, « GRA10 » et une fraction des NTPase-I et II sont associées à la MVP (Achbarou *et al.*, 1991 ; Lecordier *et al.*, 1993 ; Bonhomme *et al.*, 1998 ; Carey *et al.*, 2000 ; Ahn *et al.*, 2005 ; Bermudes *et al.*, 1994b). GRA7 est également détectée au niveau des HOST (Coppens *et al.*, 2006). Parmi les protéines GRA, seules GRA2 et GRA6 présentent la particularité de s'accumuler transitoirement à la partie postérieure du parasite. Dans cette partie invaginée de la membrane plasmique du parasite, se trouvent des vésicules membranaires à partir desquelles va se constituer et se déployer le RNM (Sibley *et al.*, 1995) (cf chapitre III A 2 b) (**Figures 37 et 38**). Les GD constituent donc un système de sécrétion particulier qui permet au parasite de stocker et de sécréter sous forme soluble, des protéines pour la plupart membranaires (Lecordier *et al.*, 1999).

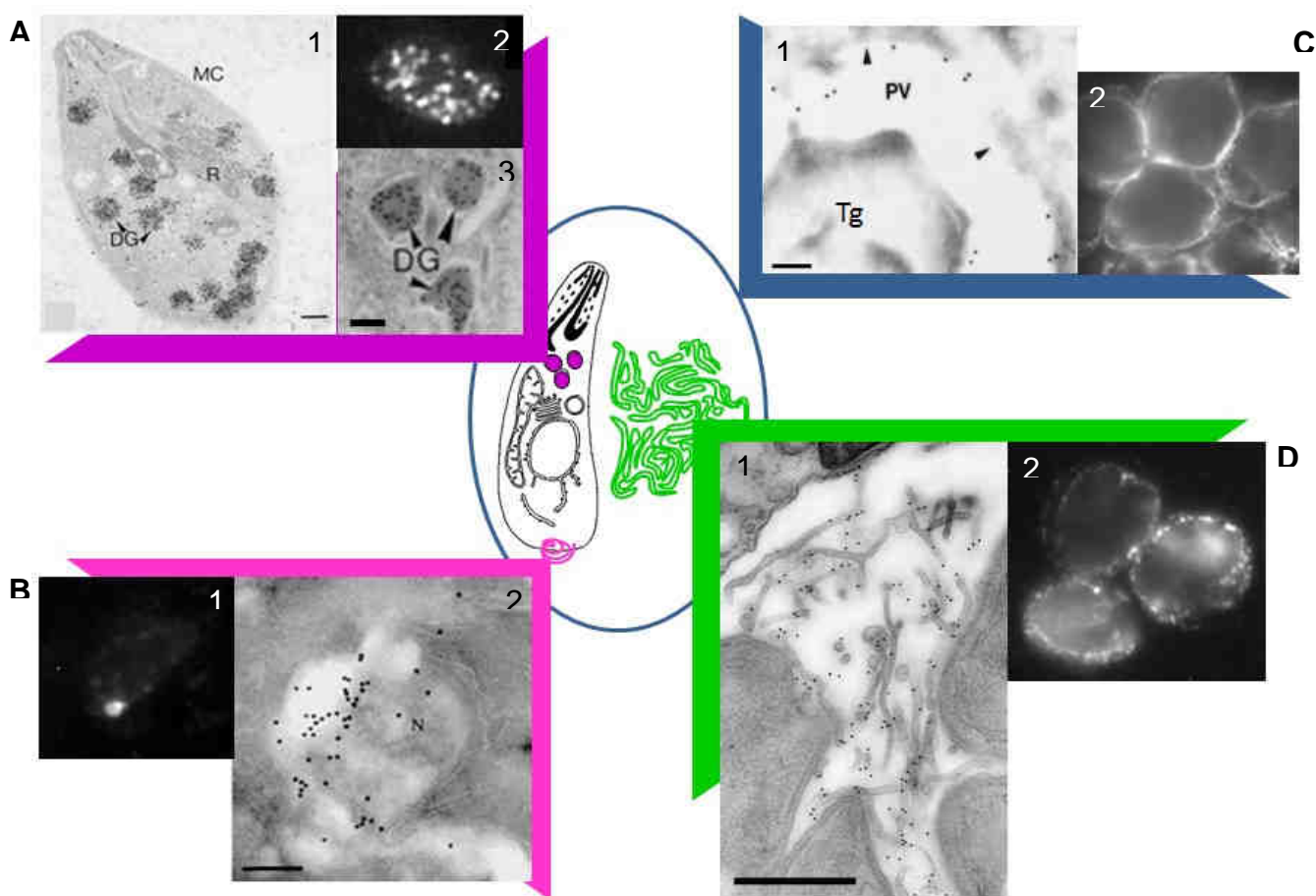


Figure 38 : Les protéines GRA au cours de leur trafic parasitaire depuis les GD jusqu'aux membranes de la VP du tachyzoïte. (A) Les protéines GRA sont stockées dans la matrice des GD. (1-3) Marquage immunogold à l'aide d'un anti-GRA7. R, rhoptries ; MC, membrane plasmique. Echelle : 200 nm (1), 100 nm (3). Bonhomme *et al.*, 1998. (2) Immunofluorescence à l'aide d'un anti-GRA4. Karsten *et al.*, 2004. **(B)** Dans la première heure qui suit l'invasion, GRA2 et GRA6 sont associées à la partie postérieure parasitaire aux vésicules membranaires qui vont constituer le RNM. (1) Immunofluorescence à l'aide d'un anti-GRA2. (2) Marquage immunogold à l'aide d'un anti-GRA6. Echelle : 200 nm. Labruyère *et al.*, 1999. **(C)** Les protéines GRA3, GRA5, GRA7, GRA8 et « GRA10 » sont associées à la MVP. (1) Marquage immunogold à l'aide d'un anti-GRA5. Echelle : 200 nm. Lecordier *et al.*, 1999. (2) Immunofluorescence à l'aide d'un anti-GRA5. **(D)** Les protéines GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9 sont associées au RNM. (1) Marquage immunogold à l'aide d'un anti-GRA2. Echelle : 500 nm. Photo de W. Beattie et L.D. Sibley (Washington University School of Medicine, St Louis, MO) (2) Immunofluorescence à l'aide d'un anti-GRA6.

Cette localisation des diverses protéines de GD dans la VP est en accord avec les analyses de structure secondaire réalisées sur les protéines GRA. GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8 et « GRA10 » possèdent des domaines transmembranaires ; GRA2 et GRA9, des hélices alpha-amphipatiques (cf chapitre III C 1 a). Dans le cas de GRA2 (Mercier *et al.*, 1998a) et GRA5 (Lecordier *et al.*, 1999), les domaines membranaires sont directement responsables de leur association membranaire (GRA2 *via* ses hélices alpha-amphipatiques et GRA5 *via* son segment transmembranaire). Les protéines GRA3, GRA5, GRA7 et GRA8 associées à la MVP sont prédites comme étant des protéines transmembranaires de type I. Cette topologie a d'ailleurs été confirmée pour GRA5 (Lecordier *et al.*, 1999).

Même si l'association membranaire post-sécrétoire est une règle pour la plupart des protéines GRA, une fraction de ces protéines reste malgré tout soluble à 100 000 g dans la VP et la nature de leur association membranaire semble différente. Ainsi, alors que GRA1 et les NTPases-I et II s'associent seulement très faiblement au RNM (Sibley *et al.*, 1994, 1995), GRA4 ne peut être dissociée de ces membranes que par l'urée 6M (Labruyère *et al.*, 1999), ce qui suggère une association basée principalement sur l'existence de liaisons hydrogènes et sans doute des interactions protéine-protéine. Par contre, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8 et GRA9 sont totalement dissociées des membranes de la VP par des détergents non ioniques. Ceci montre que l'association membranaire de ces protéines est stabilisée par des liaisons hydrophobes (Sibley *et al.*, 1995 ; Labruyère *et al.*, 1999 ; Lecordier *et al.*, 1999 ; Carey *et al.*, 2000 ; Neudeck *et al.*, 2002 ; Adjogble *et al.*, 2004). Même si les mécanismes qui contrôlent l'association membranaire des protéines GRA restent inconnus, la phosphorylation/déphosphorylation et les interactions protéines-protéines pourraient être de bons candidats. Les facteurs qui pourraient être responsables du stockage et de la sécrétion des protéines GRA sous forme soluble à 100 000 g, puis de leur ciblage spécifique aux différentes membranes vacuolaires sont actuellement inconnus.

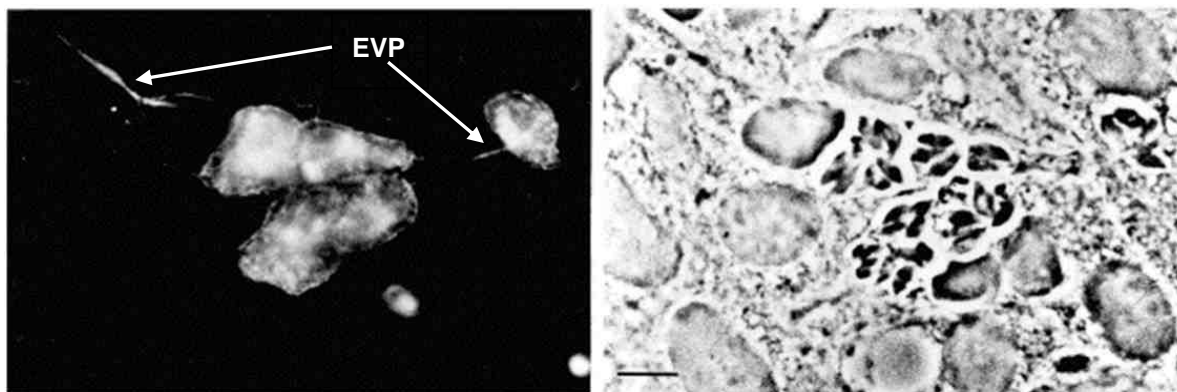


Figure 39 : Les protéines de GD sont associées aux extensions de la MVP dans le cytoplasme de la cellule hôte (EVP). Immunofluorescence réalisée à l'aide d'un anti-GRA7. Echelle : 1 μ m. D'après Jacobs *et al.*, 1998.

Seules les protéines naturellement sécrétées par *Toxoplasma* sont en contact avec la cellule hôte. Ce sont les protéines de rophtries associées à la MVP, les protéines GRA transmembranaires (avec un domaine

dans le cytoplasme de l'hôte), ainsi que les protéines GRA associées aux EVP (Dubremetz, 2007 ; Mercier *et al.*, 2005) (**Figure 39**). Contrairement à *Plasmodium*, peu de protéines ont été décrites comme étant exportées au-delà de la VP de *Toxoplasma*, dans le cytoplasme de la cellule hôte (cf chapitre II D 4). Cependant, une étude sur la présentation d'antigènes chez *Toxoplasma* montre que des protéines pourraient s'échapper de la VP vers le cytoplasme de la cellule hôte et être présentées par la voie endogène du CMH de classe I (Gubbels *et al.*, 2005).

4. Implication des protéines GRA dans la maturation de la vacuole parasitophore

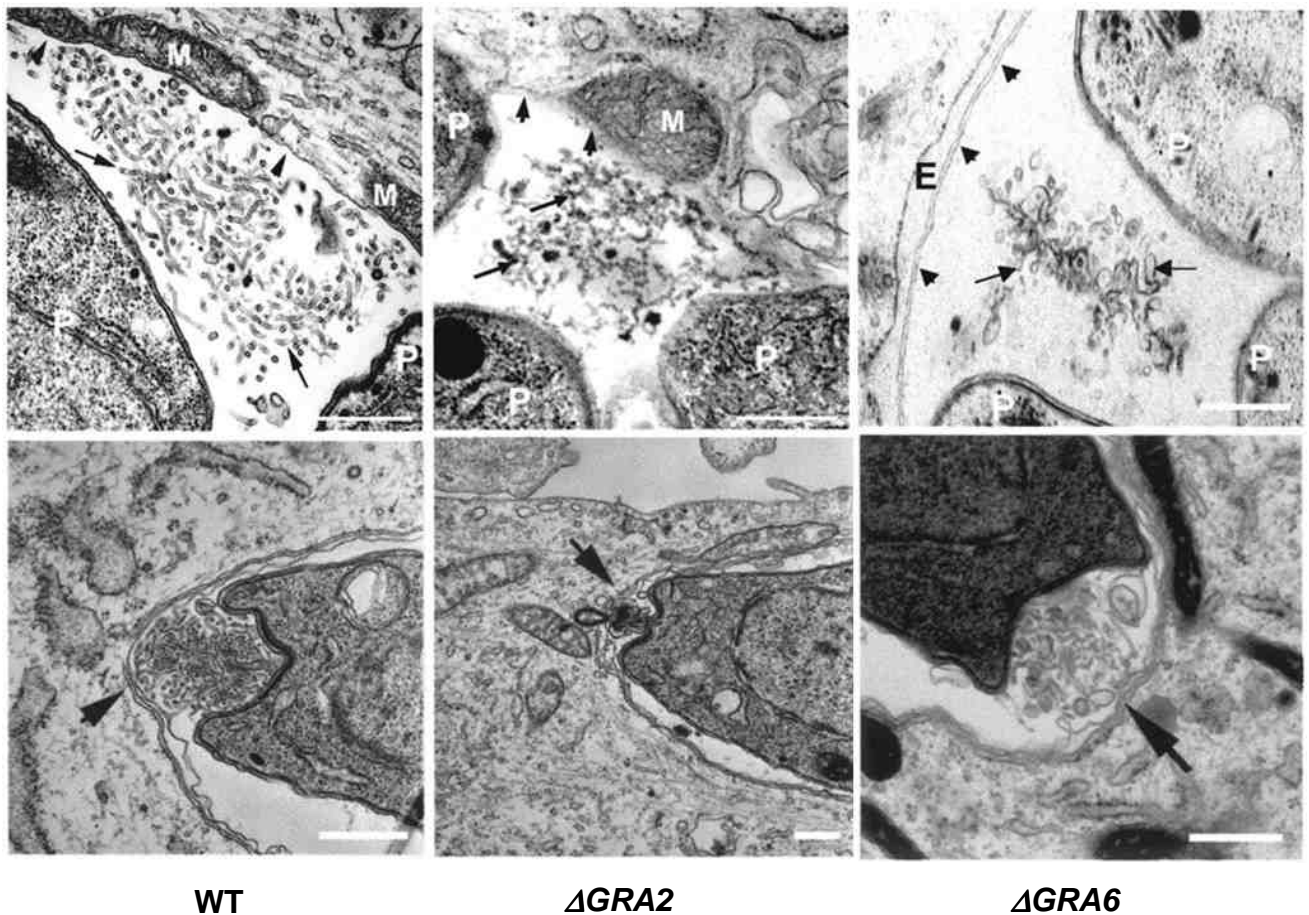


Figure 40 : GRA2 initie la formation du RNM qui est stabilisé par GRA6. La délétion de *GRA2* ou *GRA6* se traduit par une perte de l'architecture tubulaire du RNM. Les nanotubes sont remplacés par un matériel agrégé (délétion de *GRA2*) ou de petites vésicules (délétion de *GRA6*). M, mitochondrie de l'hôte ; E, réticulum endoplasmique de l'hôte ; P, parasite ; WT, parasite sauvage. Echelle : 500 nm. Mercier *et al.*, 2002.

Le rôle des protéines GRA dans la maturation de la VP a été recherché par une approche de génétique inverse, par double recombinaison homologue au locus du gène ciblé. Les tentatives de délétion des gènes *GRA1*, *GRA4*, *GRA9* et *NTPases* se sont révélées infructueuses, suggérant un rôle indispensable de ces protéines de GD dans la survie intracellulaire du parasite (Braun and Cesbron-Delauw, non publié ; Travier and Mercier, non publié ; Adjogble, communication personnelle ; Nakaar *et al.*, 1999). Par contre, la délétion de *GRA2*, *GRA3*, *GRA5*, *GRA6* et *GRA7* a pu être réalisée dans la souche virulente RH de type I.

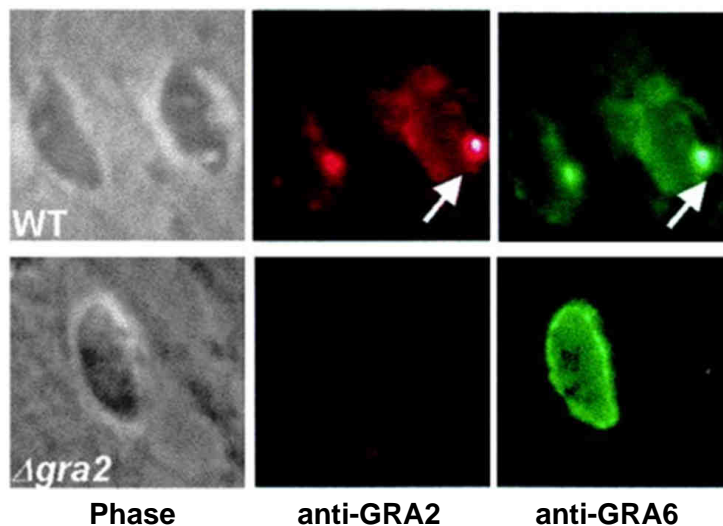


Figure 41 : La délétion de *GRA2* entraîne la perte de la localisation de *GRA6* au niveau de la partie postérieure du parasite. Perte des dots d'immunofluorescence (flèches) de *GRA2* et *GRA6* consécutifs à la délétion de *GRA2*. Mercier *et al.*, 2002.

Alors que la délétion de *GRA5* n'a pas révélé de phénotype particulier (Mercier *et al.*, 2001), l'analyse phénotypique des parasites mutants, délétés du gène *GRA2* (Mercier *et al.*, 1998b) et/ou du gène *GRA6* (Mercier *et al.*, 2002) montre que la délétion de *GRA2* ou *GRA6* entraîne la perte de l'architecture tubulaire du RNM qui est remplacé par un matériel agrégé ou de petites vésicules, respectivement (**Figure 40**). La délétion de *GRA2* s'accompagne également de la disparition de l'association de *GRA6* au niveau de la partie postérieure du parasite, dans la première heure qui suit l'invasion (**Figure 41**). *GRA2* semble donc responsable du trafic de *GRA6* au niveau de cette invagination postérieure parasitaire d'où se déploie le RNM. *GRA2*, *via* ses deux domaines amphiphiles, est l'effecteur principal de l'organisation nanotubulaire du RNM tandis que *GRA6*, en interagissant avec *GRA2*, permet la stabilisation du réseau mature (Mercier *et al.*, 2002). Ces résultats ont été confirmés par l'étude tridimensionnelle de la VP (Muniz-Hernandez *et al.*, en préparation). En effet, la délétion de *GRA2* s'accompagne non seulement de la désorganisation des parasites dans la VP mais elle entraîne également l'asynchronie de leur division (**Figure 42**). Toutefois, même s'il constitue un élément architectural important de la VP, cette étude a montré que le RNM n'est pas essentiel à la croissance parasitaire *in vitro*. La délétion successive, dans la même population

parasitaire, des gènes *GRA2*, *GRA5* et *GRA6* (Mercier *et al.*, 2005) n'influe pas non plus sur le développement parasitaire *in vitro*, en conditions normales de cultures.

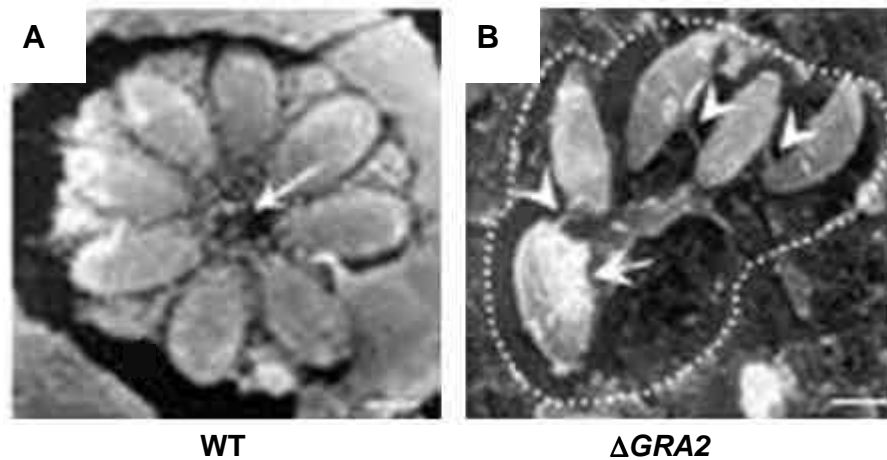


Figure 42 : La délétion de *GRA2* entraîne la désorganisation des parasites dans la vacuole et l'asynchronie de leur division. (A) Dans une VP, les parasites sont étroitement liés les uns aux autres par le RNM. La flèche blanche indique le corps résiduel. **(B)** Les parasites délétés de *GRA2* sont complètement désorganisés dans la VP. Comme le montre le parasite isolé en train de se diviser (flèche blanche), la délétion de *GRA2* entraîne également l'asynchronie de la division parasitaire. Les pointes de flèches indiquent les rares résidus membranaires qui relient les parasites entre eux. Muniz-Hernandez *et al.* en préparation.

GRA3, de par son motif spécifique du réticulum endoplasmique dans sa partie C-terminale, pourrait être responsable du recrutement du réticulum endoplasmique de la cellule hôte contre la membrane de la VP (Henriquez *et al.*, 2005). Toutefois, chez les parasites de type II délétés de *GRA3*, aucune altération de la morphologie de la VP n'a été observée ; le réticulum endoplasmique et les mitochondries de la cellule hôte restent recrutés contre la MVP (Craver and Knoll, 2007).

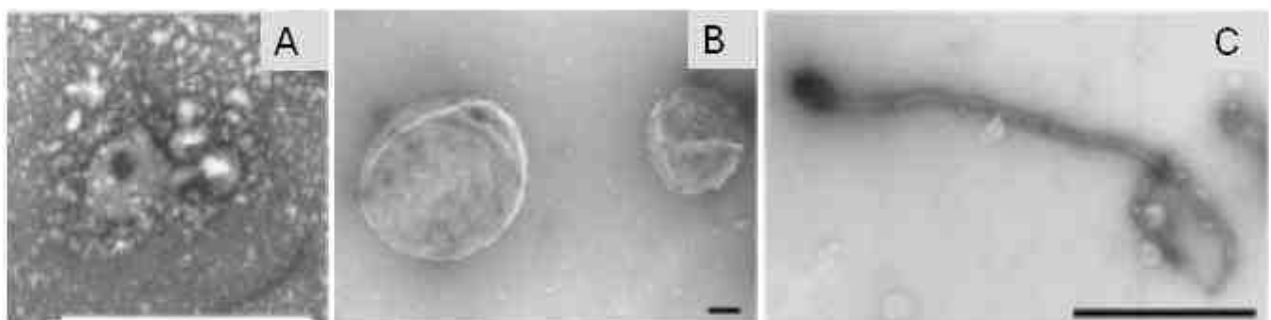


Figure 43 : Tubulation de liposomes par le matériel sécrété des toxoplasmes. Photographies réalisées par microscopie électronique à transmission après incubation du matériel sécrété des parasites **(A)** avec de larges liposomes sphériques **(B)** pendant 20 min à 37°C. A la suite de cette incubation, des tubules sont observés **(C)**. Echelle : 100 nm **(A)** ; 300 nm **(B)** **(C)**. Coppens *et al.*, 2006.

Coppens *et al.* ont montré que les protéines sécrétées par les parasites peuvent directement se lier à des liposomes et déformer les bicouches lipidiques en formant des tubules branchés. Toutes les protéines GRA sont détectées en association avec les fractions liposomales purifiées par flottaison. Une tubulation massive des liposomes est observée en absence de GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA8 et GRA9, immuno-déplétées individuellement (**Figure 43**). Toutefois, cet effet n'a pas été observé en absence de GRA7. De plus, le matériel sécrété à partir des parasites délétés des gènes *GRA2*, *GRA5* ou *GRA6* est toujours capable d'induire la tubulation à partir de liposomes. Sous sa forme recombinante, GRA7 induit la tubulation à partir de liposomes *in vitro*. L'étude des formes tronquées de GRA7 montre que c'est le domaine C-terminal hydrophobe qui est responsable de la tubulation. De plus, c'est sous une forme dimérisée que GRA7 induit la formation de tubules à partir des produits de sécrétion *in vitro* (Coppens *et al.*, 2006).

Les parasites délétés du gène *GRA7* ont une croissance réduite lorsqu'ils sont en présence de sérum délipidé et ils présentent alors une morphologie altérée. De plus, les GD n'apparaissent plus denses aux électrons. Ce phénotype pourrait être la conséquence de l'absence de sécrétion dans la VP des protéines GRA transmembranaires (thèse P. Ruffiot, juillet 2007). Les parasites délétés de *GRA7* forment une VP dépourvue de HOST mais toujours décorée d'un RNM (Coppens *et al.*, 2006) (**Figure 44**). Ceci démontre l'existence au sein de la vacuole, de deux processus de tubulation membranaire, HOST et RNM, reposant sur des mécanismes indépendants. GRA7, et plus généralement les autres protéines de GD, pourraient être impliquées dans la séquestration dans la VP, *via* les HOST, de vésicules endocytaires de l'hôte (Coppens *et al.*, 2006), alors que GRA2 et GRA6 seraient impliquées dans la tubulation du RNM (Mercier *et al.*, 2002). Les mécanismes de formation du RNM restent cependant à préciser.

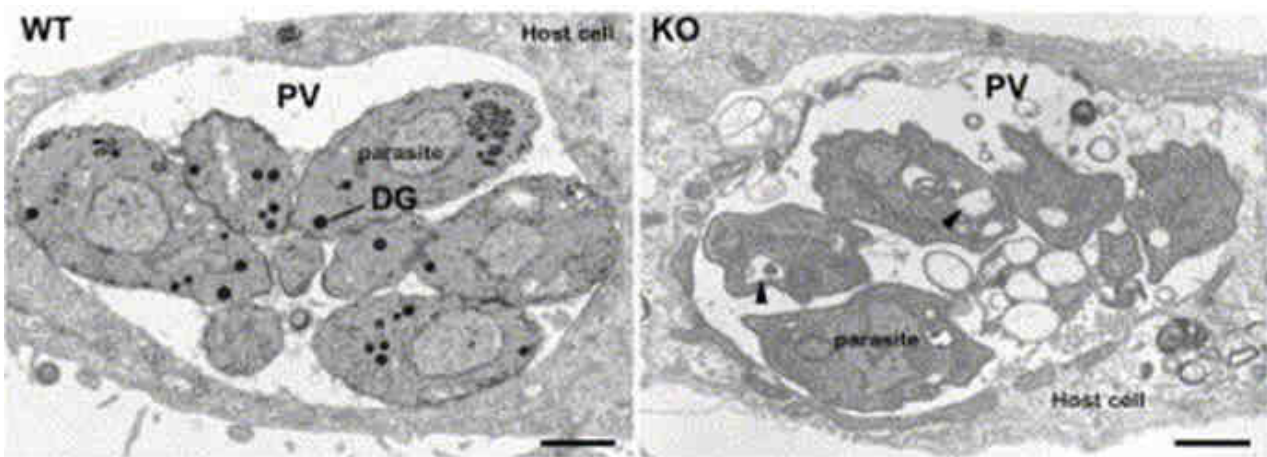


Figure 44 : Les parasites délétés de *GRA7* présentent une morphologie altérée en présence de sérum délipidé. Parasites sauvages (WT) et délétés du gène *GRA7* (KO) après 48 heures de croissance en présence de 5 % de sérum délipidé. Les flèches indiquent les structures vacuolisées. Chez les parasites KO, l'absence de GD et d'autres organites denses aux électrons est rapidement observable. Aucun HOST n'est détecté. Echelle : 0.5 µm. Coppens *et al.*, 2006.

5. Redistribution des protéines GRA au niveau du kyste

Lors de l'infection chronique, la maturation de la VP conduit à la formation d'un kyste intracellulaire. Les mécanismes moléculaires de l'enkystement sont encore peu connus. Toutes les protéines GRA continuent d'être détectées dans les GD des parasites enkystés mais l'expression des NTPases est réduite (Nakaar *et al.*, 1998 ; Ferguson *et al.*, 1999a). L'analyse sur puce à ADN de la régulation de l'expression des protéines GRA lors du processus d'enkystement montre que les gènes *GRA1*, *GRA5* et *GRA8* sont régulés au cours du développement puisque leur ARNm est réprimé. Par contre, le taux d'ARNm codant pour *GRA2*, *GRA3*, *GRA4*, *GRA6* et *GRA7* reste stable au cours de l'enkystement (Cleary *et al.*, 2002). *GRA1* et *GRA5* sont toujours détectées dans le kyste et les bradyzoïtes, malgré l'absence d'ARN transcrit. Ces protéines semblent donc avoir une demi-vie particulièrement longue. De plus, *GRA4* et *GRA8* ne sont pas détectées dans les kystes mais elles le sont toujours dans les GD des bradyzoïtes, ce qui suggère un arrêt de la sécrétion de ces protéines dès le début de la différenciation (Mercier *et al.*, 2005, 2007).

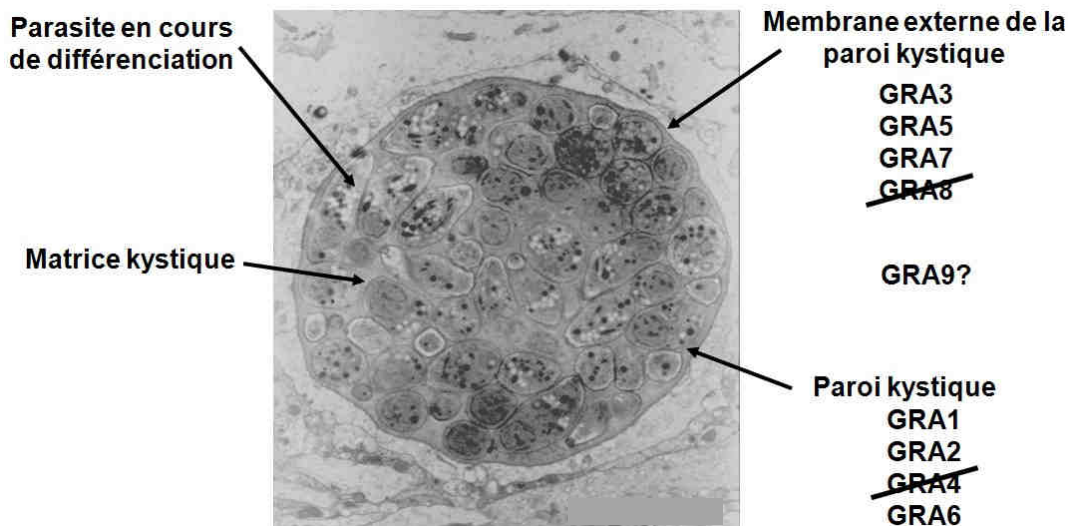


Figure 45 : Localisation des protéines GRA au niveau du kyste de *Toxoplasma*. GRA3, GRA5, GRA7 sont situées à la membrane délimitant la paroi du kyste ; GRA1, GRA2 et GRA6 sont localisées au niveau de la paroi interne du kyste ; la localisation de GRA9 reste encore inconnue. GRA4 et GRA8 ne sont pas détectées dans la paroi kystique. Photo de J.F. Dubremetz.

La VP des bradyzoïtes est entourée d'une membrane unique avec de nombreuses invaginations et elle est formée d'une fine couche de matériel granulaire qui constitue la paroi kystique. Contrairement à la VP des tachyzoïtes, la VP des bradyzoïtes est dépourvue de RNM mais reste entourée des mitochondries et du réticulum endoplasmique de la cellule hôte (Ferguson, 2004). La localisation des protéines de GD dans la structure kystique a été analysée systématiquement : GRA3, GRA5 et GRA7 qui étaient détectées à la MVP, sont localisées au niveau de la membrane externe de la paroi kystique et GRA2 et GRA6, qui étaient

détectées au niveau des membranes du RNM, sont retrouvées au niveau de la couche interne de la paroi kystique, avec GRA1 qui était soluble dans l'espace vacuolaire. GRA4, GRA8 et les NTPases ne sont pas détectées dans la paroi kystique (Ferguson, 2004). GRA9 est aussi exprimée dans le kyste et les bradyzoïtes, mais sa localisation exacte reste encore inconnue (Adjogble *et al.*, communication personnelle) (**Figure 45**). Cette localisation de la majorité des protéines GRA dans la paroi kystique suggère une redistribution du RNM contre la MVP, lors du processus d'enkystement, ce qui est vérifié *in vitro* (Mercier *et al.*, résultats non publiés). Ceci sous entend donc un rôle structural du RNM pour la constitution de la paroi kystique. Les protéines de GD pourraient, comme il l'a été suggéré pour la VP des tachyzoïtes, être ciblées au delà de la paroi kystique. Ainsi, GRA7 semble être détectée dans la cellule hôte (Fischer *et al.*, 1998 ; Ferguson *et al.*, 1999b).

But du projet

BUT DU PROJET

Dans le cadre global de l'étude de la biogénèse de la VP, mon projet de thèse visait :

- 1) à déterminer si les protéines GRA ont des propriétés biochimiques particulières qui permettraient d'expliquer qu'elles soient stockées dans les GD et sécrétées dans la VP sous forme soluble à 100 000 g, alors que ce sont des protéines membranaires ;
- 2) à étudier le rôle de GRA2 dans la formation des tubules membranaires du RNM *via* l'analyse des domaines fonctionnels de la protéine, suite à la mise à disposition de nouveaux programmes informatiques de prédiction de structure secondaire des protéines.

Résultats

CHAPITRE IV

Etude des propriétés biochimiques des protéines GRA dans les granules denses et la vacuole parasitophore

Ce premier chapitre de mes résultats vise à mieux comprendre les différents profils agrégé/soluble/hydrophobe adoptés par les protéines GRA au cours de leur trafic, depuis leur stockage dans les GD jusqu'à leur insertion membranaire post-sécrétoire dans la VP. L'emphase de ces travaux a été faite plus particulièrement sur la problématique de la solubilité et de l'agrégation des protéines GRA dans les GD. Ce chapitre comprend l'analyse des propriétés biochimiques des protéines GRA par biochimie conventionnelle et la recherche des interactions qu'elles établissent entre elles dans les GD. Cet aspect a été étendu à la VP et complété par une étude préliminaire des modifications post-traductionnelles portées par les protéines GRA associées au RNM. Les résultats obtenus ont été replacés dans le contexte des propriétés et du ciblage des protéines des granules de sécrétion mammifères.

A. CONTEXTE

Toxoplasma, et plus généralement les *Apicomplexa*, ont développé trois types d'organites de sécrétion : les micronèmes, les rhoptries et les GD. Alors que les protéines de micronèmes sont impliquées dans l'invasion parasitaire et que celles des rhoptries permettent la formation de la VP, les protéines de GD assurent la maturation de la VP. Parmi les protéines stockées dans les GD, certaines possèdent une activité enzymatique. Par contre, on retrouve également dans ces GD, une famille de protéines qui ne possèdent aucune homologie avec des protéines de fonction connue, ce sont les protéines GRA. Comme les autres protéines de GD, les protéines GRA possèdent un peptide signal N-terminal hydrophobe qui les cible vers la voie de sécrétion. La plupart d'entre elles possède également un domaine central hydrophobe composé soit de domaines transmembranaires (GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8, GRA9 et « GRA10 »), soit d'hélices alpha-amphipatiques (GRA2 et GRA9) (Henriquez *et al.*, 2005 ; Mercier *et al.*, 2005 ; Ahn *et al.*, 2005). Stockées à la fois sous formes solubles et agrégées dans les GD, les protéines GRA sont ensuite sécrétées sous forme soluble à 100 000 g dans la VP où la plupart s'associe aux membranes qui constituent la MVP, les HOST ou le RNM (Mercier *et al.*, 2005 ; Coppens *et al.*, 2006). Dans ce contexte, je me suis intéressée tout d'abord au concept des GD. Les questions posées étaient 1)

en quoi les GD de *Toxoplasma* seraient ils similaires à ceux répertoriés dans les cellules eucaryotes, et notamment ceux identifiés chez les mammifères et 2) quels sont les mécanismes répertoriés chez les eucaryotes et permettant de cibler les protéines vers les granules de sécrétion ?

1. Les granules de sécrétion sont largement distribués chez les eucaryotes

a) Vers une évolution convergente des granules chez les eucaryotes

Les « granules au cœur dense » (Dense Core Granules ou DCG) sont des vésicules de sécrétion spécialisées que l'on retrouve chez de nombreux eucaryotes (Elde *et al.*, 2007). C'est chez les mammifères que les DCG ont été les plus étudiés. Cependant, les organismes issus des branches eucaryotes les plus ancestrales possèdent aussi des vésicules analogues aux DCG. Ces vésicules sont largement distribuées ; est-ce que les DCG des eucaryotes ont été hérités d'un ancêtre commun ou sont-ils apparus dans différentes lignées selon une évolution convergente ?

Parmi les vésicules analogues aux DCG présentes chez les organismes eucaryotes non mammifères, les mieux décrites sont celles des ciliés, plus particulièrement les trichocystes de *Paramecium* et les mucocystes de *Tetrahymena* (Vayssie *et al.*, 2000, Turkewitz, 2004). Ces larges vésicules possèdent de nombreuses caractéristiques communes avec les DCG des mammifères. En effet, leur processus de remodelage et de maturation et leurs mécanismes d'exocytose sont très proches (Adoutte *et al.* 1984 ; Verbsky and Turkewitz, 1998). Ces similarités suggèrent que les DCG des ciliés et des mammifères pourraient avoir été hérités d'un ancêtre commun. Cependant, en défaveur de cette hypothèse, les protéines granulaires des ciliés et des mammifères ne sont pas homologues. Par exemple, les protéines Tmps de la matrice des trichocystes de *Paramecium* et les protéines Grls du réseau granulaire de *Tetrahymena* sont produites à partir d'une famille de gènes uniques non retrouvés chez les mammifères (Cowan *et al.*, 2005 ; Madeddu *et al.*, 1995). Ces données suggèrent l'indépendance des propriétés et de la composition moléculaire des granules de sécrétion des mammifères et des ciliés (Elde *et al.*, 2007).

Les granules de sécrétion sont très largement distribués chez les eucaryotes, y compris chez les plus primitifs. Les voies de biosynthèse et de sécrétion de ces vésicules semblent communes à la plupart des eucaryotes. Cependant, les protéines qui sont stockées dans ces granules ne possèdent aucune homologie entre elles. Les granules semblent donc être apparus indépendamment chez les eucaryotes et avoir évolué de manière convergente dans ces organismes.

b) Les granules de sécrétion des eucaryotes possèdent une morphologie commune mais sont impliqués dans des fonctions différentes

L'hypothèse selon laquelle les granules eucaryotes seraient issus d'une évolution convergente est renforcée par le fait que ces granules, malgré leur caractéristique commune de densité aux électrons en microscopie électronique à transmission (**Figure 46**), sont impliqués dans des fonctions très différentes : prédation, défense, pathogénicité, protection ou des fonctions spécifiques des métazoaires (Elde *et al.*, 2007).

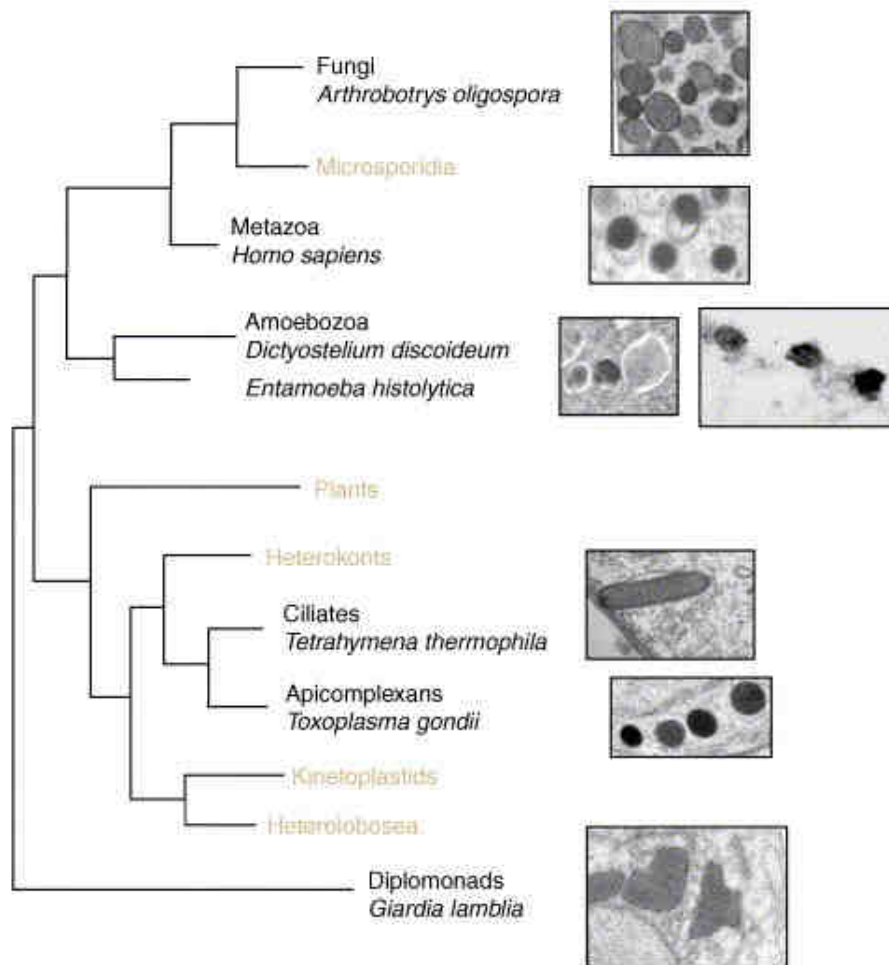


Figure 46 : Les granules de sécrétion chez les eucaryotes. Elde *et al.*, 2007.

✓ **Prédation et pathogénicité :**

Certains ciliés possèdent des DCG morphologiquement complexes qui aident à la capture d'autres ciliés. Ces DCG appelés toxicystes, sécrètent des molécules qui, au contact de la proie, permettent à ces ciliés de la maîtriser (Rosati and Modeo, 2003).

La plupart des champignons ne possèdent pas de DCG. Cependant, *Arthrobotrys oligospora* est un champignon prédateur caractérisé par une abondance de corps denses aux électrons analogues aux DCG, dans son cytoplasme. Ces corps denses impliqués dans la capture et la digestion de nématodes ne constituent pas des vésicules de sécrétion mais fusionnent avec des vacuoles selon un mécanisme régulé (Veenhuis *et al.*, 1989).

Les granules denses aux électrons du parasite *Entamoeba histolytica* sécrètent des collagénases et une variété d'autres protéases qui facilitent son invasion cellulaire (Leon *et al.* 1997).

✓ **Défense et protection :**

Les ciliés « non carnivores » peuvent parfois induire la sécrétion de leur DCG afin de contrer leurs prédateurs. Par exemple, la sécrétion des trichocystes de *Paramecium* lui confère une protection contre les ciliés « carnivores » (Harumoto and Miyake, 1991 ; Knoll *et al.*, 1991).

Les vésicules de sécrétion de *Giardia lamblia*, parasite dérivant d'une branche eucaryote ancestrale, assurent son enkystement et donc sa protection dans l'environnement. Plus précisément, les protéines stockées dans ces granules sont incorporées dans la paroi kystique (Reiner *et al.*, 2001). La sécrétion protéique chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* permet la formation du manteau de la spore qui le protège des températures extrêmes et de la sécheresse (Srinivasan *et al.*, 2000).

✓ **Fonctions spécifiques des métazoaires :**

Les métazoaires possèdent de nombreuses classes de DCG. Le système neuroendocrine des mammifères comporte différents types de DCG dont ceux des cellules chromaffines qui permettent le stockage de neurotransmetteurs et les granules contenant l'insuline pancréatique (Winkler, 1993).

Les *Apicomplexa* sont remarquables car ils ont développé trois réservoirs de sécrétion différents : les micronèmes, les rhoptries et les GD. Les GD de *Toxoplasma* ont une morphologie analogue aux DCG des autres eucaryotes. Ils sont fonctionnellement proches de leurs homologues parasitaires car les protéines qui y sont stockées sont impliquées dans la pathogénicité, la maturation de la VP qui protège le parasite ainsi que la formation de la paroi kystique. Peu de choses sont connues sur la contribution des DG dans l'enkystement et cette question n'a pas été abordée au cours de ma thèse.

c) **Caractéristiques des granules au cœur dense (DCG)**

La lumière des DCG contient un cœur protéique condensé issu de l'auto-agrégation de protéines solubles au niveau du réseau *trans*-Golgi. Après sa formation, le cœur protéique des DCG continue de se réorganiser et subit une phase de remodelage ou maturation (Arvan *et al.*, 2002). Cette phase de maturation s'accompagne souvent d'un clivage protéolytique des pro-protéines (Verbsky and Turkewitz, 1998 ; Dannies, 2001). Chez les mammifères, les endoprotéases impliquées dans la maturation du cœur

des granules les mieux décrites sont les prohormones convertases, des protéases de la famille des subtilisines (Steiner, 1998).

Les DCG libèrent ensuite leur contenu à l'extérieur de la cellule en fusionnant avec la membrane plasmique. Une des caractéristiques propres aux DCG est que cette fusion n'est pas spontanée. Au contraire, elle n'a lieu qu'en réponse à un stimulus spécifique. Les DCG s'accumulent dans le cytoplasme cellulaire jusqu'à ce qu'un signal extracellulaire provoque leur fusion avec la membrane plasmique selon un processus appelé « exocytose régulée » (Almers, 1990). Le signal qui induit l'exocytose des DCG mobilise le plus souvent un flux de calcium intracellulaire (Erxleben *et al.*, 1997). La fusion des DCG avec la membrane plasmique est également médiée par les SNARE, récepteurs du facteur soluble NSF (Froissard *et al.*, 2002). Lors de la phase de maturation, les pro-protéines clivées peuvent être libérées du cœur agrégé. Elles sont alors sécrétées selon un mécanisme indépendant d'un stimulus et donc constitutif, qui pourrait mettre en jeu les SNARE (Arvan *et al.*, 1991 ; Bowman *et al.*, 2005).

La présence d'un cœur condensé et l'exocytose régulée définissent les DCG mais ces caractéristiques ne leur sont malgré tout, pas propres. Certains lysosomes de sécrétion tels que les granules lytiques des cellules hématopoïétiques les possèdent également (Andrews, 2000). Cependant, la voie de biosynthèse des DCG diffère de celles des lysosomes car elle n'implique pas les protéines adaptatrices et à manteau du réseau *trans*-Golgi (Arvan and Castle, 1998 ; Tooze, 1998).

Avec un contenu très condensé, les DCG constituent des réservoirs de stockage très efficaces comparé aux autres vésicules de transport de protéines solubles. Ils sont soumis à un processus de sécrétion régulée modéré par la sécrétion constitutive des protéines matures qui sont libérées du cœur agrégé des DCG. Leur voie de biosynthèse au niveau du réticulum endoplasmique/ Golgi diffère de celle des autres compartiments de stockage cellulaires, notamment les lysosomes.

d) Les granules denses de *Toxoplasma*

Comme le cœur protéique de la lumière des DCG, les GD apparaissent très denses aux électrons, ce qui suggère un haut niveau de compaction des protéines qui y sont stockées (Dubey *et al.*, 1998). Par contre, contrairement aux rhoptries (Dubremetz, 2007), il semble peu probable que les protéines stockées dans les GD subissent un processus de maturation médié par un clivage protéolytique. En effet, parmi les protéines identifiées dans les GD et possédant une activité enzymatique, seules deux cathepsines possèdent une fonction protéasique ont été décrites (Que *et al.*, 2007) mais leur activité dans les GD n'a pas été mise en évidence. Au contraire, les GD assurent le stockage de protéines impliquées dans la protection des protéines contre d'éventuels clivages protéolytiques (inhibiteurs de sérine protéase PI-1 et PI-2) (Pszenny *et al.*, 2000, 2002 ; Morris *et al.*, 2002 ; Morris and Carruthers, 2003).

La voie de biosynthèse des GD a été peu étudiée. Les données actuelles n'ont jamais pu mettre en évidence de GD immature à la sortie du réseau *trans*-Golgi de *Toxoplasma*. Les protéines de GD GRA4 et GRA7 possèdent au niveau de leur queue cytoplasmique, un motif de reconnaissance par AP-1.

Néanmoins, l'orthologue toxoplasmique de AP-1, localisé au niveau de la citerne *trans*-Golgi la plus externe, ne reconnaît ni GRA4 ni GRA7 (Ngo *et al.*, 2003).

Les GD libèrent leur contenu en fusionnant avec la membrane plasmique. Les mécanismes qui régissent cette fusion restent inconnus mais un mécanisme de sécrétion constitutive pourrait impliquer certaines protéines impliquées dans le transport protéique au niveau du réticulum endoplasmique/Golgi : petites GTPases de la famille des Rab, facteurs accessoires solubles de la machinerie NSF et SNARE/SNAP (Chaturvedi *et al.*, 1999) et ARF-1 (Liendo *et al.*, 2001). Toutefois, un pic de sécrétion des GD est observé dans la première heure qui suit la formation de la VP (Dubremetz *et al.*, 1993 ; Carruthers and Sibley, 1997), suggérant un mécanisme de régulation de la sécrétion directement lié à la formation de la VP. Aucune des molécules induisant la sécrétion n'a d'effet sur les GD, pas même une augmentation du taux de calcium intracellulaire. Seul le sérum inactivé par la chaleur induit la sécrétion des GD *in vitro* (Darcy *et al.*, 1988 ; Coppens *et al.*, 1999). Deux mécanismes distincts pourraient donc être responsables de la sécrétion des protéines de GD en fonction de leur niveau de compaction dans les GD : les protéines périphériques non compactées pourraient être sécrétées selon un mécanisme constitutif dépendant de ARF-1 au cours du développement intracellulaire (Liendo *et al.*, 2001), tandis qu'un mécanisme régulé par un mécanisme inconnu, insensible à l'ARF-1, pourrait rapidement après l'invasion, assurer la sécrétion rapide des protéines de GD, au moment où ces protéines sont requises pour constituer une VP fonctionnelle (Mercier *et al.* 2005).

Les GD de *Toxoplasma* possèdent de nombreuses caractéristiques communes avec les DCG : i) ils présentent un cœur dense aux électrons qui suggère un haut niveau de compaction des protéines qui y sont stockées ; ii) leur voie de biosynthèse ne semble pas impliquer la machinerie protéique du réseau *trans*-Golgi et iii) la sécrétion des protéines qu'ils contiennent semble être soumise à deux mécanismes distincts, constitutifs et régulés, selon leur niveau de compaction. Toutefois, les GD de *Toxoplasma* sont singuliers de par l'absence apparente de processus effectif de maturation.

2. Le ciblage des protéines vers la voie de sécrétion granulaire

Chez *Toxoplasma*, le ciblage des protéines destinées aux voies de sécrétion des micronèmes, des rhoptries et des GD a été décrit comme étant médié par un peptide signal hydrophobe. Comme les autres protéines de GD, les protéines GRA semblent suivre cette règle car elles possèdent un peptide signal N-terminal hydrophobe potentiellement clivé lors du trafic protéique au niveau du réticulum endoplasmique. L'addition d'un peptide signal en position N-terminale à diverses protéines solubles suffit à assurer leur ciblage dans les GD puis leur sécrétion dans la VP (Karsten *et al.*, 1998). Peu d'études ont pu mettre en évidence d'autres domaines potentiellement impliqués dans le tri de ces protéines vers les GD. Toutefois, le remplacement du domaine hydrophobe central de GRA4 par celui d'autres protéines membranaires montre que la sécrétion des protéines de GD semble dépendre de la longueur de leur domaine transmembranaire (Karsten *et al.*, 2004). Existe-t-il d'autres mécanismes responsables du ciblage des

protéines GRA vers la voie de sécrétion granulaire ? Certains éléments de réponse pourraient être apportés en comparant la voie de ciblage des protéines de GD à celle des granules mammifères.

Les granules de sécrétion mammifères sont formés lors de l'inclusion du contenu du réseau *trans*-Golgi dans les granules naissants. Les nombreuses études réalisées afin de déterminer le signal responsable du tri des protéines vers la voie de sécrétion granulaire mammifère mettent en évidence trois systèmes principaux non exclusifs les uns des autres (**Figure 47**) (Dikeakos and Reudelhuber, 2007).

a) Association membranaire

Le premier mécanisme proposé repose sur l'association de certains domaines protéiques avec les membranes des granules en formation. C'est le cas par exemple, du peptidyl- α -amidating monooxygénase (PAM), de la phogrine ou de la mucline qui traversent la membrane des granules selon une association de type I (Bell-Parikh *et al.*, 2001 ; Wasmeier *et al.*, 2002 ; Boulatnikov and De Lisle, 2004). Le signal de tri granulaire de la phogrine est localisé au niveau de sa partie C-terminale et même si la nature exacte de ce domaine n'est pas clairement définie, il lie les protéines adaptatrices AP-1 et AP-2 *in vitro* (Wasmeier *et al.*, 2005 ; Torii *et al.*, 2005). Cette interaction pourrait assurer la communication entre le cargo protéique granulaire et la membrane ou les protéines cytoplasmiques et favoriser le bourgeonnement des granules au niveau du réseau *trans*-Golgi.

Chez certaines protéines telles que les prohormones carboxypeptidase E (CPE), convertases PC1/3 et PC2 et la granine chromogranine A (CgA), le domaine de liaison aux membranes granulaires est porté par un court domaine hydrophobe alpha-hélicoïdal (Dhanvantari *et al.*, 2002 ; Jutras *et al.*, 2000 ; Arnautova *et al.*, 2003 ; Assadi *et al.*, 2004 ; Taupenot *et al.*, 2002). Des résultats récents suggèrent que les hélices alpha capables d'assurer le tri des protéines vers la voie de sécrétion granulaire sont caractérisées par la présence de résidus chargés (positivement ou négativement) ségrégués des résidus hydrophobes (Dikeakos *et al.*, 2007).

Malgré la présence de segments hydrophobes transmembranaires ou alpha-hélicoïdaux dans la séquence des protéines GRA, les études réalisées par microscopie électronique n'ont jamais mis en évidence de protéines GRA associées à la membrane des GD. Ce mécanisme de ciblage granulaire utilisé par diverses protéines mammifères ne semble donc pas transposable aux protéines GRA. Toutefois, certaines études suggèrent que les domaines hydrophobes des protéines GRA pourraient malgré tout être impliqués dans leur tri vers la voie de sécrétion des GD (Karsten *et al.*, 2004).

b) Liaison à des cargos protéiques

Le second groupe de domaines de tri granulaire agit en liant les protéines cargo de la voie de sécrétion granulaire (Dikeakos and Reudelhuber, 2007). Par exemple, la prohormone CPE lie plusieurs autres prohormones granulaires telles que la sécrétogranine III (SgIII) et les retient dans les granules de sécrétion, même si certaines d'entre elles ne constituent pas des substrats de CPE (Hosaka *et al.*, 2005).

Cette liaison de CPE avec certaines prohormones a été décrite comme étant notamment médiée par une boucle hydrophobe N-terminale créée par des ponts disulfures, des résidus acides ou une paire de résidus basiques (Loh *et al.*, 2002 ; Lou *et al.*, 2005 ; Kuliawat *et al.*, 2000). Plus précisément, ces paires de résidus basiques constituent un site de clivage pour une des prohormones convertases granulaires PC1/3 ou PC2 (Brechler *et al.*, 1996). Ainsi, certaines protéases granulaires pourraient jouer le rôle de chaperone pour leur substrat, permettant leur ciblage dans les granules. Enfin, la mucline pourrait être un récepteur cargo granulaire liant les groupements sulfates des protéines O-glycosylées, dans les cellules pancréatiques (Boulatnikov and De Lisle, 2004).

Les protéines GRA2, GRA4 et GRA6 ont été décrites comme étant en complexe au niveau des membranes du RNM (Labruyère *et al.*, 1999). L'annulation du gène GRA2 se traduit par un défaut partiel du ciblage vacuolaire de GRA6 (Mercier *et al.*, 2002). On peut donc envisager la possibilité que des interactions entre protéines GRA existent déjà dans les GD et que certaines jouent le rôle de cargo protéique et facilitent le ciblage de ces protéines dans les GD, d'autant que *Toxoplasma* utilise ce mécanisme de tri sécrétoire pour certaines protéines de micronèmes (Soldati *et al.*, 2001).

c) Agrégation

Le dernier mécanisme responsable du ciblage granulaire mis en évidence chez les mammifères implique la formation de complexes protéiques de haut poids moléculaire ou d'agrégats. Ainsi, les protéines qui se multimérisent ou s'agrègent contribuent à la formation du cœur dense aux électrons observé au niveau de la lumière des granules (Dikeakos and Reudelhuber, 2007). Une corrélation directe, entre la capacité de la granine chromogranine A (CgA) à s'agréger *in vitro* et son tri dans les granules de sécrétion, a été mise en évidence (Jain *et al.*, 2002). Les granines sont des protéines acides qui se regroupent au niveau d'un microenvironnement légèrement acide présent dans les DCG (Dannies, 2001). Une diminution du pH et une augmentation du taux de calcium au niveau du réseau *trans*-Golgi suffisent à provoquer leur agrégation sélective dans ce compartiment (Chanat *et al.*, 1991). Leur agrégation pourrait donc constituer une stratégie afin de prévenir leur exclusion du granule en formation. De plus, des études suggèrent que la sécrétion régulée de CgA et la formation du cœur dense sont liées chez les DCG (Taupenot *et al.*, 2005). CgA pourrait donc être le régulateur principal de la biogénèse des DCG (Kim *et al.*, 2001). Toutefois, cette hypothèse est à moduler par le fait que l'expression d'autres protéines cargo des DCG telles que la chromogranine B (CgB) suffit à induire l'agrégation du contenu des vésicules cytoplasmiques et ce, même dans des cellules dépourvues d'une voie de sécrétion régulée (Beuret *et al.*, 2004). Il est donc probable que CgA comme CgB n'assurent pas à elles seules, toutes les caractéristiques fonctionnelles des DCG et qu'*in vivo*, leur rôle soit compensé (Meldolesi *et al.*, 2004 ; Hendy *et al.*, 2006). Certaines protéines dont le rôle est de stabiliser les ARN messagers des protéines cargo des DCG ou de diminuer leur recyclage, semblent également impliquées dans le processus de formation des DCG (Knoch *et al.*, 2004 ; Kim and Loh, 2006). Enfin, CgA lie d'autres granines partenaires telles que SgIII qui en retour, s'associe au cholestérol et à CPE (Hosaka *et al.*, 2004 ; 2005). L'agrégation pourrait donc être un mécanisme de

ciblage granulaire agissant en synergie avec les interactions protéine-protéine et protéine-membrane afin d'améliorer la rétention des protéines cargo dans les granules en maturation et leur sécrétion régulée.

Les GD sont caractérisés par un contenu dense aux électrons qui suggère un haut niveau de compaction des protéines dont ils assurent le stockage (Dubey *et al.*, 1998). De plus, les protéines sont décrites dans les GD comme étant à la fois sous formes solubles et agrégées (Sibley *et al.*, 1995 ; Labruyère *et al.*, 1999). Par analogie avec les granules mammifères, l'agrégation semble donc constituer un des mécanismes que *Toxoplasma* utilise pour le ciblage de ses protéines vers la voie de sécrétion granulaire.

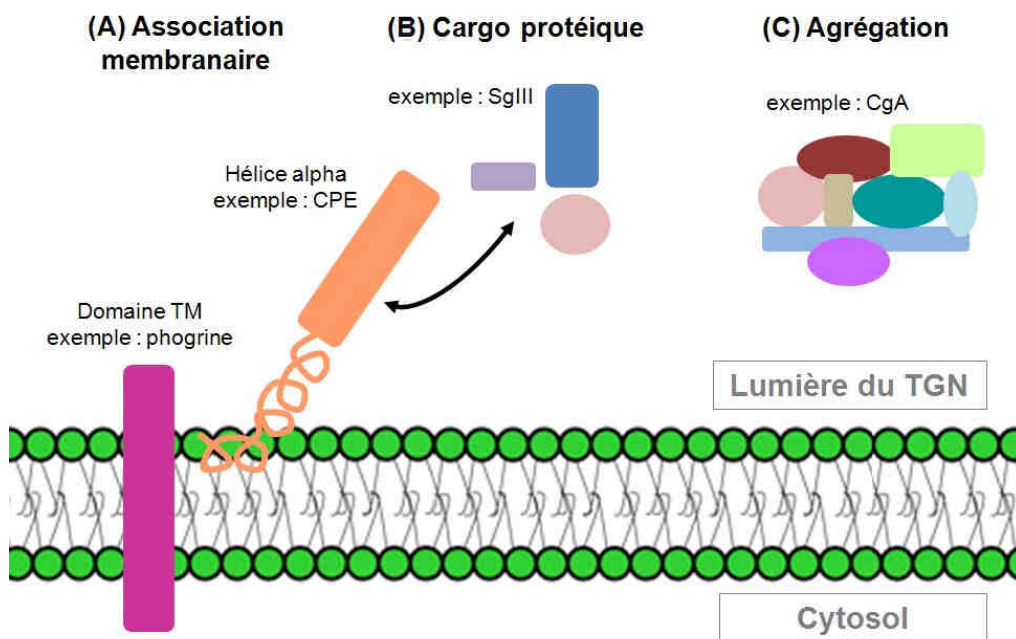


Figure 47 : Tri des protéines mammifères vers la voie de sécrétion granulaire au niveau du réseau *trans*-Golgi (TGN). Le tri des protéines granulaires peut être médié **(A)** par l'association de domaines protéiques aux membranes via l'insertion d'un domaine transmembranaire (TM) (c'est la cas de la phogrine), ou *via* une hélice alpha (c'est le cas de la prohormone carboxypeptidase CPE) ; **(B)** par la liaison à des protéines cargo (c'est le cas de la granine sécrétogranine III (SgIII) qui lie CPE) ou **(C)** leur agrégation (c'est le cas de la granine chromogranine A (CgA)).

d) Synergie des mécanismes évoqués

Certaines protéines regroupent plusieurs de ces différents domaines de tri granulaire. Ainsi, la prohormone proinsuline possède un domaine de liaison à la protéine cargo que constitue la carboxypeptidase CPE, deux sites de clivage caractérisés par des paires de résidus basiques et la capacité de s'héxamériser et de s'agréger. Ces différents signaux de tri granulaire semblent agir en synergie comme le suggère

l'augmentation du tri vers les granules de sécrétion de la chromogranine B chez laquelle la boucle N-Terminale a été dupliquée. Ils semblent donc être fonctionnellement complémentaires (Dikeakos and Reudelhuber, 2007).

Les seuls mécanismes responsables du tri des protéines GRA dans les GD connus comptent : i) leur peptide signal N-Terminal hydrophobe qui cible les protéines solubles vers la voie de sécrétion (Karsten *et al.*, 1998) et ii) la participation potentielle de leur domaine membranaire (Karsten *et al.*, 2004). Par comparaison avec les mécanismes impliqués dans le ciblage des protéines des granules mammifères, les interactions entre protéines GRA et leur agrégation pourraient également assurer cette fonction. Toutefois, établir une analogie plus poussée entre les GD et les granules mammifères reste délicat car les GD sont des vésicules de sécrétion originales qui permettent le stockage et la sécrétion dans la VP, sous formes solubles à 100 000 g, de protéines pour la plupart membranaires. Pour compléter cette revue bibliographique sur les DCG et leur formation, il est donc nécessaire de s'interroger également sur les mécanismes qui permettent de solubiliser des protéines membranaires.

3. Solubilisation des 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 dans la membrane du réticulum endoplasmique dès leur synthèse, 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 (**Figure 48**).

a) 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 qu'après un changement de conformation de la protéine. 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 and Pattus, 1993 ; Facey and 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 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 domaine hydrophobe. Ce sont par ailleurs de petites protéines (<50 kDa) : il n'est donc pas évident qu'elles puissent adopter à elles seules, une conformation enfouissant complètement les résidus hydrophobes.

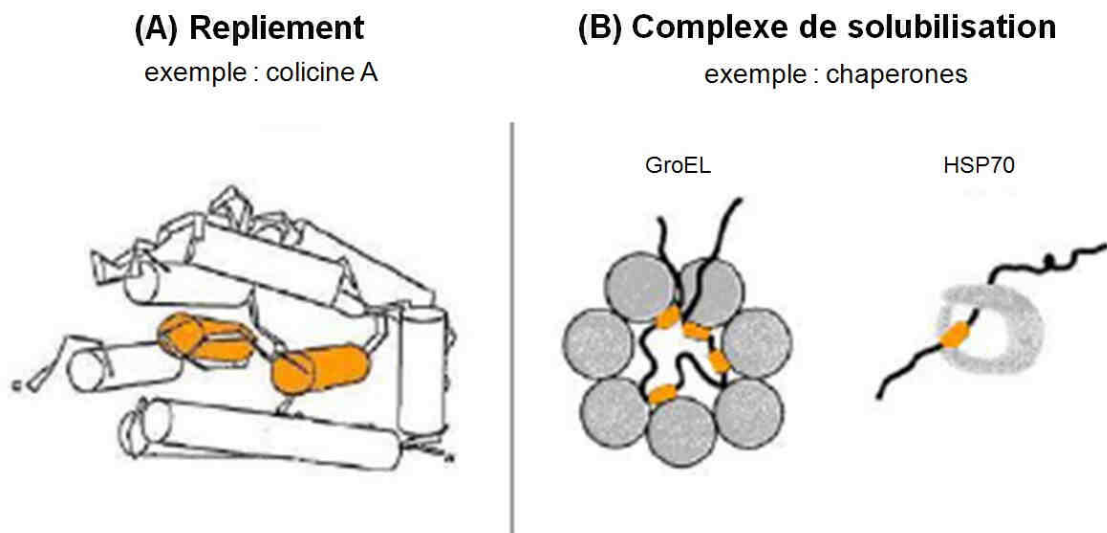


Figure 48 : Formes de solubilisation de protéines à domaines transmembranaires. (A) Forme de solubilisation individuelle : structure tridimensionnelle d'un fragment de la colicine A. Les cylindres représentent des hélices, ceux en orange, hydrophobes, sont complètement enfouis dans la structure ternaire de la protéine, dans cette conformation. **(B)** Complexe de solubilisation. En exemple, l'interaction de certains complexes protéiques de chaperones (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 and Horwich, 1998 ; repris de la thèse de P. Ruffiot, juillet 2007.

b) Trafic en complexe : protection des zones hydrophobes par des cofacteurs

La formation de complexes de solubilisation avec des cofacteurs peut également permettre d'isoler des domaines hydrophobes du milieu environnant. 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 chaperone GroEl peut solubiliser une protéine intégrale de membrane, la bactériorhodopsine (Deaton *et al.*, 2004).

Certaines protéines GRA ayant été décrites comme associées en complexe au niveau des membranes de la VP. On peut envisager qu'il en soit de même au cours de leur trafic depuis les GD. De plus, la présence d'une cyclophiline sécrétée dans la VP, 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 VP.

B. PROBLEMATIQUE

La plupart des protéines GRA possède un domaine central hydrophobe composé de domaines transmembranaires ou d'hélices alpha-amphipatiques. Malgré ces caractéristiques, les protéines GRA ne sont pas décrites associées à la membrane des GD mais au contraire, détectées sous formes solubles à 100 000 g et agrégées dans les GD. De plus, elles sont sécrétées sous formes solubles à 100 000 g dans la VP et ce n'est qu'à cette étape de leur trafic qu'elles acquièrent leur comportement membranaire en s'associant au RNM, à la MVP, aux HOST ou encore aux EVP (Mercier *et al.*, 2005). Comparés aux DCG distribués chez les eucaryotes, les GD de *Toxoplasma* constituent donc un compartiment de sécrétion très original qui permet le stockage sous forme soluble de protéines pour la plupart membranaires (Lecordier *et al.*, 1999).

L'agrégation des protéines GRA dans les GD est en accord avec l'aspect de ces vésicules de sécrétion en microscopie électronique à transmission (Dubey *et al.*, 1998) et plus généralement, avec celui du cœur dense des granules mammifères (Elde *et al.*, 2007). Les granules mammifères assurent le stockage de protéines essentiellement solubles qui peuvent être agrégées ou liées par des interactions protéine-protéine à des protéines associées aux membranes granulaires (Dikeakos and Reudelhuber, 2007). L'état agrégé des protéines GRA pourrait donc correspondre au moyen qu'à choisi *Toxoplasma* pour assurer le ciblage de ses protéines de GD vers la voie de sécrétion. Par contre, la solubilité partielle des protéines GRA dans les GD et lors de leur sécrétion est un phénomène encore inexpliqué. Par analogie avec d'autres protéines présentant les mêmes caractéristiques (Horvath *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2005 ; Fischer *et al.*, 2007 ; Parker and Pattus, 1993 ; Facey and Kuhn, 2004 ; Deaton *et al.*, 2004), cette solubilité

pourrait être la conséquence d'un repliement particulier des protéines GRA, d'interactions protéine-protéine qu'elles pourraient établir entre elles ou avec d'autres protéines qui leur serviraient de chaperones.

De toutes les protéines de GD identifiées à ce jour, les protéines GRA sont les plus nombreuses. Dans cette étude, j'ai choisi de vérifier l'hypothèse la plus probable, c'est à dire l'existence d'interactions entre protéines GRA. Pour cela, plusieurs protéines GRA ont donc été fusionnées à une étiquette HA-FLAG (Saksouk *et al.*, 2005) et purifiées par chromatographie d'affinité sur résine FLAG afin de rechercher leurs protéines GRA partenaires éventuelles. Cette analyse a été réalisée aux différentes étapes de leur trafic, depuis leur stockage dans les GD jusqu'à leur association membranaire post-sécrétoire. En parallèle, afin de mieux comprendre l'état soluble/agrégé des protéines GRA dans les GD, leur comportement biochimique singulier a été étudié par biochimie conventionnelle, en les séparant par phosphocellulose et exclusion de taille.

C. ETUDE DES INTERACTIONS ETABLIES ENTRE PROTEINES GRA, AVANT ET APRES LEUR SECRETION DANS LA VACUOLE PARASITOPHORE

1. « *Purification of Toxoplasma dense granule proteins reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway* »

Article accepté le 13-09-2007 dans le Journal « Molecular and Biochemical Parasitology ».

Cette étude repose essentiellement sur l'analyse de deux protéines modèles : GRA2, protéine du RNM qui constitue le fil conducteur de mes travaux de thèse et GRA5, protéine associée à la MVP et objet d'étude de L. Braun. Notre étude parallèle du comportement biochimique de GRA2 et de GRA5 et des interactions qu'elles établissent avec les protéines GRA a abouti à des résultats convergents, d'où notre collaboration. L'article ci-dessous reprend donc l'ensemble des résultats mis en commun.

Purification of *Toxoplasma* dense granule proteins reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway

Laurence Braun^{1,†}, Laetitia Travier^{1,†}, Sylvie Kieffer², Karine Musset¹, Jérôme Garin², Corinne Mercier¹
and Marie-France Cesbron-Delauw^{1,*}

UMR 5163/CNRS-Université Joseph Fourier, Jean-Roget Institute, ¹ and CEA, DSV, iRTSV, Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes/INSERM, U880, ² Grenoble, France

[†]These two authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Mailing address: UMR 5163-CNRS – Université Joseph Fourier, Institut Jean Roget, Domaine de la Merci, 38700 Grenoble, France. Phone: (33) 4 76 63 74 63. Fax: (33) 4 76 63 74 97. E-mail: marie-france.cesbron@ujf-grenoble.fr.

ABSTRACT

Dense granules are Apicomplexa specific secretory organelles. In *Toxoplasma gondii*, the dense granules proteins, named GRA proteins, are massively secreted into the parasitophorous vacuole (PV) shortly after invasion. Despite the presence of hydrophobic membrane segments, they are stored as both soluble and aggregated forms within the dense granules and are secreted as soluble forms into the vacuolar space where they further stably associate with PV membranes. In this study, we explored the unusual biochemical behavior of GRA proteins during their trafficking. Conventional chromatography indicated that the GRA proteins form high globular weight complexes within the parasite. To confirm these results, Δ GRA knocked-out parasites were stably complemented with their respective HA-FLAG tagged GRA2 or GRA5. Purification of the tagged proteins by affinity chromatography showed that both the soluble GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG associate with several GRA proteins, the major ones being GRA3, GRA6 and GRA7 within the parasite and the PV soluble fraction. Following their insertion into the PV membranes, GRA2-HA-FLAG associated with GRA5 and GRA7 while GRA5-HA-FLAG associated with GRA7 only. Taken together, these data suggest that the GRA proteins form oligomeric complexes that may explain their solubility within the dense granules and the vacuolar matrix by sequestering their hydrophobic domains within the interior of the complex. Insertion into the PV membranes correlates with the decrease of the GRA partners number.

KEYWORDS: Protozoa; *Toxoplasma gondii*; Dense granule; Parasitophorous vacuole; Protein-protein interactions

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an important cause of birth defects and opportunistic infections in immunocompromised patients. This protozoan parasite belongs to the Apicomplexa phylum that includes pathogens responsible for major human or animal infectious diseases such as malaria, coccidiosis, babesiosis or cryptosporidiosis. *T. gondii* is an obligate intracellular parasite that invades all nucleated cells within its warm-blooded, vertebrate hosts. Successful intracellular development is based on an active invasion process that leads to the formation of a new sub-cellular compartment, named the parasitophorous vacuole (PV). The PV is totally isolated from the endocytic and lysosomal pathways: *T. gondii* is peculiar in that it excludes most of the host cell plasma membrane proteins from the nascent PV membrane at the time of parasite entry [1]. The parasite extensively modifies the newly formed PV by the secretion of numerous proteins from the parasite rhoptries and dense granules [2; 3] and by establishing an

intravacuolar membranous network which connects the parasite to the PV membrane [4; 5]. The PV, located at the interface between the parasite and its host cell, would offer protection and nutrients to allow efficient parasite multiplication [6; 2].

Nine specific dense granule proteins, GRA1-9 and several enzymes, including two nucleoside triphosphate hydrolases (NTP-ases) and two protease inhibitors have been characterized in *T. gondii* dense granules [2]. The GRA proteins form a group of relatively small proteins (21-41 kDa) which do not present any significant similarity with any protein of known function. However, a genetic approach based on specific deletion of one or several *GRA* genes from the *Toxoplasma* genome showed that i) GRA2 induces the formation of the vacuolar membranous network which is stabilized by GRA6 [7] and ii) GRA7 is a necessary component for the formation of host microtubules-based invaginations of the PV membrane that serve as conduits for nutrient acquisition from the host cytoplasm to the PV lumen [6]. The GRA proteins possess an N-terminal hydrophobic signal peptide, and with the exception of GRA1, they all contain a central hydrophobic domain, either a single transmembrane domain (GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8) or amphipathic alpha-helices (GRA2 and GRA9) [2]. Despite their central hydrophobic domain, the GRA proteins were never observed associated with the dense granules membranes but they were rather detected within the dense granule matrix as both soluble and aggregated forms [4; 8]. Following secretion into the PV, most of the GRA proteins appear as both soluble and membrane-associated components of the PV [4; 8; 9; 10]. Within this compartment, they are differentially targeted. Whereas GRA3, GRA5, GRA7 and GRA8 associate preferentially with the PV membrane, GRA2, GRA4, GRA6 and GRA9 and to a lesser extend, GRA3, GRA5 and GRA7 localize at the tubulovesicular network [2]. Within these membranes, GRA2, GRA4 and GRA6 were described as forming a multimeric protein complex [8].

The mechanism by which dense granule proteins are maintained in a soluble form within the dense granule secretory organelles while adopting a transmembrane topology in the PV membrane or the tubulovesicular network is poorly understood. To further explore this unusual biochemical behavior of the GRA proteins during their trafficking, we investigated the interactions between the GRA proteins by using conventional and affinity chromatography techniques applied to whole cell extract or PV extract. We showed that within the parasite, the GRA proteins seem to form oligomers and establish numerous interactions with other GRA proteins while most of these interactions are not preserved following membrane insertion.

MATERIALS AND METHODS

Parasite and cell culture

Tachyzoites of the *T. gondii* RH strain (ATCC-50174), the GRA knock-out mutants Δ GRA2-HXGPRT (Travier, Cesbron-Delauw and Mercier, unpublished data), Δ GRA5-HXGPRT [11] were grown in HFF (primary human foreskin fibroblasts; ATCC-CRL 1634) or in HeLa cells (ATCC-CCL 2) in DMEM

(GibcoBRL) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine and in the presence of penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml).

Antibodies and immunoblot detection

Primary antibodies used in this study for immunofluorescence and/or immunoblot analysis included the mouse monoclonal antibodies (mAbs) TG17-43 anti-GRA1, TG17-179 anti-GRA2, TG17-113 anti-GRA5 [12], TG2H11 anti-GRA3 (gift from J.F. Dubremetz; UMR 5539 CNRS - University of Montpellier 2) [13], BATO 214 anti-GRA7 (Innogenetics) [14]; rabbit sera anti-GRA4, anti-GRA6 (gift from L.D. Sibley; Washington University, St. Louis, MO) [8], anti-GRA9 (gift from W. Däubener; Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany) [15], anti-Hsp90 (gift from S.O Angel; IIB-INTECH CONICET-UNSAM, Buenos Aires) [16] and anti-HA.

Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose by liquid transfer and western blots were probed using appropriate primary antibodies followed by peroxidase-conjugated goat secondary antibodies. Signals were detected using the Supersignal ECL system (Pierce Chemical).

Plasmid constructions

GRA2-HA-FLAG. A 880 bp fragment of the *GRA2* 5'-untranslated region and the *GRA2* ORF without the stop codon and a 400 bp fragment of the *GRA2* 3' region, respectively, were amplified by PCR from the *GRA2* cDNA (KS+/cG2 (5'*Pst*I-3'*Sal*I)) [17] with the primers [(5'-GACGGATCCGTTTCGTCGCAAAGG-3'); (5'-TACGAATTCCTGCGAAAAGTCTGGGACG-3')] and [(5'-ATCAAGCTTCTACGACGAAAAGTGATGCGCAG-3); (5'-GCAGGTACCGTCTGACTGGAAGTACGGTG-3')], respectively. These PCR fragments were cloned into the pMAH4 vector [18] between the *Bam*HI and *Eco*RI sites and the *Hind*III and *Kpn*I sites, respectively, in frame with a C-terminal HA-FLAG tag, yielding to pGRA2-HA-FLAG.

GRA5-HA-FLAG. A 900 bp fragment of the *GRA5* 5'-untranslated region and a 375 bp fragment of the *GRA5* 3' region were amplified by PCR from the genomic clone containing the *GRA5* gene [19] with the primers [(5'-CGGGATCCTGGTTCTCTACACGTTGCAA-3'); (5'-TCCCCGGGAGACGCCATTTTGTACTTCAC-3')] and [(5'-CCCGCTCGAGGGGGCACTGTGTTGCTCG-3'); (5'-GGGGTACCGCGCCTTGTGTGCGAATCA-3')], respectively. These PCR fragments were cloned into the pMAH4 vector between the *Bam*HI and *Sma*I sites and the *Xho*I and *Kpn*I sites, respectively. A 360 bp fragment encoding the *GRA5* ORF without the stop codon, amplified by PCR from the genomic clone containing the *GRA5* gene [19] with the primers [(5'-TCCCCGGGGTAAAAGCGGTCGTTGTGG-3'); (5'-CGGAATTCCTCTTCCTCGGCAACTTCTT-3')], was inserted in-frame, upstream of the HA-FLAG tag into the 5' *GRA5*/3' *GRA5* plasmid digested by *Sma*I and *Eco*RI, yielding to pGRA5-HA-FLAG.

Transfection and selection of stable transformants

Freshly isolated tachyzoites Δ *GRA2-HXGPRT* or Δ *GRA5-HXGPRT* were electroporated as described [20]

with pGRA2-HA-FLAG or pGRA5-HA-FLAG, respectively. Transfected parasites were selected for incorporation of both xanthine and mycophenolic acid (HXGPRT selection) [21] and cloned by limiting dilution as described previously [22].

Indirect immunofluorescence

Freshly lysed parasites and confluent HFF monolayers infected with *Toxoplasma* parasites for 24 h, were washed in PBS and fixed for 20 min in 5% formaldehyde. After three washes, extracellular parasites were fully permeabilized for 10 min with 0.1% Triton X-100 and both the host cell membrane and the PV membrane of infected cells were selectively permeabilized with 0.002% saponin. When used, the same concentration of saponin was maintained throughout the staining process. Extracellular parasites and infected cells were blocked with 5% FBS and 5% goat serum in PBS for 1 h, stained for 1 h with rabbit serum anti-HA and 1 h with the mAb anti-GRA2 or anti-GRA5 and then incubated with secondary antibodies (Bodipy FL-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) and Texas-Red-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L), Molecular Probes). Coverslips were mounted on slides using Prolong Anti-Fade Reagent (Molecular Probes) and observed using an Axioplan 2 (Carl Zeiss) equipped for phase contrast and epifluorescence microscopy. Images were acquired at the magnification x100, using an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss) coupled to the Axiovision 3.1 software (Carl Zeiss).

Cell fractionation of intracellular parasites

The behavior of GRA proteins in the vacuolar compartment was examined by cell fractionation of overnight infected cells. Following mechanical disruption of host cells by syringing and elimination of intracellular parasites, the soluble fraction (HSS for high-speed supernatant) was separated from the membrane-associated fraction (HSP for high-speed pellet) by 1 h ultracentrifugation at 100,000 x *g* [4]. To release membrane-associated proteins, the HSP fractions were treated with 0.5% Nonidet P-40 (NP-40) for 30 min on ice. The membranous solubilized fraction (HSPsol) was separated from the membranous insoluble fraction (HSP HSP) by a 1 h ultracentrifugation at 100,000 x *g*. Proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting.

Chromatographic purification of GRA proteins

Extracellular parasites of the RH strain were collected by centrifugation and lysed with buffer A (20 mM Tris [pH 7.9], 20% glycerol, 500 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF). The whole cell extract obtained after centrifugation at 12,000 x *g* for 1 h was loaded onto a 250 ml column of phosphocellulose (P11; Whatman) and fractionated stepwise by the indicated KCl concentrations in buffer B (20 mM Tris [pH 7.9], 10% glycerol, 0.2 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 1 mM PMSF). The P11 0.1 and 1 M KCl fractions enriched in GRA proteins were fractionated on a 24-ml Superose 6 HR 10/30 gel filtration column (Pharmacia) after equilibration of the column in buffer B supplemented with 500 mM KCl. Eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting.

Affinity chromatographic purification of recombinant GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG

To purify GRA2- or GRA5-HA-FLAG, extracellular parasites (5×10^{10}) were collected by centrifugation and lysed with buffer A. The whole cell extract obtained after centrifugation at $12,000 \times g$ for 1 h was incubated with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma). After extensive washes with buffer C (buffer B containing 500 mM KCl), the affinity column was eluted with buffer C containing FLAG peptide (250 μ g/ml; Sigma) according to the manufacturer's instructions and then washed with buffer C. Eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting.

Mass spectrometry peptide sequencing

Protein bands were excised from colloidal blue-stained gels (Invitrogen), oxidized with 7% H_2O_2 , and subjected to in-gel tryptic digestion. Peptides were extracted with a 5% (vol/vol) formic acid solution and acetonitrile and injected into a CapLC (Waters) [23]. Tandem mass spectrometry data were acquired and processed automatically by using MassLynx 3.5 software (Waters). Tandem mass spectra were searched against a compiled *T. gondii* database by using the MASCOT program (<http://www.matrixscience.com>).

RESULTS

The GRA proteins form high globular weight complexes within the parasite

To gain insight into the biochemical properties of most GRA proteins characterized so far within the dense granules, we performed fractionation of RH-whole cell extract on a phosphocellulose (P11). The GRA proteins behaved differently: GRA1, GRA5 and GRA9 were enriched exclusively in the 100 mM KCl elution fraction. GRA2 peaked at 500 mM KCl and was also detected in the 1 M KCl elution fraction. GRA7 was enriched mainly in the 1 M KCl elution fraction while both GRA3 and GRA6 were enriched both in the 100 mM and 1 M KCl elution fractions. GRA4 was present in the four fractions with a slight enrichment at 1 M (Fig. 1A). These data indicate that within the dense granules, the GRA proteins form predominantly two protein groups with different biochemical behavior: GRA1, GRA3, GRA5, GRA6 and GRA9 share weak ionic properties while GRA2, GRA3, GRA4, GRA6 and GRA7 harbor strong ionic properties.

Fractionation of the 100 mM KCl fraction on a Superose 6 column showed that GRA3, GRA5 and GRA6 have a common spreading elution profile which covers fractions with an apparent molecular mass > 1 MDa to 400 kDa (Fig. 1B). Whereas GRA4 is detected in all the Superose 6 fractions, GRA9 exhibited an elution profile consistent with a complex of 400 kDa (Fig. 1B, fraction 26 was the peak). In contrast, GRA1 eluted at molecular weights < 400 kDa (Fig. 1B). Fractionation of the 1 M KCl fraction showed that GRA2 elutes mainly in the low molecular weight fractions with a trail in the higher ones (Fig. 1C, fraction 32 was the peak) whereas GRA3, GRA4, GRA6 and GRA7 are embedded in a large complex with an apparent molecular > 1 MDa (Fig. 1C). GRA4 also eluted in the low molecular weight fractions (fig. 1C). These results suggest the existence of two distinct types of GRA protein-containing complexes: large complexes

which include transmembrane domain-containing proteins GRA3, GRA5, GRA6 and GRA7 and smaller complexes in the case of amphipathic helices-containing proteins such as GRA2 or GRA9.

The GRA proteins establish numerous interactions with other GRA proteins within the parasite

To gain insight into the nature of these GRA-containing complexes, we asked whether the GRA proteins would form stable associations within the dense granules. To this end, we generated stable transgenic parasites expressing HA-FLAG epitope-tagged GRA2 or GRA5. Each chimeric protein was stably and ectopically expressed under the control of its own promoter in either Δ GRA2-HXGPRT (Travier et al., unpublished results) or Δ GRA5-HXGPRT [11] knock-out strains. Both recombinant proteins co-localized with endogenous dense granule proteins in fully permeabilized extracellular parasites (Fig. 2A, left). Within the PV, GRA2-HA-FLAG was detected within the vacuolar space whereas GRA5-HA-FLAG was associated with the PV membrane (Fig. 2A, right). These results thus showed that the HA-FLAG epitope tag does not interfere with the intracellular localization of both GRA2 and GRA5.

We examined the GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG containing complexes by utilizing the epitope tag for affinity purification. GRA2-HA-FLAG or GRA5-HA-FLAG were immunoprecipitated from extracellular parasite whole cell extract using anti-FLAG antibody followed by sequential elutions of the bound proteins with FLAG peptide. For all the following epitope tag chromatography purifications, only the proteins which were detected at least as intensely in the FLAG elutions and the "Input" fractions will be considered as associated with the purified protein. Analysis of the elution fractions by SDS-PAGE and immunoblot using anti-GRA antibodies showed the respective enrichment of GRA2 and of GRA5 (Fig. 2B and 2C, respectively). GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG co-eluted with GRA3, GRA6 and GRA7 (Fig. 2B and 2C, respectively). GRA1 was also weakly detected when purifying GRA5-HAFLAG (Fig. 2C). A similar pattern of interaction was observed with GRA3-HA-FLAG ectopically expressed under the control of its own promoter in RH strain or with GRA6-HA-FLAG ectopically expressed under the control of its own promoter in Δ GRA6-HXGPRT [7] (data not shown). However, the lack of stoichiometric enrichment of GRA3, GRA6 and GRA7 with either GRA2-HA-FLAG or GRA5-HA-FLAG (Fig. 2B and 2C) suggests that these proteins may not form a strong core complex.

To evaluate the globular weight of the purified GRA5-HA-FLAG protein and of its potential partners, we run the FLAG-elution fractions E1 to E3 (Fig. 2C) into a Superose 6 gel filtration column. To minimize the background level, the development time of silver staining was reduced and consequently, the 22 kDa GRA5-HA-FLAG protein was not detected in the eluted fractions. Instead, a band of 100 kDa (fractions 18 to 26), a doublet at 64 kDa and lower faint bands (fractions 18 to 40, with a peak between fractions 26 and 32) were revealed (Fig. 3A). Probing the same fractions with the anti-HA (Fig. 3B) and the anti-GRA5 (Fig. 3C) antibodies revealed the presence of the 22 kDa GRA5-HA-FLAG on both blots with a peak between the fractions 26 and 32. Interestingly, while the 64 kDa doublet was also detected by both antibodies, indicating oligomerization of GRA5, the 100 kDa band and the lower bands were not revealed by any of the antibodies (Fig. 3B and C). Mass spectrometry analysis of fractions 20 to 22 (Fig. 3D) confirmed that the 64 kDa doublet corresponds to GRA5 multimers, the doublet likely corresponding to yet unidentified post-translational modifications. The lower bands would correspond to degradation products of the 64 kDa

doublet and they were thus not further analyzed. Mass spectrometry also identified the major band migrating at around 100 kDa as TgHsp90b (accession number [DQ004747](#)), a heat shock protein that may play a role in stage interconversion [16] and distinct from the TgHsp90 previously described as being secreted into the PV [24].

Vacuolar soluble GRA proteins establish numerous interactions with one another while these are reduced consecutively to post-secretory membrane insertion

Following secretion into the PV, with the exception of GRA1 which remains soluble within the PV matrix, all the GRA proteins associate either with the PV membrane (GRA3, GRA5, GRA7 and GRA8) or with the intravacuolar tubular network (GRA2, GRA4, GRA6 and GRA9, and to a lesser extent GRA3, GRA5 and GRA7) [2]. To study the GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG containing complexes formed within the PV, we examined the partitioning of the both proteins after mechanical disruption of overnight infected cells [4]. This treatment, followed by low-speed centrifugation, allows separation of intact parasites from both the host cell and vacuolar lysate that was further sedimented at 100,000 x g to obtain a soluble phase and a membrane pellet. Both GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG α -FLAG affinity were carried out from either the vacuolar soluble fraction (HSS) or the solubilized membranous fraction (HSP sol). Immunoblot analysis showed that GRA2-HA-FLAG (Fig. 4A and 4B) and GRA5-HA-FLAG (Fig. 4C and 4D) were highly enriched from both the HSS and the HSP sol fractions. The lack of detection or the very weak level of detection of GRA5 and GRA6 in the inputs (Fig. 4A, B and C) indicated a very high enrichment of the corresponding proteins. In the HSS fraction, as observed in the parasite fractions (Fig. 2B, C), GRA3, GRA6 and GRA7 co-eluted with both GRA2-HA-FLAG (Fig. 4A) and GRA5-HA-FLAG (Fig. 4C). Additionally, GRA9 and GRA1 in a lesser extent, were also detected in association with GRA2-HA-FLAG (Fig. 4A) while GRA4 and GRA1 were also found weakly associated with GRA5-HA-FLAG (Fig. 4C). These results confirmed the numerous interactions observed in the parasite and suggest that these interactions are maintained after secretion into the vacuole. In the PV solubilized membranous fraction, whereas GRA5 and GRA7 co-eluted with GRA2-HA-FLAG (Fig. 4B), only GRA7 was faintly detected in association with GRA5-HA-FLAG (Fig. 4D). Taken together, these results indicate that the interactions established by GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG within the PV soluble fraction are essentially lost after their post-secretory membrane insertion.

DISCUSSION

In this study, we showed by a biochemical approach that the GRA proteins form high globular weight complexes within the parasite. The nature of their hydrophobic domain, either a single transmembrane (GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7 and GRA8) or amphipathic alpha-helices (GRA2 and GRA9) seems to influence the molecular weight of the complexes, larger or smaller, respectively. In

addition, we showed that both the soluble GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG are mainly associated with GRA3, GRA6 and GRA7 within both the parasites and the PV soluble compartment, following secretion. After their insertion within the PV membranes, GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG are associated with GRA5 and GRA7 only or with GRA7, respectively.

Currently, there is no data about the interactome of *Toxoplasma* GRA proteins since no protocol of dense granules purification has been successfully developed. Using HA-FLAG tagged proteins, we were able for the first time, to purify GRA proteins and to decipher their interplay during their subcellular trafficking. The observed interactions are relatively strong since we used high stringency conditions for our biochemical analyses.

Despite their central hydrophobic segments, the GRA proteins were not localized by immunogold at the dense granule membrane and they were not showed to behave as membrane-associated proteins within the parasite. Instead, they were shown to be packaged as soluble and aggregated forms within the dense granules [17; 8-10]. In addition, their density, as observed by transmission electronic microscopy, suggests a high degree of compaction. Furthermore, since dense granules do not constitute a degradative compartment, condensation of proteins is unlikely to occur because of acidic pH [2]. Thus, at the biochemical level, it remains unclear how the GRA proteins are stored within the dense granules until their secretion into the PV. Here, using gel filtration, we showed the formation of high molecular weight complexes within the parasite. These could correspond to oligomeric complexes, which may be related to the high degree of compaction of the GRA proteins within dense granules. Moreover, the degree of oligomerisation could explain why both soluble GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG are associated with the same GRA proteins while they are contained in complexes of different molecular weights. Interestingly, the GRA proteins that contain a transmembrane domain behave similarly in being included in very large complexes with an apparent molecular weight > 1 MDa. Such oligomeric complexes could hide the hydrophobic domains of GRA proteins and be involved in their soluble state throughout the secretory pathway.

This study also highlighted the interaction of TgHsp90b (accession number [DQ004747](#)) with GRA5-HA-FLAG oligomers within the parasite. This interaction was not detected for GRA2-HA-FLAG or GRA6-HA-FLAG (data not shown). TgHsp90b was detected exclusively within the tachyzoite cytosol [16]. We confirmed the lack of TgHsp90b within the PV by immunofluorescence and immunoblotting from parasites expressing GRA2- or GRA5-HA-FLAG (data not shown). A key function of chaperones is to bind hydrophobic regions in their cognate proteins, shielding them from exposure. Since GRA5 contains one transmembrane region, a potential role for TgHsp90b may be to mask this hydrophobic domain during the GRA5 traffic from the endoplasmic reticulum to the dense granules; in its absence, GRA5 would be trapped either as aggregates or degraded, and thus failed to be secreted. Inner vesicles of multivesicular precursors containing rhoptry proteins were shown to be delivered to mature rhoptries along a pathway involving the vacuolar protein sorting 4 VPS4 chaperone [25]. Furthermore, traffic of microneme proteins (MICs) to the micronemes depends on the formation of different MICs complexes within the early compartments of the secretory pathway (MIC1, MIC4 and MIC6; MIC8 and MIC3; MIC2 and M2AP) [26]. The identification of a GRA5 specific complex-containing the TgHsp90b chaperone suggests that this mode

of sorting might be generally and successfully exploited by *Toxoplasma*.

A multimeric protein complex of GRA2, GRA4 and GRA6 was previously described within the membranes of the nanotubular network [8]. This multimeric complex was revealed using the DSP cross linking reagent, which bridges proteins that are separated by ≤ 12 Å. Unless addition of HA-FLAG to the C-terminus of GRA2 would alter the binding of GRA4 and/or of GRA6 in the vacuolar membranes, our data are not in favor of a direct interaction between GRA2, GRA4 and GRA6 in the membrane fraction. Indeed, GRA4 and GRA6 were never copurified with GRA2-HA-FLAG from the vacuolar solubilized membrane fraction. It is thus possible that GRA2, GRA4 and GRA6 are close enough at the network membranes to be crosslinked by DSP without establishing direct interactions.

Interestingly, within the vacuolar membranes, GRA2-HA-FLAG is associated with both GRA5 and GRA7, supporting the fact that these proteins would traffic to the PV membrane *via* a transitory step in the membranous network [2].

In conclusion, we have demonstrated the formation of high molecular weight GRA oligomers in which some GRA proteins intimately associate both within the dense granules and the soluble compartment of the PV. These interactions are presumably necessary to provide sufficient affinity for solubilization. Full composition of these oligomers now remains to be determined, although we already know that the core structure contains several GRA proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr M.A. Hakimi who showed interest in this work, provided helpful advice in biochemistry, and a critical scientific evaluation of the results. Thanks go to J.F. Dubremetz for the monoclonal antibody against GRA3, L.D. Sibley for the polyclonal antibodies against GRA4 and GRA6, D. Jacobs from Innogenetics for the monoclonal antibody against GRA7 and K.D.Z. Adjogble and W. Däubener for the polyclonal antibody against GRA9. This work was supported by CNRS. L. Travier was a recipient of a PhD fellowship from the Région Rhône-Alpes followed by a temporary research/teaching position at the University of Pharmacy, Grenoble.

REFERENCES

- [1] Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M. and Sibley, L.D. (1999) Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med.* **190**, 1783-1792.
- [2] Mercier, C., Adjogble, K.D.Z., Däubener, W. and Cesbron-Delauw, M.F. (2005) Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all Apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* **35**, 1611-1620.

- [3] Dubremetz, J.F. (2007) Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell. Microb.* **9**, 841-848.
- [4] Sibley, L.D., Niesman, I.R., Parmley, S.F. and 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 *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* **108**, 1669-1677.
- [5] Magno, C.R., Lemgruber, L., Vommaro, R.C., De Souza, W. and Attias, M. (2005) Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Tech.* **67**, 45-52.
- [6] Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C. and Joiner, K.A. (2006) *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell.* **125**, 261-274.
- [7] Mercier, C., Dubremetz, J.F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L.D. and Cesbron-Delauw, M.F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 2397-2409.
- [8] Labruyère, E., Lingnau, M., Mercier, C. and Sibley, L. D. (1999) Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **102**, 311-324.
- [9] Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L.D. and Cesbron-Delauw, M.F. (1999) Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 1277-1287.
- [10] Adjogble, K.Z., Mercier, C., Dubremetz, J.F., Hucke, C., MacKenzie, C.R., Cesbron-Delauw, M.F. and Däubener, W. (2004) GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int. J. Parasitol.* **34**, 1255-1264.
- [11] 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**, 247-251.
- [12] Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M.F. and Capron, A. (1990) *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* **71**, 114-124.
- [13] Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A. and Dubremetz, J. F. (1991) Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* **103**, 321-329.
- [14] Saavedra, R., De Meuter, F. and Herion, P. (1990) Monoclonal antibodies identify new *Toxoplasma gondii* soluble antigens. *Hybridoma.* **9**, 453-63.
- [15] Nockemann, S., Dlugonska, H., Henrich, B., Kitzerow, A. and Däubener, W. (1998) Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted-secreted antigen (ESA) from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **97**, 109-121.
- [16] Echeverria, P.C., Matrajt, M., Harb, O.S., Zappia, M.P., Costas, M.A., Roos, D.S., Dubremetz, J.F.

- and Angel, S.O. (2005) *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated. *J. Mol. Biol.* **350**, 723-734.
- [17] Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.F. and Sibley, L.D. (1998) The amphipatic alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J. Cell Sci.* **111**, 2171-2180.
- [18] Saksouk, N., Bhatti, M.M., Kieffer, S., Smith, A.T., Musset, K., Garin, J., Sullovan, W.J., Cesbron-Delauw, M.F. and Hakimi, M.A. (2005) Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10301-10314.
- [19] Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J., Maes, P., Tartar, A., Capron, A., Cesbron-Delauw, M.F. (1993) *Toxoplasma gondii* : molecular structure of a dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 143-153.
- [20] Soldati, D. and Boothroyd, J.C. (1993) Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science.* **260**, 349-52.
- [21] Roos, D.S., Donald, R.G., Morissette, N.S., Moulton, A.L. (1994). Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Meth. Cell. Biol.* **45**, 27-63.
- [22] Knoll, L.J. and Boothroyd, J.C. (1998) Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 807-814.
- [23] Ferro, M., Salvi, D., Brugiére, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J. and Rolland, N. (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 325-345.
- [24] Ahn, H.J., Kim, S. and Nam, H.W. (2003) Molecular cloning of the 82-kDa heat shock protein (HSP90) of *Toxoplasma gondii* associated with the entry into and growth in host cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 654-659.
- [25] Coppens, I. and Vielemeyer, O. (2005) Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa : from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. *Int. J. Parasitol.* **35**, 597-615.
- [26] Soldati, D., Dubremetz, J.F. and Lebrun, M. (2001) Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **31**, 1293-1302.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: Analysis of the biochemical behavior of the GRA proteins within parasites by conventional

chromatography from a wild type whole cell extract.

(A) The whole cell extract (Input) was fractionated by using P11 adsorption chromatography as described in "Materials and methods" and the fractions were analyzed by Western blot using antibodies shown to the left of the figure. The 0.1 M KCl (B) and 1 M KCl (C) elution fractions were further fractionated by Superose 6 gel filtration and the elution fractions (numbers at the top of each gel) were analyzed by Western blot.

Fig. 2: Purification of GRA2 and GRA5 from parasite whole cell extract.

(A) Recombinant GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG, stably expressed in the Δ GRA2-HXGPRT or the Δ GRA5-HXGPRT mutants, respectively, were analyzed by indirect immunofluorescence of freshly lysed parasites and of HFF cells infected for 24 h. Extracellular parasites were permeabilized with 0.1% Triton-X100 (left) and infected cells, with 0.002% saponin (right) and labeled with the rabbit serum anti-HA and the mAb anti-GRA2 (GRA5-HAFLAG) or the rabbit serum anti-HA and the mAb anti-GRA5 (GRA2-HA-FLAG). GRA2-HA-FLAG (B) and GRA5-HA-FLAG (C) were affinity purified with an anti-FLAG M2 affinity column. Proteins that did not attach to the resin were collected (Flow Through or FT) and proteins linked to the FLAG resin were eluted with the FLAG peptide (E1-E5). The elution fractions were further analyzed by Western blot using anti-GRA antibodies shown to the left of the figure.

Fig. 3: Analysis of affinity-purified GRA5-HA-FLAG by Superose 6 gel filtration.

The FLAG-elution fractions E1 to E3 (Fig. 2C) were separated on a Superose 6 gel filtration column. Proteins were visualized by silver nitrate staining (A) and immunoblot using anti-HA (B) and anti-GRA5 (C) antibodies. Fractions 20-22 were trichloroacetic acid precipitated, separated by SDS-PAGE (4% to 12%), and visualized by colloidal blue staining (D). Note that the GRA5-HA-FLAG monomer band was not observed (A), due to reduced development time of the silver staining to minimize the background. Molecular weight markers are indicated on the left of the figure. The proteins identified by mass spectrometry sequencing are indicated. The asterisk indicates a silver negative coloration of GRA5-HA-FLAG.

Fig. 4: Purification of GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG from the vacuolar fractions.

Cells infected overnight with the recombinant parasites Δ GRA2-HXGPRT or Δ GRA5-HXGPRT expressing GRA2-HA-FLAG (A and B) or GRA5-HA-FLAG (C and D), respectively, were fractionated as described in "Materials and methods". After separation of the vacuolar soluble fraction (HSS) from the vacuolar and host cell membranes (HSP) by ultracentrifugation, the membranes (HSP) were solubilized with 0.5% NP-40. The membranous solubilized fraction (HSP sol) was separated from the membranous insoluble fraction (HSP HSP). GRA2-HA-FLAG and GRA5-HA-FLAG were purified by affinity chromatography on a FLAG resin from the HSS (A and C) and the HSP sol fractions (B and D), as described on fig. 2. The elution fractions were further analyzed by immunoblot using anti-GRA antibodies shown to the left of the figure.

Figure 1

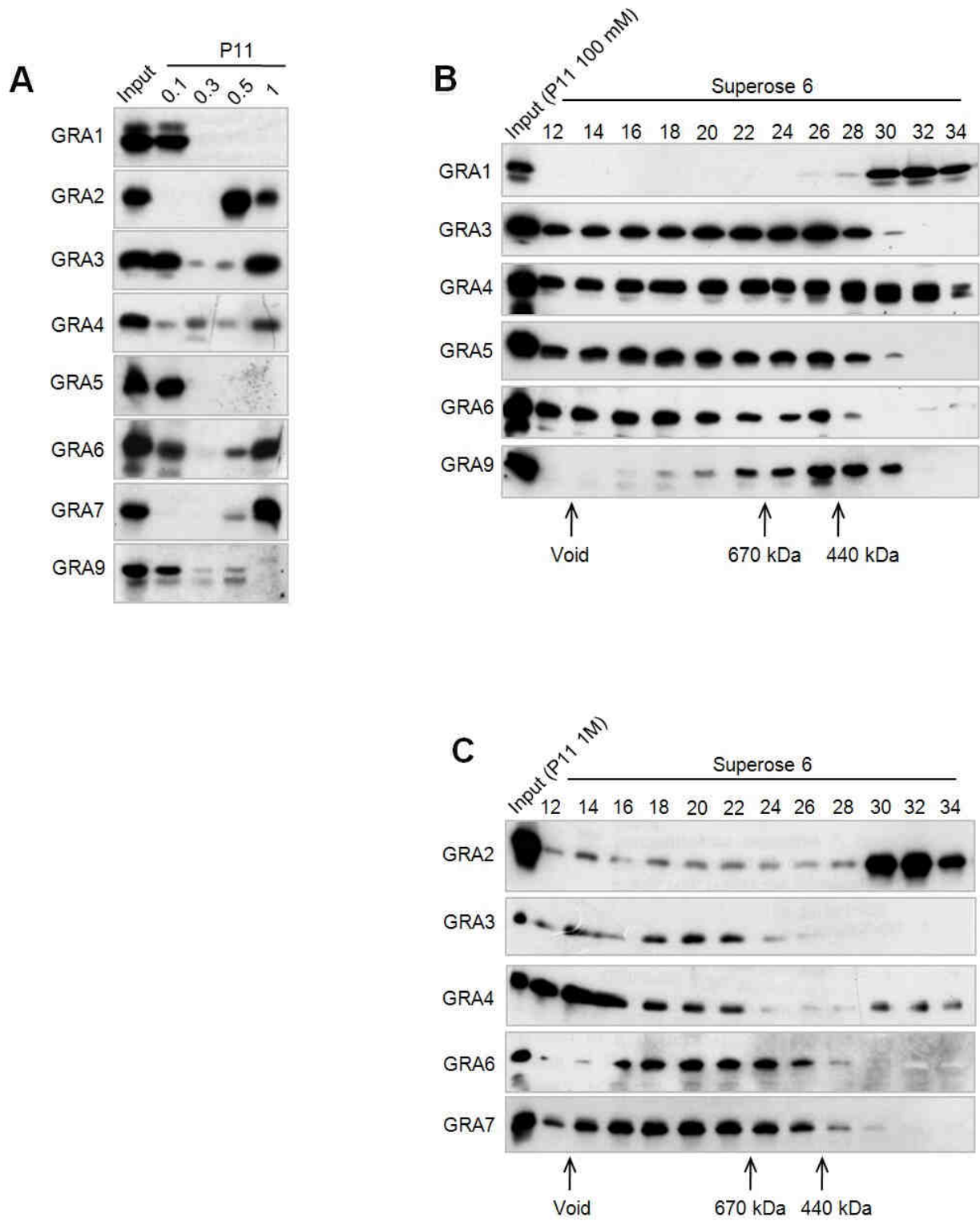


Figure 3

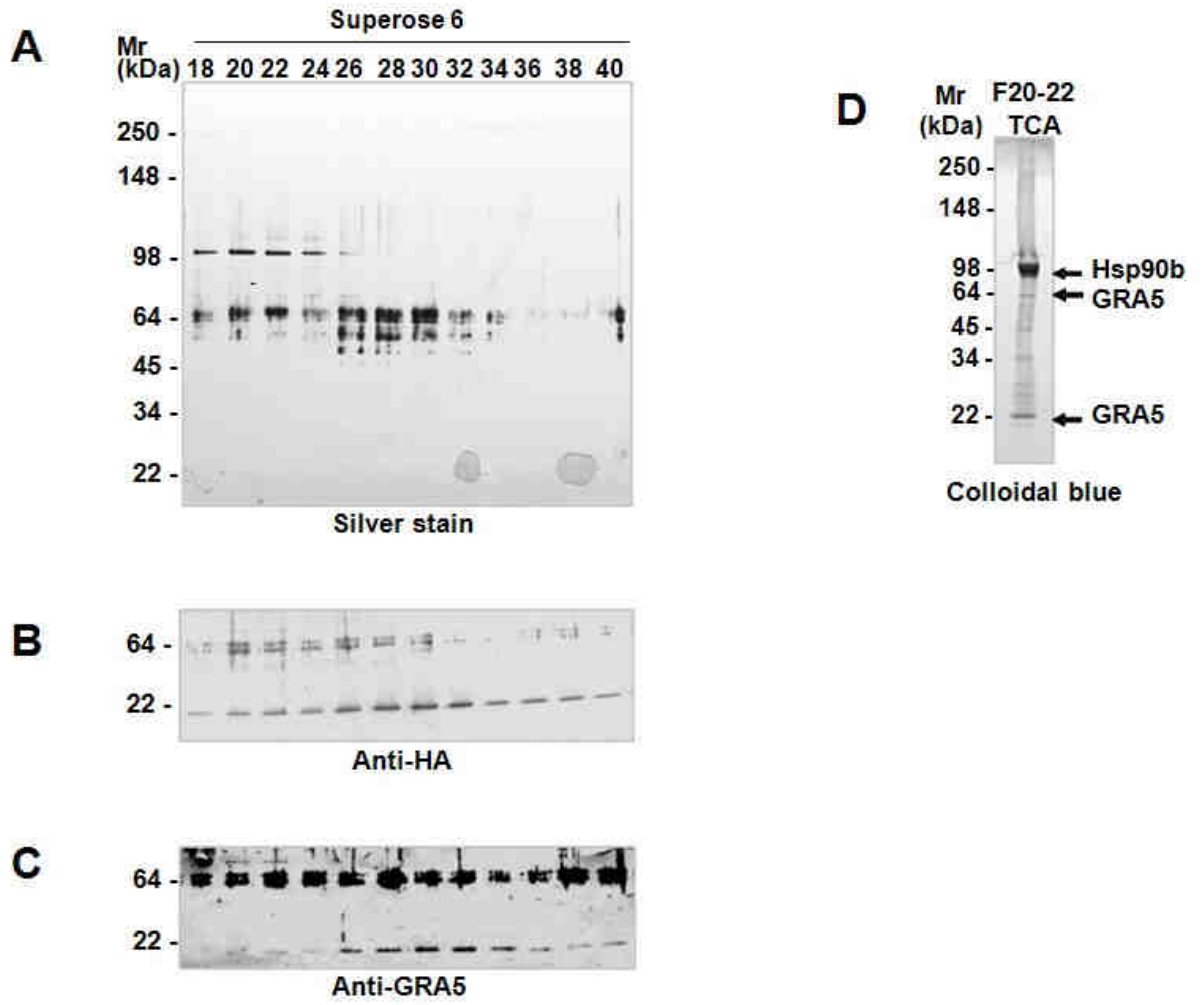
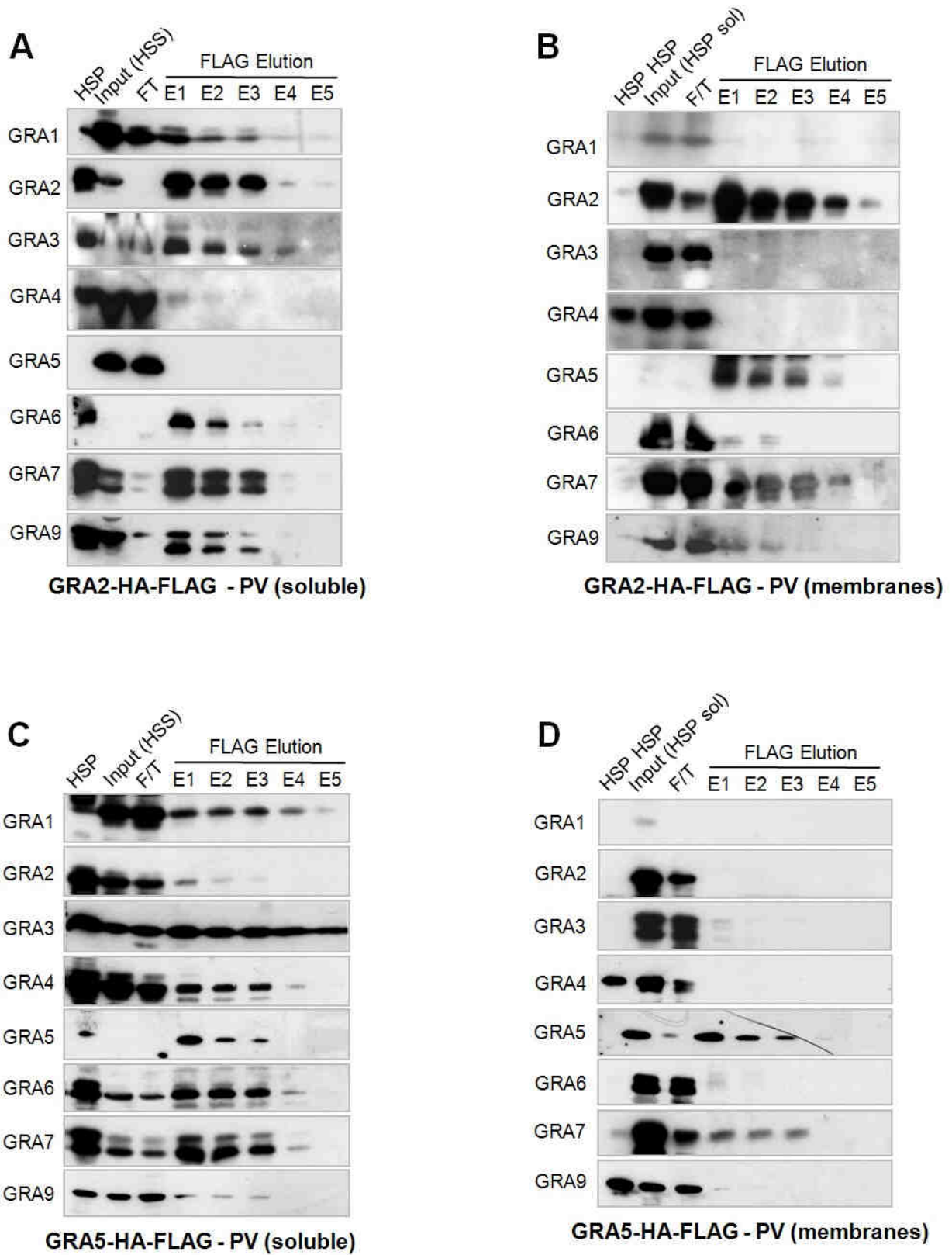


Figure 4



2. Résultats complémentaires et discussion

a) Purification de GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG

Alors qu'aucune protéine de GD n'avait jamais été purifiée à partir d'extraits parasitaires, l'étiquette HA-FLAG (Saksouk *et al.*, 2005) a permis un très bon enrichissement des protéines GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG exprimées de manière stable dans les souches parasitaires Δ GRA2-HXGPRT et Δ GRA5-HXGPRT, respectivement. La purification de GRA5-HA-FLAG à partir d'extraits parasitaires a également mis en évidence des multimères de GRA5-HA-FLAG et la chaperone HSP90 décrite comme localisée dans le cytoplasme des toxoplasmes mais non détectée dans la VP (Echeverria *et al.*, 2005) (**Figure 3 de l'article**).

En parallèle, la purification de GRA2-HA-FLAG à partir d'extraits parasitaires a été analysée par immunoblot à l'aide d'un anti-GRA2 et par SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent. L'anticorps anti-GRA2 permet la détection de GRA2-HA-FLAG sous forme monomérique (40 kDa environ) et de ses formes multimériques dont une forme potentiellement dimérique (80 kDa notamment) (**Figure 49A**). L'analyse des fractions d'éluion de GRA2-HA-FLAG par SDS-PAGE coloré au Nitrate d'argent révèle de nombreuses bandes dont trois majoritaires entre 30 et 40 kDa. Celle migrant à 40 kDa pourrait correspondre à GRA2-HA-FLAG enrichie (**Figure 49B**).

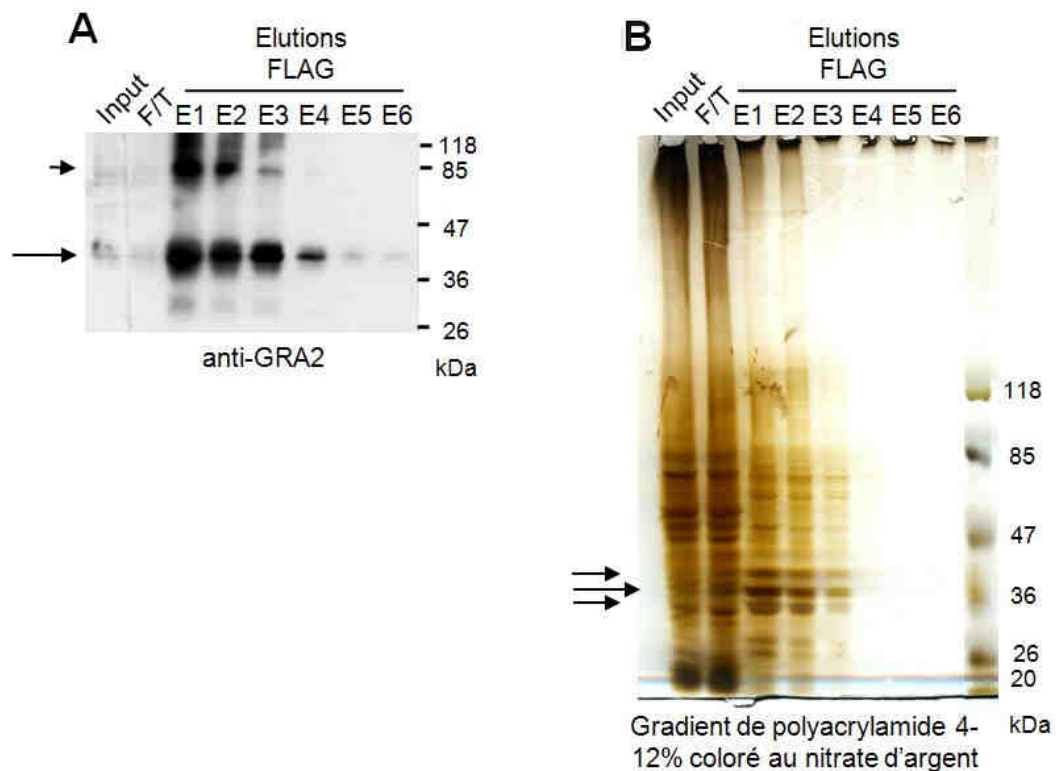


Figure 49 : Analyse par immunoblot à l'aide de l'anticorps anti-GRA2 (A) et par SDS-PAGE coloré au Nitrate d'argent (B) des différentes fractions issues de la purification de GRA2-HA-FLAG sur résine FLAG. (A) L'anticorps anti-GRA2 permet la détection de GRA2-HA-FLAG monomérique (40 kDa environ) (flèche) et de ses multimères de haut poids moléculaire (80 kDa environ et au-delà) (pointes de flèche). (B) De nombreuses bandes sont détectées, dont trois entre 30 et 40 kDa (flèches).

Lors de l'identification par MS/MS de chacune des trois bandes majoritaires ainsi que des protéines totales de la fraction d'élution de la purification de GRA2-HA-FLAG (collaboration J. Garin et S. Kieffer, INSERM ERIT, M 0201, CEA Grenoble), GRA2-HA-FLAG n'a pas été identifiée parmi l'ensemble des peptides analysés. La recherche des protéines associées à GRA2-HA-FLAG n'a donc pas été poursuivie. Des propriétés biochimiques particulières de GRA2-HA-FLAG pourraient avoir empêché sa désorption de la matrice utilisée en MS/MS (Ferro *et al.*, 2003) et expliquer qu'elle n'ait pas été identifiée parmi les peptides obtenus.

L'étiquette HA-FLAG est un système très efficace qui a permis l'enrichissement des deux premières protéines GRA : GRA2 et GRA5. Alors que l'identification des protéines partenaires de GRA2 n'a pas pu donner de résultats, sans doute en raison d'un protocole de MS/MS mal adapté à GRA2-HA-FLAG, la protéine HSP90 a été identifiée comme étant associée en complexe avec GRA5-HA-FLAG. Cette chaperone non sécrétée dans la VP n'est pas associée aux autres protéines GRA testées. Deux rôles non exclusifs l'un de l'autre sont donc envisageables pour HSP90 : i) elle pourrait assurer la solubilité de GRA5 en masquant son domaine transmembranaire de manière analogue à GroEl envers la bactériorhodopsine (Deaton *et al.*, 2004) et/ou ii) escorter GRA5 vers la voie de sécrétion granulaire comme le fait la carboxypeptidase CPE avec la sécrétogranine SgIII dans les granules mammifères (Hosaka *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent dans ce cas que d'autres chaperones pourraient être impliquées dans le transport et le repliement des autres protéines GRA.

b) Etude des protéines GRA associées à GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG au cours de leur trafic

✓ Interactions dans le parasite

La recherche des protéines GRA associées à GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG au cours de leur trafic a montré que GRA3, GRA6 et GRA7 sont associées aux protéines solubles GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG dans le parasite. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment lors de la purification de GRA2-HISx6 sur colonne de Nickel. En effet, GRA2-HISx6 avait été exprimée de manière stable dans les parasites Δ GRA2-HXGPRT et sa purification à partir d'extraits parasitaires avait montré que, contrairement à GRA1 et GRA4, GRA6 co-élue avec GRA2-HISx6. Cette étude n'avait pas été poursuivie à cause du mauvais enrichissement en GRA2-HISx6 (Travier *et al.*, résultats DEA, 2003).

La purification sur résine FLAG des protéines GRA3-HA-FLAG et GRA6-HA-FLAG exprimées dans les parasites Δ HXGPRT et Δ GRA6-HXGPRT, respectivement, s'accompagne de leur enrichissement. La détection des protéines GRA2, GRA5, GRA6, GRA7 et GRA2, GRA3, GRA7 associées à GRA3-HA-FLAG et GRA6-HA-FLAG, respectivement (résultats non montrés), confirment les résultats obtenus avec GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG (**Figures 2B et 2C de l'article**).

Cette étude met clairement en évidence des interactions privilégiées entre les protéines GRA2, GRA3, GRA5, GRA6 et GRA7 dans les parasites et donc sans doute, dans les GD.

✓ *Interactions lors de la sécrétion in vitro*

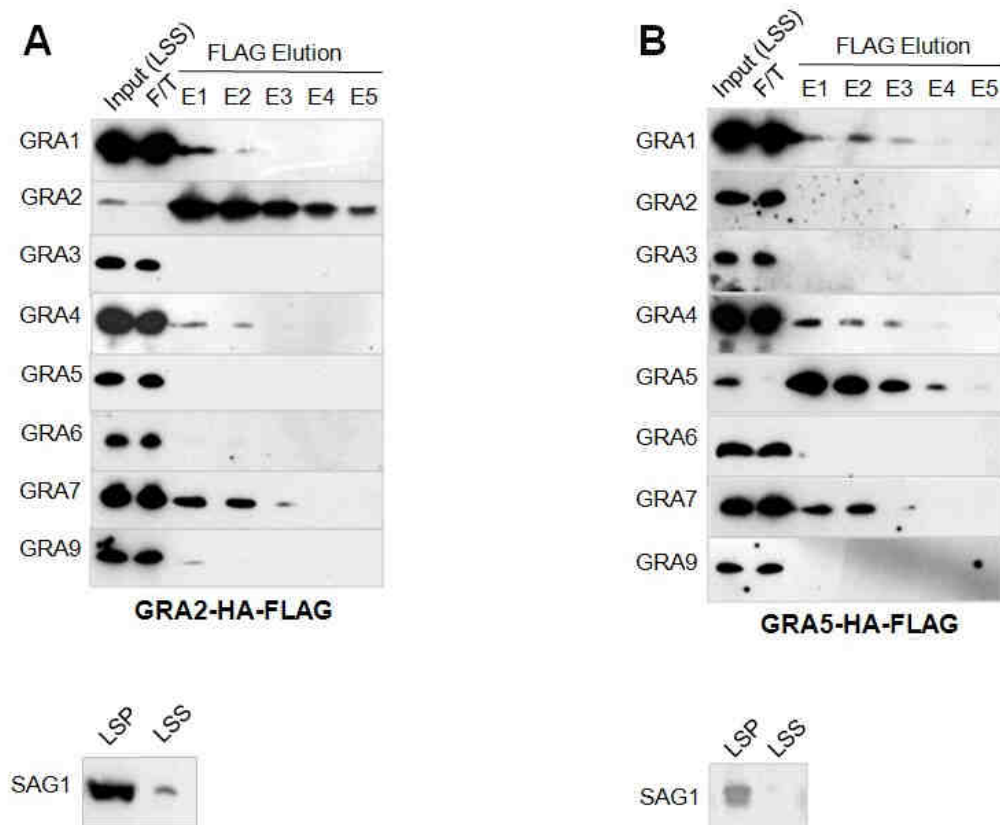


Figure 50 : Purification de GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG à partir des produits de sécrétion *in vitro*. La sécrétion granulaire des parasites Δ GRA2-HXGPRT ou Δ GRA5-HXGPRT exprimant GRA2-HA-FLAG (A) ou GRA5-HA-FLAG (B) a été induite par incubation dans du milieu de culture complété avec 10 % de sérum. Les parasites ont été sédimentés par centrifugation (LSP) et GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG ont été purifiées sur résine FLAG à partir des produits de sécrétion solubles (LSS). Les fractions d'éluion ont été analysées par immunoblot à l'aide d'anticorps anti-GRA et anti-SAG1. Seule GRA7 est associée à GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG.

Afin d'analyser les interactions établies par GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG avec les autres protéines GRA lors de leur sécrétion dans la VP, GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG ont été purifiées sur résine FLAG à partir des produits granulaires sécrétés artificiellement *in vitro* par 10% de sérum (Darcy *et al.*, 1988). Les parasites (LSP) ont été séparés par centrifugation à basse vitesse des produits de sécrétion solubles (LSS) et les protéines GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG, purifiées à partir du LSS par chromatographie d'affinité sur résine FLAG. L'absence ou la faible détection de la protéine SAG1 dans le LSS confirme que les protéines GRA détectées dans le LSS proviennent de la sécrétion active des parasites et non pas de leur lyse potentielle. Comme attendu, la purification des protéines GRA2-HA-FLAG

et GRA5-HA-FLAG a permis leur enrichissement par rapport aux produits de sécrétion. De plus, ces protéines ont été détectées en association avec GRA7 (**Figure 50**).

Cette étude réalisée sur les produits de sécrétion *in vitro* montrent que la plupart des interactions établies par GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG dans les parasites ne sont pas conservées lors de leur sécrétion depuis les GD, lorsque celle-ci est induite artificiellement.

✓ Interactions dans la vacuole parasitophore

Après leur sécrétion, GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG sont associées à GRA3, GRA6 et GRA7 dans la fraction soluble à 100 000 g de la matrice vacuolaire. Par contre, après leur insertion membranaire post-sécrétoire, GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG ne sont associées qu'à GRA5 et GRA7 ou GRA7, respectivement (**Figure 4 de l'article**).

La purification de GRA2-HA-FLAG à partir de la fraction membranaire de la VP suggère qu'il existe des interactions entre GRA2, GRA5 et GRA7. Par contre, contrairement à ce qui est attendu, GRA2 n'est pas détectée associée à GRA5-HA-FLAG dans les membranes de la VP. Toutefois, cette observation surprenante ne remet pas complètement en cause l'idée d'un complexe protéique GRA2-GRA5-GRA7 dans les membranes de la VP. En effet, l'addition de l'étiquette HA-FLAG à GRA5 pourrait perturber la conformation de GRA5, l'empêcher de reconnaître son domaine d'interaction sur GRA2 et inhiber leur interaction protéine-protéine. Ces résultats sont en accord avec les observations de plusieurs équipes de recherche qui ont mis en évidence qu'en plus de leur association à la MVP, GRA5 et GRA7 sont retrouvées au niveau du RNM (Lecordier *et al.*, 1995 ; Bonhomme *et al.*, 1998). Ils renforcent également l'idée selon laquelle ces protéines de la MVP pourraient y être ciblées *via* le RNM. En plus de son rôle structural dans le maintien de l'organisation parasitaire dans la VP, le RNM pourrait être impliqué dans le trafic antérograde et/ou rétrograde des protéines entre le parasite et la MVP.

Les travaux de Labruyère *et al.* ont montré, *via* l'utilisation de l'agent pontant DSP (Dithio-bis Succinimidyl Propionate qui lie chimiquement les protéines proches dans un environnement inférieur à 1.2 nm), i) l'existence d'un complexe GRA2, GRA4 et GRA6 dans les membranes du RNM intactes et ii) que ce complexe ne résiste pas à la solubilisation des membranes du RNM par le Triton X-100 (Labruyère *et al.*, 1999). Nos résultats obtenus suite à la solubilisation des protéines des membranes du RNM par le NP40 ne sont donc pas contradictoires avec ceux déjà publiés. L'ensemble de ces données suggère que GRA4 et GRA6 ne sont pas en association directe avec GRA2, mais plutôt situées dans un environnement très proche (≤ 1.2 nm) dans les membranes du RNM. Contrairement aux autres protéines GRA, GRA4 ne se comporte pas comme une protéine membranaire mais se lie aux membranes du RNM *via* des interactions protéine-protéine (Labruyère *et al.*, 1999). On peut donc penser que GRA4 est associée aux membranes du RNM *via* une interaction protéine-protéine avec GRA6, elle même peut être liée à une des protéines que nous avons identifiées (GRA5 ou GRA7).

Lorsqu'on compare l'ensemble de ces résultats, on montre que les protéines GRA établissent les mêmes interactions dans la fraction soluble de la matrice vacuolaire que dans les parasites. Par contre, après leur insertion membranaire post-sécrétoire, le nombre des interactions entre protéines GRA est réduit.

✓ **Bilan des interactions entre protéines GRA**

Les protéines GRA, notamment GRA2, GRA3, GRA5, GRA6 et GRA7, établissent des interactions dans les GD comme dans la fraction soluble de la VP. Ces données laissent envisager la formation d'oligomères dans les GD. Ainsi, les interactions établies par les protéines GRA pourraient permettre de masquer leur domaine hydrophobe central et de fait, expliquer leur solubilité partielle dans les GD. Cette hypothèse pourrait également être extrapolée à la fraction soluble de la VP. Par contre, le peu d'interactions observées entre les protéines GRA dans les produits de sécrétion *in vitro* suggère deux hypothèses. Ainsi, la solubilité des protéines GRA lors de leur sécrétion *in vitro* pourrait :

- i) dépendre d'un mécanisme encore non identifié, indépendant de la formation d'oligomères. Une association des protéines GRA avec de petites vésicules lipidiques dérivées du sérum et solubles à 100 000 g pourrait être envisagée. En effet, lorsque les parasites sont incubés dans du sérum délipidé, les protéines GRA possédant un domaine transmembranaire ne sont plus détectées dans les produits de sécrétion *in vitro* (thèse de P. Ruffiot, juillet 2007) ;
- ii) provenir d'un repliement particulier des protéines GRA afin de ne pas exposer leur domaine central hydrophobe. Il est difficilement envisageable que les protéines GRA monomériques, de par leur petite taille, soient capables à elles toutes seules d'assurer ce repliement. On peut donc supposer qu'elles pourraient former des multimères de petite taille. Cette hypothèse est convergente avec le fait que des dimères et des trimères de GRA2 et GRA5 aient été mis en évidence dans le parasite lors de la purification de GRA2-HA-FLAG (**Figure 49A**) et de GRA5-HA-FLAG (**Figure 3 de l'article**), respectivement. Elle est également confirmée par les travaux de Coppens *et al.* (Coppens *et al.*, 2006) qui montrent que GRA7 constitue des dimères dans les produits de sécrétion *in vitro*.

c) Effet du niveau d'expression des protéines GRA fusionnées à l'étiquette HA-FLAG sur leurs interactions avec les autres protéines GRA

Afin de faciliter leur purification, les protéines GRA2-HA-FLAG, GRA5-HA-FLAG et GRA6-HA-FLAG ont été initialement exprimées sous le contrôle du promoteur fort de *GRA1* dans les souches Δ *GRA2-HXGPRT*, Δ *GRA5-HXGPRT* et Δ *GRA6-HXGPRT*, respectivement. Alors que le ciblage de GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG surexprimées est identique à celui de GRA2 et GRA5 endogènes, respectivement, la surexpression de GRA6-HA-FLAG se traduit, après transfection transitoire, par un ciblage anormal de la protéine dans le cytoplasme des parasites, puis par la perte, au cours des étapes de sélection, du plasmide permettant son expression.

La purification sur résine FLAG de GRA2-HA-FLAG surexprimée à partir d'un extrait parasite montre que, en plus de son enrichissement, GRA2-HA-FLAG est non seulement associée aux protéines GRA3, GRA6 et GRA7, comme GRA2-HA-FLAG non surexprimée (**Figure 51A**), mais aussi à GRA5 et GRA9, avec un enrichissement particulièrement important de GRA5 et GRA6 (**Figure 51B**). La surexpression de GRA2-HA-FLAG semble donc augmenter le nombre des interactions qu'elle établit avec les autres protéines GRA. A ce stade, il est nécessaire de rappeler que le protocole de purification sur résine FLAG utilisé est très stringent puisque la résine FLAG est lavée avec 500 mM de KCl. L'ajout d'une telle concentration de sels favorise donc l'élimination des interactions protéine-protéine établies grâce aux liaisons ioniques. Il est en fait probable que GRA2-HA-FLAG soit associée à toutes les autres protéines GRA mais que ces interactions ne soient pas suffisamment fortes pour permettre, par ce protocole, l'enrichissement parallèle des protéines qui lui sont associées. Ces données confirment donc l'hypothèse selon laquelle toutes les protéines GRA pourraient être associées entre elles dans les GD, sous la forme d'oligomères ou d'agrégats.

Si la surexpression de GRA2-HA-FLAG exacerbe la détection du réseau d'interactions qu'elle établit avec les autres protéines GRA dans le parasite, il est raisonnable de penser que l'annulation de l'expression d'une protéine GRA, par exemple GRA6, ait l'effet inverse. Ainsi, la purification sur résine FLAG de GRA2-HA-FLAG exprimée dans la souche parasite Δ GRA2-*GRA6* permet toujours son enrichissement mais s'accompagne de la réduction des interactions établies entre GRA2-HA-FLAG, GRA3 et GRA7 (**Figure 51 C**). GRA6 pourrait donc être impliquée dans l'association de GRA2-HA-FLAG à GRA3 et GRA7.

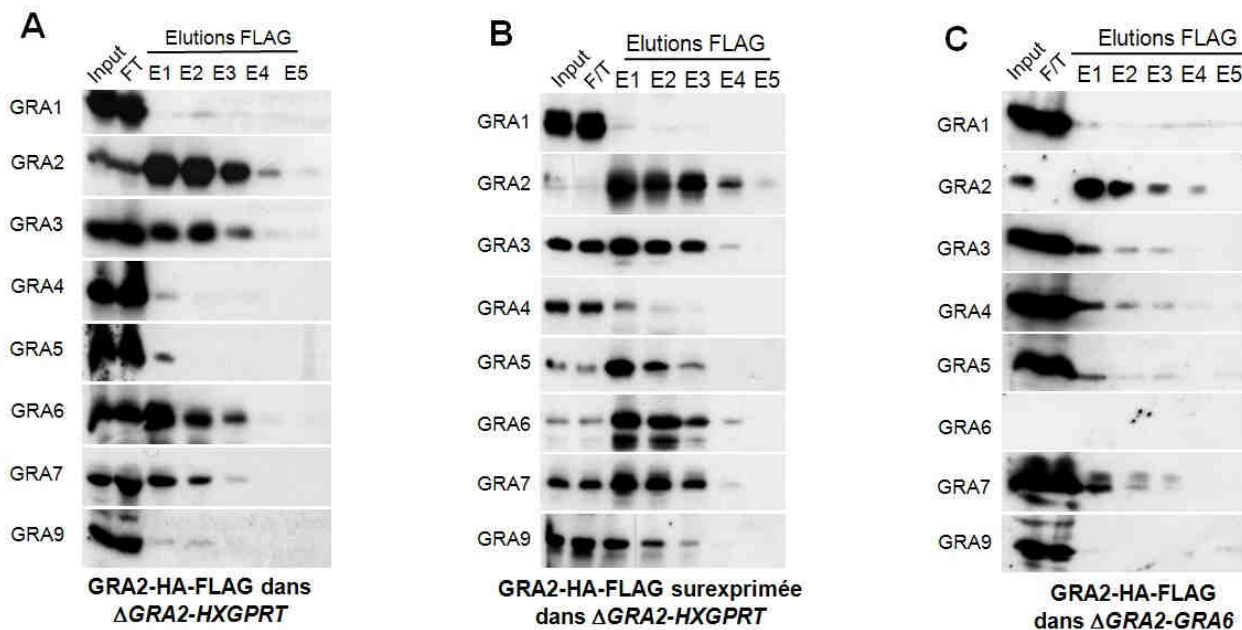


Figure 51 : Purification à partir d'extraits parasitaires, sur résine FLAG, de GRA2-HA-FLAG non surexprimée (A), surexprimée dans la souche Δ GRA2-HXGPRT (B) et exprimée sous promoteur endogène dans la souche Δ GRA2-*GRA6* (C). (A) GRA2-HA-FLAG non surexprimée est enrichie et associée à GRA3, GRA6 et GRA7. (B) GRA2-HA-FLAG surexprimée est enrichie et associée à GRA3, GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9. On détecte plus particulièrement un enrichissement important de GRA5 et GRA6 (C) En l'absence de GRA6, GRA2-HA-FLAG est enrichie mais n'est plus que très faiblement associée à GRA3 et GRA7.

De la même manière, GRA7-HA-FLAG exprimée sous le promoteur fort de *GRA1* dans la souche parasitaire $\Delta HXGPRT$ a été purifiée sur résine FLAG, à partir d'un extrait parasitaire. L'analyse par immunoblot des fractions d'éluion montre que GRA7-HA-FLAG surexprimée est enrichie par rapport à l'extrait parasitaire de départ et qu'elle est associée à toutes les protéines GRA recherchées, plus particulièrement GRA4 (**Figure 52**). Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle les protéines établissent un réseau d'interactions entre elles et que la surexpression de l'une d'elle renforce son association aux autres protéines GRA.

La purification de GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG a montré que ces deux protéines sont associées à GRA7 dans le parasite, dans les produits de sécrétion *in vitro*, dans la fraction soluble et dans les membranes de la VP. De la même manière, GRA3-HA-FLAG et GRA6-HA-FLAG sont associées à GRA7 dans le parasite (résultat non montré). GRA7 semble être la protéine centrale des diverses interactions établies entre protéines GRA et pourrait donc être responsable de l'oligomérisation ou de l'agrégation des protéines de GD. En effet, la délétion de *GRA7* entraîne non seulement une altération de la morphologie des parasites se développant en milieu délipidé mais aussi l'absence de détection des GD en microscopie électronique à transmission (Coppens *et al.*, 2006) (**Figure 44**).

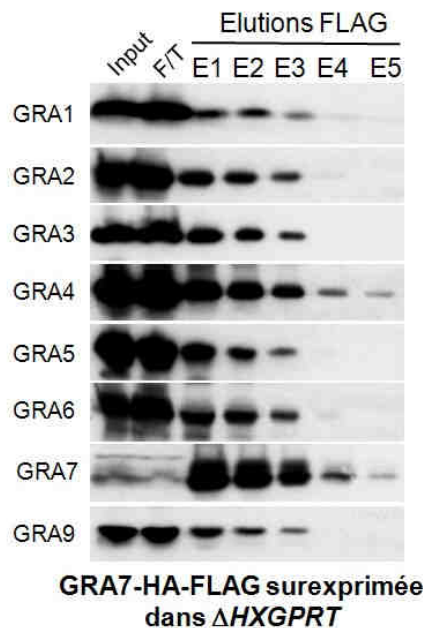


Figure 52 : Purification à partir d'extraits parasitaires, sur résine FLAG, de GRA7-HA-FLAG surexprimée dans la souche $\Delta HXGPRT$. GRA7-HA-FLAG surexprimée est enrichie et associée à toutes les autres protéines GRA recherchées.

Les interactions établies entre GRA2-HA-FLAG et les autres protéines sont exacerbées lorsque que GRA2-HA-FLAG est surexprimée. Ces interactions sont réduites en l'absence de GRA6. De plus, GRA7-HA-FLAG surexprimée est associée à toutes les autres protéines GRA. Les protéines GRA

semblent donc interagir toutes ensemble dans les GD et pourraient y constituer des oligomères ou agrégats. Il est probable que GRA7 soit la protéine initiant le processus d'agrégation protéique dans les GD.

d) L'agrégation des protéines GRA

✓ Séparation des protéines GRA par biochimie conventionnelle

La séparation des protéines GRA par exclusion de taille sur une colonne dont le domaine de fractionnement est [50 - 5 000 kDa], montre qu'à l'exception de GRA1 et GRA2 qui forment des complexes protéiques de petits poids moléculaires (≤ 300 kDa), les protéines GRA sont associées à des complexes de haut poids moléculaire (≥ 670 kDa) (**Figure 1B et 1C de l'article**). Ce résultat appuie l'hypothèse de la formation d'oligomères ou d'agrégats par les protéines GRA dans les GD. Ces résultats sont également en accord avec les travaux précédents qui décrivent les protéines GRA dans un état mi-agrégé, mi-soluble dans les GD (Sibley *et al.*, 1995 ; Labruyère *et al.*, 1999). Ces oligomères ou agrégats pourraient être constitués i) à partir des interactions que les protéines GRA établissent entre elles dans le parasite (**Figure 2B et 2C de l'article**) et/ou ii) à partir de l'homo-oligomérisation des protéines GRA, comme il l'est mis en évidence pour GRA5-HA-FLAG (trimères potentiels) (**Figure 3 de l'article**) et pour GRA2-HA-FLAG (dimères potentiels) (**Figure 49A**). Les interactions établies entre protéines GRA étant conservées dans la fraction soluble de la VP, on peut envisager également qu'elles continuent de former des oligomères dans la fraction soluble de la VP. Toutefois, la séparation des protéines GRA par exclusion de taille n'ayant pas été réalisée à partir de cette fraction, cette hypothèse ne peut être confirmée.

Cette étude du profil biochimique des protéines GRA par biochimie conventionnelle est à comparer avec les travaux de thèse réalisés dans le laboratoire par P. Ruffiot (juillet 2007) sur l'étude des formes de solubilisation des protéines GRA avant, pendant et après sécrétion.

✓ Les formes de solubilisation des protéines GRA avant, pendant et après sécrétion (thèse de P. Ruffiot, juillet 2007)

La séparation isopycnique sur gradient de glycérol des fractions solubles parasitaires, des produits de sécrétion *in vitro* et des produits solubles vacuolaires montre que :

- 1) la protéine GRA1 maintient, dans tous les cas, son comportement de protéine soluble monomérique ou formant des petites structures ;
- 2) les protéines GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9 évoluent depuis une forme dense stockée dans les GD, jusqu'à une forme plus soluble dans la VP (forme monomère ou en petits assemblages), en passant par des intermédiaires de dissociation. Cette évolution pourrait 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 GD, à une forme moins complexe susceptible d'interagir avec les membranes de la VP et

3) 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. GRA2 semble en effet être toujours sous une forme monomère ou associée à des petits complexes, ce qui pourrait signifier qu'elle est disponible à tout moment pour le parasite.

Les travaux de P. Ruffiot confirment i) que GRA1 et GRA2 sont associées à des complexes de petite taille dans le parasite et ii) que les autres protéines GRA forment des complexes de haut poids moléculaire, probablement des oligomères ou des agrégats dans les GD. Ces travaux montrent que ces formes denses de protéines GRA, stockées dans les GD, se dissocient lors de la sécrétion dans la VP pour permettre aux protéines GRA de s'associer sous forme monomérique ou en petits assemblages aux membranes de la VP.

e) Etude des modifications post-traductionnelles de GRA2 et GRA6

L'étude du comportement des protéines GRA par biochimie conventionnelle et chromatographie d'affinité sur résine FLAG a révélé la présence de plusieurs formes de ces protéines (formes non mentionnées dans les figures de l'article par souci de simplification). L'analyse par immunoblot des fractions d'élution de l'exclusion de taille a notamment mis en évidence des formes dimériques de GRA4, GRA6 et GRA9. Les purifications par chromatographie d'affinité sur résine FLAG de GRA2, GRA5, GRA6 et GRA7 fusionnées à l'étiquette HA-FLAG ont également montré la présence de bandes compatibles avec des dimères potentiels de GRA2, GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9. Cette observation converge vers l'hypothèse vraisemblable de formation de multimères par les protéines GRA. Par contre, l'observation des bandes de haut poids moléculaire a également mis en évidence des formes qui ne correspondent pas à des multimères potentiels. Ces formes pourraient provenir de modifications post-traductionnelles des protéines GRA.

L'analyse de la séquence des gènes des protéines GRA, plus particulièrement ceux des protéines associées au RNM GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9, prédit qu'elles pourraient subir plusieurs modifications post-traductionnelles : phosphorylation, sumoylation et/ou glycosylation parmi les modifications les plus fréquemment utilisées pour réguler la fonction des protéines.

✓ Phosphorylation de GRA2, GRA6 et GRA9

Des sites potentiels de phosphorylation sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine sont prédits dans la séquence des protéines GRA mais seules GRA2, GRA6 et GRA9 ont été décrites comme étant phosphorylées. Plus précisément, GRA2 (Mercier and Sibley, non publié) et GRA6 (Labruyère *et al.*, 1999) ne sont phosphorylées que lors de leur sécrétion dans la VP, alors que la phosphorylation de GRA9 a lieu dans le cytoplasme du parasite (Adjogble *et al.*, non publié). La phosphorylation de ces protéines pourrait constituer un signal d'activation pour l'exécution de leur fonction et/ou de leur association membranaire.

✓ *Glycosylation de GRA6*

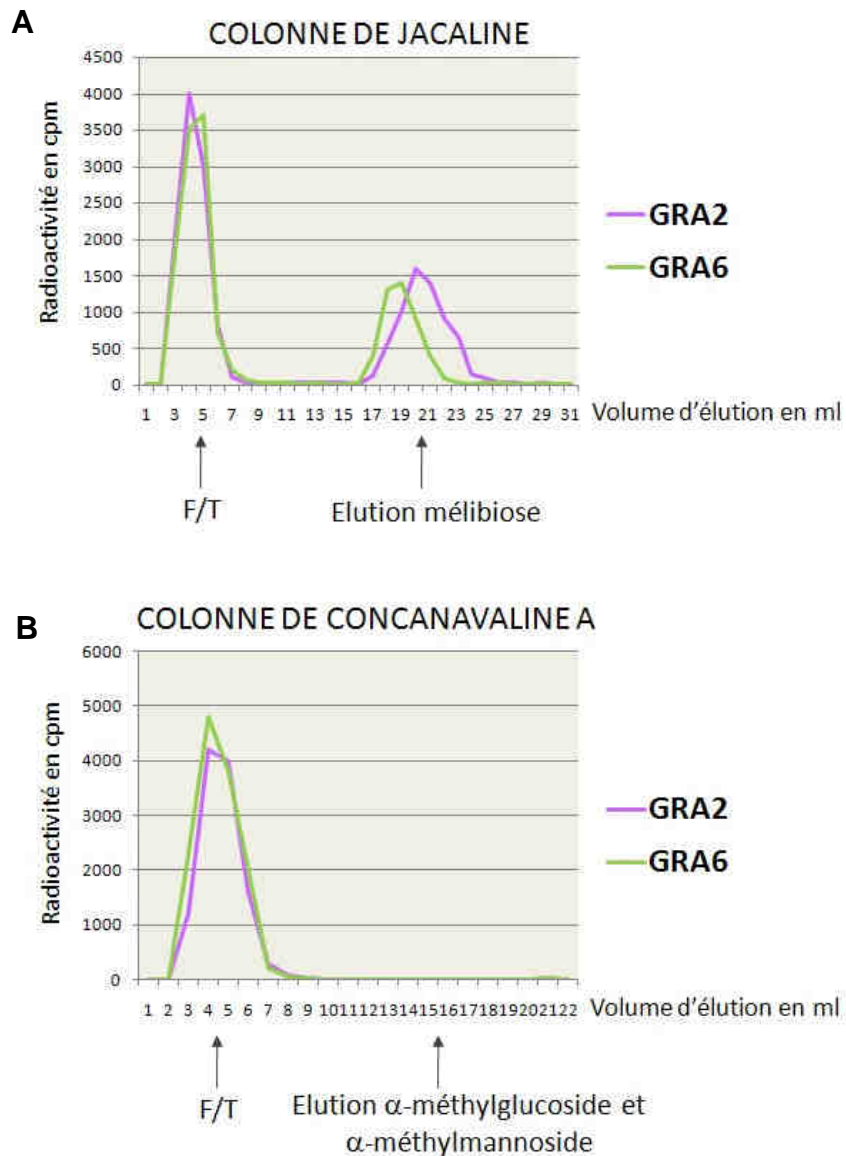


Figure 53 : GRA6 est-elle O- et/ou N-glycosylée dans le parasite ? (A) Comme GRA2, GRA6 se lie à la colonne de Jacaline et est éluee par compétition avec le mélibiose. Elle est donc O-glycosylée. **(B)** Comme GRA2, GRA6 ne se lie pas à la colonne de lectine concanavaleine A et n'est pas éluee par l' α -Méthylglucoside et l' α -Méthylmannoside. Elle n'est donc pas N-glycosylée.

Chez les *Apicomplexa*, les voies de glycosylation restent pratiquement inexplorées. Bien que des signaux de N- et de O- glycosylation soient prédits dans de nombreuses protéines, ils seraient inusités chez *Plasmodium* et utilisés de façon extrêmement rare chez *Toxoplasma* (Schwarz and Tomavo, 1993 ; Gowda and Davidson, 1999). La glycosylation a lieu dans l'appareil de Golgi et ne concerne que les protéines membranaires. Elle confère notamment aux protéines une résistance à la protéolyse. De nombreux sites de N- et O-glycosylation sont prédits dans la séquence en acides aminés des protéines GRA mais seules

GRA2 et GRA4 ont été décrites comme étant réellement glycosylées (Achbarou *et al.*, 1991 ; Zinecker *et al.*, 1998). Malgré le fait que les signaux de N-glycosylation soient reconnus par la machinerie de *Toxoplasma* (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993), les seuls glycanes détectés sur les protéines GRA sont des O-glycanes (Zinecker *et al.*, 1998 ; Achbarou *et al.*, 1991).

En collaboration avec N. Azzouz et R.T. Schwarz (Institut für Hygiene, Phillips Universität de Marburg, Allemagne), j'ai recherché la présence éventuelle d'O- ou N-glycanes sur la protéine GRA6. GRA6 a été immunopurifiée à partir d'un extrait de parasites sauvages marqués par la [H^3]-Glucosamine puis déposée en parallèle sur colonne de Jacaline qui fixe le N-acétylgalactosamine- β 1,3-galactose O-lié, et sur colonne de Concanavaline A qui fixe les mannoses N-liés. En parallèle, la même expérience a été réalisée avec GRA2, déjà décrite comme O-glycosylée (Zinecker *et al.*, 1998). Les résultats montrent que GRA6 se lie effectivement à la colonne de Jacaline et qu'elle est éluée par compétition avec 100 mM de Mélibiose. Par contre, elle n'est pas détectée dans les fractions d'éluion de la colonne de Concanavaline A. Comme GRA2, GRA6 est donc O-glycosylée mais non N-glycosylée (**Figure 53**).

✓ Identification des O-glycanes portés par GRA2

Afin d'identifier les O-glycanes portés par GRA2 et GRA6, GRA2 et GRA6 ont été immunopurifiées à partir de parasites sauvages marqués par la [H^3]-Glucosamine puis digérée par la chymotrypsine (endoprotéase prédite pour cliver ces deux protéines). Les peptides O-glycosylés de GRA2 ont ensuite été purifiés sur colonne de jacaline mais les fragments peptidiques purifiés étaient en quantité insuffisante pour être identifiés par microséquençage peptidique.

Afin de mieux visualiser les différentes modifications post-traductionnelles de GRA2, les fractions d'éluion E1, E2 et E3 de la chromatographie d'affinité de GRA2-HA-FLAG sur résine FLAG (**Figure 2B de l'article**) ont été dialysées dans 6 M d'urée puis analysées par électrophorèse bidimensionnelle (2D).

La comparaison du SDS-PAGE 2D coloré au nitrate d'argent et de l'immunoblot 2D anti-GRA2 montre que pour un point isoélectrique (pI) fixe, GRA2-HA-FLAG existe sous trois formes (flèches vertes) migrant vers 35, 37 et 39 kDa. Ces formes sont retrouvées en cinq exemplaires toutes les 0.5 unités de pI (flèches mauves). L'anti-GRA2 permet également la détection de i) deux points de forte intensité qui migrent vers 28-29 kDa et un pI d'environ 8-8.1 (cercle bleu) et 9-9.1 (cercle rose), ii) une série de points à droite de celui entouré d'un cercle rose (28-29 kDa) (pointes de flèche mauves) et iii) une autre série de points migrant vers 75-80 kDa (rectangle gris). Ces séries de points rappellent le profil des cinq exemplaires des trois formes migrant vers 35, 37 et 39 kDa (**Figure 54A**).

Le calcul théorique du pI et du poids moléculaire de GRA2-HA-FLAG avec et sans étiquette HA-FLAG (**Figure 54B**) permet d'établir l'interprétation suivante de ce profil (on considère que le peptide signal a été normalement clivé au niveau du réticulum endoplasmique) :

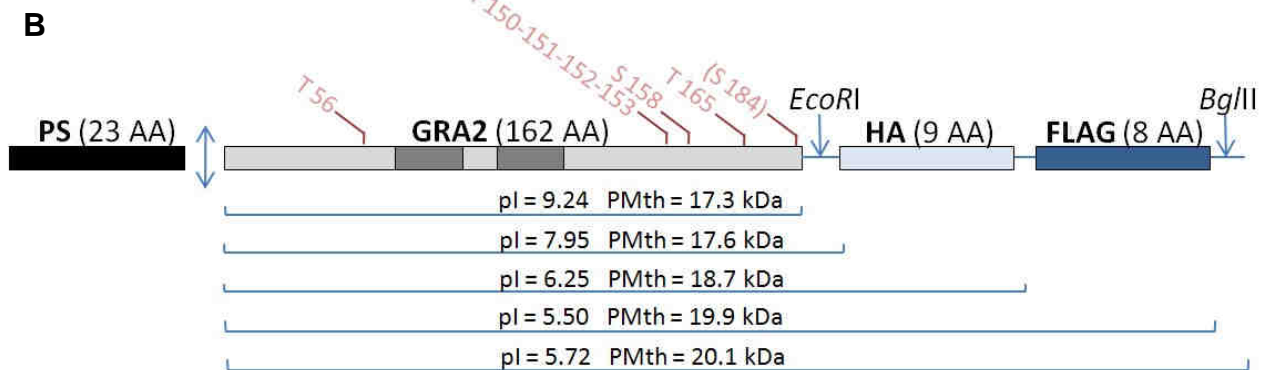
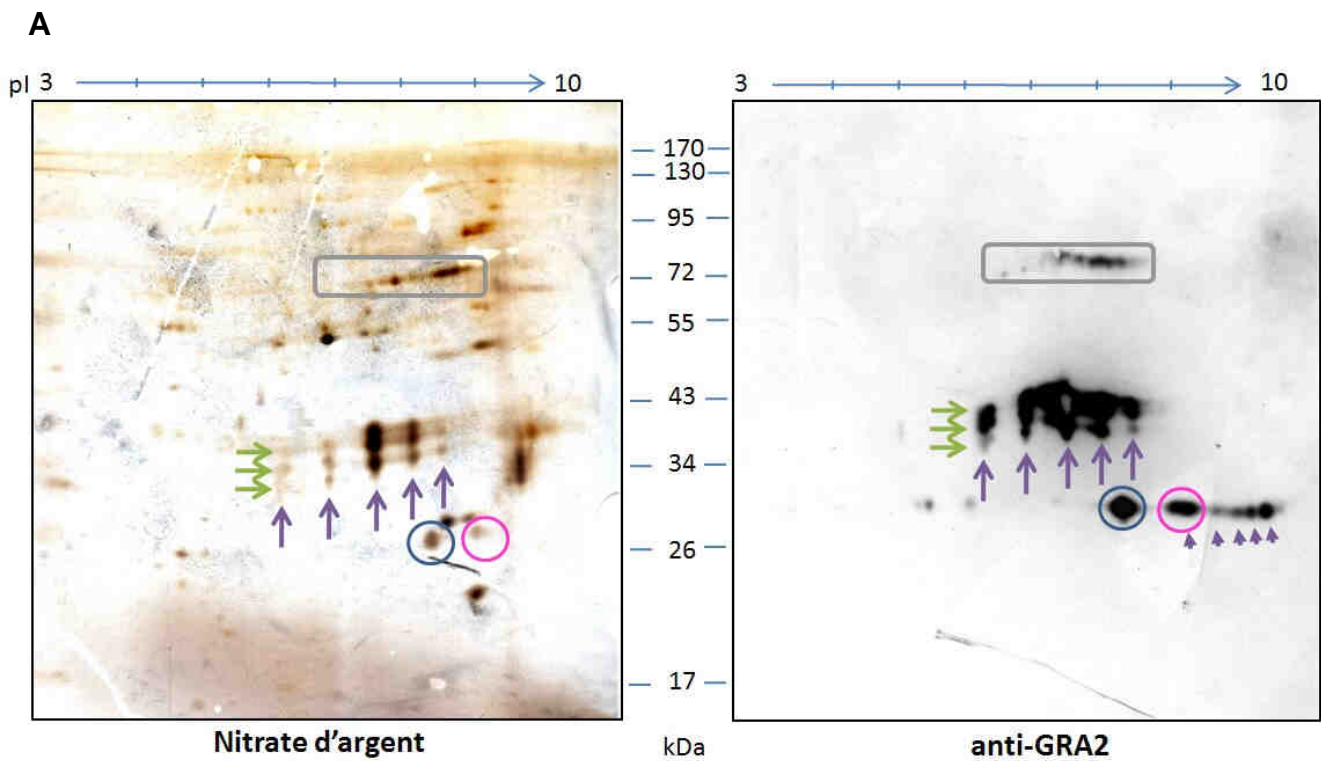


Figure 54 : Analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle (2D) des fractions d'élution E1, E2 et E3 de la purification de GRA2-HA-FLAG par chromatographie d'affinité sur résine FLAG. (A) GRA2-HA-FLAG (35 kDa et un pI de 5.5) (flèche verte basse et flèche mauve de gauche) semble subir de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ainsi, elle pourrait porter jusqu'à trois petits O-glycanes différents (flèches vertes) et cinq résidus chargés négativement (flèches mauves) différents. Ces résidus apportant des charges négatives semblent se retrouver chez GRA2-HA-FLAG dépourvue de l'étiquette HA-FLAG (cercle rose et pointes de flèches mauves) ainsi que chez la forme dimérique de GRA2-HA-FLAG (rectangle gris). **(B)** Schéma de la fusion de GRA2 à l'étiquette HA-FLAG avec les sites de O-glycosylations prédits (en rose : sérine (S) / thréonine (T) + numéro acide aminé) Le résidu S184 n'est prédit O-glycosylé qu'en l'absence de l'étiquette HA-FLAG (www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc). PS, peptide signal ; pI, point isoélectrique ; PMth, poids moléculaire théorique ; AA, acide aminé.

- 1) comme il l'a été décrit pour GRA2 et de nombreuses protéines GRA, le poids moléculaire observé sur gel de GRA2-HA-FLAG (environ 35 kDa) est largement supérieur à celui qui est prédit (20,1 kDa) ;
- 2) GRA2-HA-FLAG (35 kDa et pI 5.5) correspondrait donc au point fléché par la flèche mauve de gauche et la flèche verte basse ;
- 3) les trois formes fléchées en vert (35, 37 et 39 kDa) pourraient correspondre à GRA2-HA-FLAG portant un, deux ou trois petits O-glycanes neutres différents (pas de changements de pI) ;
- 4) les cinq exemplaires de trois formes migrant toutes les 0.5 unités de pI (flèches mauves) suggèrent que GRA2-HA-FLAG pourrait porter jusqu'à quatre groupements apportant des charges négatives. La phosphorylation de GRA2 n'ayant été détectée que dans la VP, les groupements phosphate sont à exclure. Par contre, des résidus d'acide sialique fixés sur les O-glycanes portés par GRA2-HA-FLAG pourraient apporter les charges négatives permettant l'observation de ces formes espacées de 0.5 unités de pI ;
- 5) les deux points au signal intense et migrant 28-29 kDa et un pI d'environ 8-8.1 (cercle bleu) et 9-9.1 (cercle rose) pourraient correspondre aux formes de GRA2-HA-FLAG auxquelles l'étiquette HA-FLAG + *EcoRI* ou seulement l'étiquette HA-FLAG auraient été clivées, respectivement. Même si aucun site potentiel de clivage protéasique n'est prédit au niveau du site *EcoRI*, le clivage des étiquettes fusionnées aux protéines GRA est un phénomène assez courant qui a déjà été observé chez GRA2-HISx6 (Travier *et al.*, DEA, 2003) et GRA5-HISx6 (Braun and Cesbron-Delauw, résultats non publiés) ;
- 6) les points migrant vers 28-29 kDa (pointes de flèche mauves) et 75-80 kDa (rectangle gris) pourraient correspondre à GRA2 sans HA-FLAG ou GRA2-HA-FLAG, dimériques et associées à des résidus chargés négativement. La migration 2D étant réalisée en conditions dénaturantes (0.1 % SDS, 10 mM DTT et 7 M Urée), il est surprenant d'observer une forme dimérique de GRA2-HA-FLAG. Le fait que GRA2-HA-FLAG mature ne possède pas de cystéine dans sa séquence exclut la possibilité d'une dimérisation de la protéine grâce à la formation de ponts disulfures. Cette dimérisation déjà observée sur SDS-PAGE classique pour la protéine native reste difficile à expliquer. Elle pourrait provenir de la résistance des formes agrégées de la protéine aux agents dénaturants utilisés, lors des migrations.

Cette analyse préliminaire des modifications post-traductionnelles de GRA2 suggère que GRA2 pourrait porter plusieurs résidus différents O-liés. Parmi les nombreux sites de O-glycosylation prédits dans GRA2, un motif « STTTT », présent dans sa partie C-Terminale, juste en aval de ses hélices alpha-amphipatiques, pourrait être un site de O-glycosylation particulièrement intéressant. Plusieurs hypothèses non exclusives l'une de l'autre sont émises quant au rôle de ces O-glycanes :

- 1) ils pourraient protéger les domaines fonctionnels de la protéine contre une dégradation protéasique trop rapide dans le compartiment vacuolaire ;
- 2) en allongeant certains domaines au-delà des membranes tubulaires, ils pourraient permettre l'exposition de sites d'interactions avec d'autres protéines partenaires ;
- 3) ils pourraient être impliqués dans le tropisme spécifique de GRA2 vers les membranes des vésicules qui se structureront en nanotubes ;
- 4) enfin, une possibilité pour expliquer le rôle moteur de GRA2 dans la formation des nanotubes vacuolaires et le rôle stabilisant

de GRA6, est d'envisager que GRA2 jouerait un rôle de lectine vis-à-vis des glycanes de GRA6 et l'entraînerait à la partie postérieure du parasite suite à sa sécrétion.

D. CONCLUSION GENERALE

1. Solubilité des protéines GRA dans les GD et lors de leur sécrétion dans la VP

La purification des protéines GRA2, GRA3, GRA5, GRA6 et GRA7 fusionnées à l'étiquette HA-FLAG montre que :

- les protéines GRA établissent des interactions entre elles dans le parasite et dans la fraction soluble de la VP ;
- lors de leur sécrétion *in vitro* et après leur insertion membranaire post-sécrétoire, le nombre de ces interactions est réduit ;
- GRA7 pourrait être la protéine maîtresse des interactions entre protéines GRA dans les GD ;
- l'ensemble des protéines GRA pourrait, comme GRA5 et GRA7 (Coppens *et al.*, 2006) être stocké et sécrété sous la forme de multimères ;
- GRA5 est associée en complexe à HSP90 qui pourrait aider au repliement adéquat de son domaine transmembranaire et favoriser sa solubilité et/ou son ciblage vers la voie de sécrétion des GD.

Les multimères et les interactions établies par les protéines GRA pourraient permettre aux domaines hydrophobes des protéines GRA de ne pas être exposés et ainsi favoriser leur solubilité à 100 000 g dans les GD et lors de leur sécrétion dans la VP. La notion de solubilité des protéines GRA est à utiliser avec précaution. En effet, l'étude réalisée par P. Ruffiot au cours de sa thèse (thèse juillet 2007) montre que les fractions parasitaires, vacuolaires ou issues des produits de sécrétion *in vitro*, solubles à 100 000 g, sont riches en matériel protéique et probablement aussi lipidique. Les protéines GRA dites solubles à 100 000 g pourraient en fait être incluses dans des structures de taille et de densité suffisamment faibles pour ne pas sédimenter lors de l'ultracentrifugation. Nos résultats suggèrent que ces structures pourraient être des complexes et/ou de petits multimères de protéines GRA. Toutefois, on ne peut exclure qu'il s'agisse également de microvésicules lipidiques ou de micelles, surtout lors de la sécrétion *in vitro* des protéines GRA et lors de la sécrétion dans la VP.

2. Agrégation des protéines GRA dans les GD

La séparation des protéines GRA par biochimie conventionnelle suggère que les protéines GRA pourraient former des oligomères ou des agrégats dans les GD. Cette hypothèse est en accord avec le profil semi-agrégé des protéines GRA dans les GD. Les résultats de thèse de P. Ruffiot indiquent que ces formes denses de protéines GRA se dissocient progressivement au cours de la sécrétion des protéines GRA dans la VP, probablement de manière à leur permettre de s'associer aux membranes de la VP sous forme monomériques ou en petits assemblages. P. Ruffiot montre également que GRA1 et GRA2 ne suivent pas cette règle et que dans les GD, elles ne sont pas incluses dans les oligomères ou agrégats des protéines GRA étudiées mais qu'elles sont plutôt associées à des structures de faible densité.

Cette tendance des protéines GRA à s'oligomériser ou à s'agréger dans les GD rappelle le comportement des chromogranines A et B qui assurent la formation du cœur protéique agrégé des granules mammifères (Jain *et al.*, 2002 ; Beuret *et al.*, 2004). Le comportement biochimique original des protéines GRA pourrait en fait être assez proche de celui des protéines granulaires mammifères et l'agrégation des protéines de GD pourrait donc favoriser leur ciblage vers la voie de sécrétion. Au centre des interactions établies entre protéines GRA, GRA7 pourrait être responsable de l'oligomérisation ou de l'agrégation des protéines de GD.

3. Ciblage des protéines GRA vers la voie de sécrétion des GD

Les interactions établies par les protéines GRA entre elles, le complexe GRA5-HSP90, la multimérisation, l'oligomérisation et l'agrégation des protéines GRA constituent autant de mécanismes potentiels pour le ciblage de ces protéines vers la voie de sécrétion des GD.

A ces données, il est nécessaire d'ajouter les résultats de C. Gendrin, lors de sa thèse réalisée dans le laboratoire (soutenance prévue en décembre 2007). En effet, C. Gendrin a recherché les domaines des protéines GRA transmembranaires responsables du tri de ces protéines dans les GD. Ses travaux ont permis l'identification, en plus du peptide signal N-Terminal, de deux signaux complémentaires chez les protéines GRA possédant un domaine transmembranaire central. Le premier, localisé dans le domaine N-Terminal, est caractéristique d'une courte hélice chargée tandis que le second est situé au niveau du domaine transmembranaire. Les mutations réalisées sur le domaine hydrophobe transmembranaire de GRA5 et GRA6 montrent que ces domaines sont impliqués dans le ciblage des protéines GRA dans les GD, ce qui est en accord avec les résultats de Karsten *et al.* (Karsten *et al.*, 2004). Mais fait particulièrement intéressant, la modification de l'hélice chargée N-Terminale des protéines GRA5 et GRA6 entraîne leur redistribution à la membrane plasmique parasitaire (Gendrin *et al.*, en préparation). Ces données montrent que les protéines GRA, même si elles n'ont jamais été détectées associées à la membrane des GD, ressemblent aux nombreuses protéines des granules de mammifères (carboxypeptidase CPE, prohormones convertases PC1/3 et PC2, chromogranine CgA, peptidyl- α -amidating monooxygénase (PAM) et phogrine) qui sont notamment ciblées vers la voie de sécrétion *via*

leur courte hélice chargée N-Terminale ou leur domaine transmembranaire (Dikeakos and Reudelhuber, 2007).

Alors que la voie de sécrétion par défaut des protéines solubles passe par les GD *via* un peptide signal hydrophobe N-terminal (Karsten *et al.*, 1998), le ciblage des protéines GRA vers les GD semble nécessiter plusieurs autres mécanismes complémentaires et analogues à ceux décrits chez les mammifères : un domaine transmembranaire et/ou une courte hélice chargée, une protéine cargo et un processus d'oligomérisation ou d'agrégation.

4. Sécrétion des protéines GRA dans la VP en vue de leur association membranaire

Les protéines GRA associées aux membranes de la VP sont généralement considérées comme étant les formes actives de ces protéines. Les formes solubles et agrégées des protéines GRA dans les GD pourraient correspondre à deux états de stockage différents favorisant la sécrétion de protéines GRA fonctionnelles :

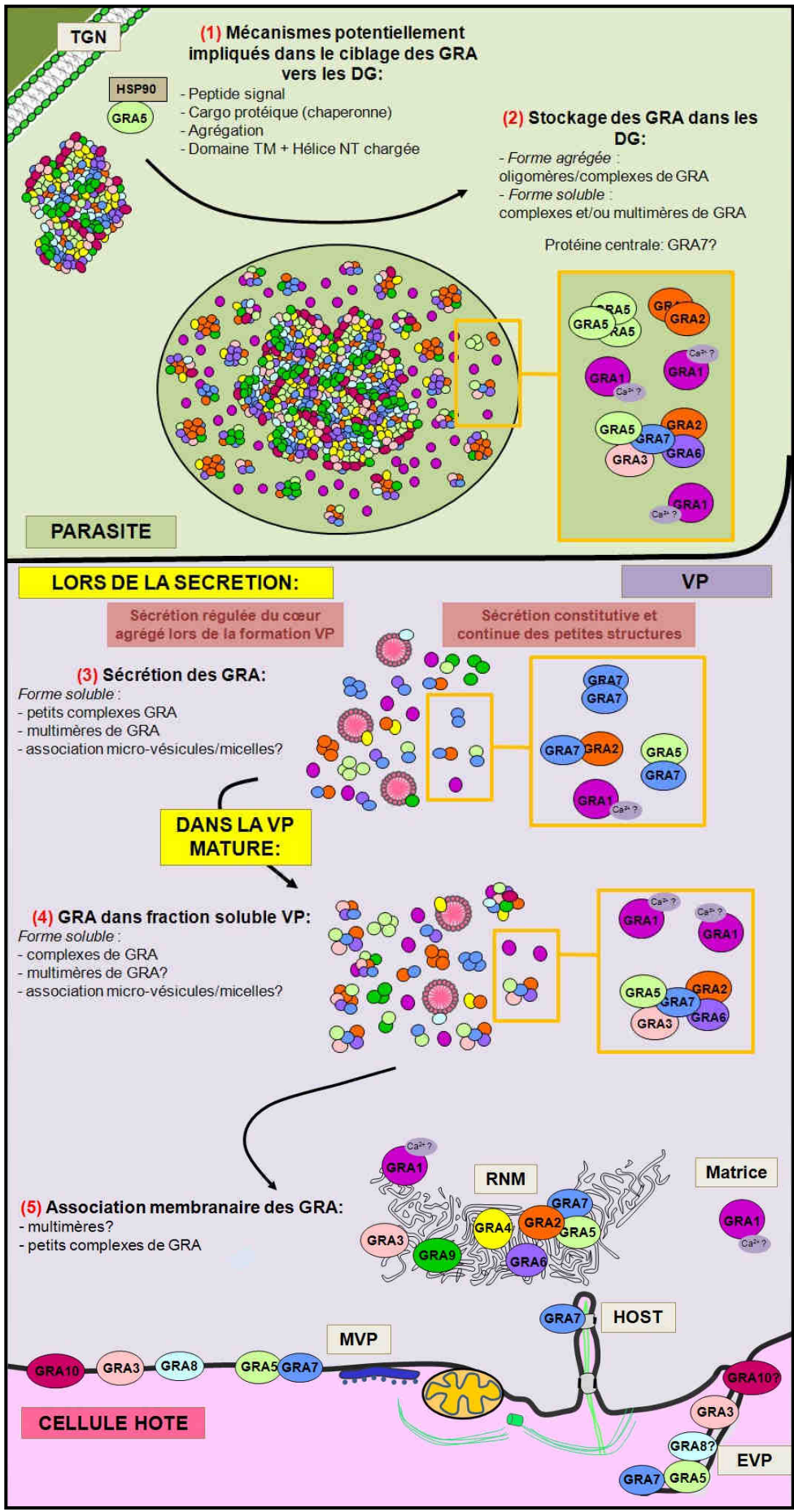
- un état agrégé, sécrété de manière régulée lors de la formation de la VP, et permettant la libération d'un stock important de protéines GRA pour la mise en place des compartiments de la VP que constituent la MVP, les HOST et le RNM ;
- un état soluble, sécrété de manière constitutive au cours de la multiplication parasitaire, et permettant la libération continue des protéines GRA nécessaires à l'accroissement des structures membranaires de la VP déjà en place.

Le fait que GRA1 et GRA2 ne soit pas associées aux structures denses des GD suggère que le stock entier de ces deux protéines pourrait être en permanence accessible par le parasite dont les besoins en protéines GRA1 et GRA2 pourraient être plus importants que ceux des autres protéines GRA. En effet, GRA1 avec ses domaines de liaison au calcium, pourrait réguler en permanence le taux de calcium dans la VP et maintenir la multiplication intracellulaire des parasites en inhibant leur libération hors de la VP. GRA2 pourrait subvenir au besoin constant et massif de synthèse du RNM lié à l'accroissement exponentiel de la surface de la VP.

Chez les mammifères, la libération des protéines du cœur agrégé des granules de sécrétion requiert une étape de maturation caractérisée par le clivage de la pro-protéine granulaire par une protéase. Chez *Toxoplasma*, les protéines des GD ne semblent pas subir de clivage protéolytique. Le mécanisme responsable de la dissociation des protéines GRA du cœur agrégé et celui induisant la sécrétion des GD restent inconnus.

L'ensemble des résultats et hypothèses majeurs de ce chapitre sont repris dans le schéma de la **Figure 55**.

Figure 55 : Trafic des protéines GRA depuis leur stockage dans les GD jusqu'à leur insertion membranaire post-sécrétoire aux membranes de la VP mature. (1) Les protéines GRA sont triées vers les GD au niveau du réseau *trans*-Golgi (TGN) selon plusieurs mécanismes potentiels impliquant : le peptide signal N-Terminal des protéines GRA, des cargos protéiques tels que HSP90 associé à GRA5, un processus d'agrégation des protéines GRA et des domaines comprenant une hélice chargée dans la partie N-Terminale (NT) et une région du domaine transmembranaire (TM) des protéines GRA. **(2)** Dans les GD, les protéines GRA sont stockées à la fois sous un état agrégé permis par l'oligomérisation et la formation de complexes de protéines GRA, et un état soluble facilité par les complexes qu'elles constituent et leur multimérisation (dimères de GRA2, trimères de GRA5). GRA7 pourrait être la protéine centrale de ces complexes et être responsable de l'agrégation du cœur des GD. **(3)** Le cœur agrégé des GD pourrait être sécrété de manière régulée lors de la formation de la VP tandis que les structures moins denses des GD pourraient être libérées de manière constitutive tout au long du développement parasitaire. Les protéines GRA sont dans les deux cas, sécrétées dans la VP sous forme soluble à 100 000g. Cette solubilité semble être permise par la multimérisation (dimères de GRA7) et les petits complexes que forment les protéines GRA mais on ne peut exclure qu'elles soient également associées à des micro-vésicules ou des micelles. **(4)** Dans la VP mature, cet état soluble des protéines GRA multimérisées, en complexes et/ou associées à des micro-vésicules lipidiques semble conservé dans la fraction soluble de la VP. **(5)** A l'exception de GRA1 qui reste soluble dans la matrice de la VP mature, les protéines GRA s'associent aux membranes de la VP sous la forme de petits complexes et/ou de multimères : GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9 ainsi qu'une partie de GRA1, GRA3, GRA5 et GRA7 s'associent au RNM ; GRA3, GRA5, GRA7, GRA8 et GRA10 sont ciblées à la MVP et aux EVP ; GRA7 est aussi associée aux HOST. Dans les membranes de la VP, GRA2 est associée à GRA5 et GRA7 et GRA4 et GRA6 sont dans l'environnement proche de GRA2. GRA5 est également associée à GRA7.



CHAPITRE V

Etude de l'association de GRA2 aux membranes du RNM

Ce second chapitre de mes résultats traite de l'association de GRA2 aux membranes du RNM dont elle induit la formation. Elle comprend l'étude du rôle des différentes hélices alpha-amphipatiques de GRA2 dans la fonction de la protéine, *via* la délétion combinée de ses différents domaines hydrophobes. Ce chapitre présente également l'étude du mode d'association membranaire de GRA2 à partir de systèmes de membranes modèles (autres travaux réalisés dans le laboratoire) et l'étude complémentaire que j'ai réalisée sur les partenaires lipidiques par des expériences de superposition protéine-lipide (« lipid overlays »). Ces dernières études ont été étendues aux protéines GRA3, GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9 afin d'obtenir une vue d'ensemble de la problématique d'association membranaire post-sécrétoire des protéines GRA, et comparée aux différents systèmes protéiques d'association et de courbure membranaires décrits dans la littérature dans des modèles eucaryotes mammifères.

A. CONTEXTE

Après leur sécrétion sous forme soluble dans la matrice de la VP, les protéines GRA s'associent aux différentes membranes qui composent ce compartiment. Leur répartition variée laisse entendre qu'il existe un mécanisme de ciblage permettant leur association préférentielle à certaines structures membranaires.

Plus particulièrement, dans la première heure qui suit l'invasion, GRA2 et GRA6 s'associent au niveau de l'invagination postérieure du parasite, aux vésicules membranaires qui vont constituer le RNM. Ainsi, GRA2 permet la formation du RNM qui est stabilisé par GRA6 (Mercier *et al.*, 2002). Comment GRA2 s'associe-t-elle au RNM et par quel mécanisme GRA2 contribue-t-elle à la formation des vésicules constitutives du RNM ?

Pour répondre à ces questions, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes qui régissent l'insertion des protéines dans les membranes et ceux qui génèrent et maintiennent les courbures membranaires.

1. Mécanismes d'insertion membranaire

Les protéines membranaires qui échappent à la voie classique d'insertion co-traductionnelle sont insérées post-traductionnellement, 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 membranaire, 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 il 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.

a) L'insertion d'un segment transmembranaire

L'insertion d'une protéine dans une bicouche membranaire n'est possible que si la protéine possède un segment suffisamment hydrophobe pour s'accommoder de l'environnement apolaire du cœur de la bicouche. Ce segment doit être également suffisamment long pour traverser la bicouche lipidique. Ainsi, un segment de 20 acides aminés en conformation hélicoïdale (conformation la plus courante) est juste assez long pour traverser le cœur hydrocarboné d'une bicouche typique (Popot and Engelman, 1990). Toutefois, la membrane ne constituant pas un environnement homogène, la probabilité d'insertion ne dépend pas uniquement de l'hydrophobicité globale du domaine transmembranaire mais aussi de la localisation propre de chacun des résidus au sein du domaine transmembranaire (Hessa *et al.*, 2005).

Le domaine transmembranaire central des protéines GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7 et GRA8 est suffisamment hydrophobe et/ou long pour traverser une membrane.

b) Insertion assistée

L'insertion des protéines membranaires semble être le plus souvent assistée par une machinerie protéique spécialisée, appelée translocon. Le translocon est un complexe de protéines intégrales de membrane qui peut guider les segments protéiques à la fois à travers et au sein même de la bicouche lipidique environnante. Ce mécanisme assisté concerne en particulier toutes les protéines insérées co-traductionnellement, par le biais des translocons Sec61 chez les eucaryotes ou SecY chez les procaryotes (Alder and Johnson, 2004 ; 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 and Subramani, 2006 ; Paschen and Neupert, 2001).

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 dans le réticulum endoplasmique du parasite.

Le ciblage différentiel des protéines GRA dans les différentes membranes de la VP pourrait être facilité par des machineries de translocation spécifiques de chacun de ces systèmes membranaires. En effet, chez les eucaryotes, il a été montré que différentes membranes d'un même organe peuvent avoir des machineries de translocation post-traductionnelles propres telles que les membranes internes et externes des mitochondries. Cette hypothèse nécessiterait la sécrétion dans la VP des composants des machineries de translocation concernées (*via* les rhoptries, les GD, ou encore associées aux vésicules pré-ludant au RNM). A ce jour, aucune protéine constituant de tels translocons n'a été identifiée dans la VP ; cependant, les particules membranaires observées au niveau de la MVP et du RNM pourraient y faire penser (Lemgruber *et al.*, 2007).

c) Insertion spontanée

L'insertion d'une protéine dans une membrane peut également se produire de manière spontanée. 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 aux 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 and 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).

L'insertion spontanée d'une protéine implique tout d'abord un état intermédiaire "molten globule" où la protéine s'adsorbe à la surface de la bicouche (White *et al.*, 2001). Dans cette configuration, les structures secondaires destinées à être insérées s'organisent (formation des hélices) mais il manque encore les contacts tertiaires entre hélices, contacts qui sont spécifiques de l'état final inséré. L'insertion membranaire de la protéine est ensuite permise par l'insertion de son (ses) domaine(s) transmembranaire(s) qui entraîne la translocation des domaines C-terminal ou N-terminal polaires. Toutefois, cette insertion requiert une désorganisation suffisante de la bicouche lipidique et un domaine polaire de taille réduite (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). La protéine insérée adopte enfin sa topologie finale *via* des interactions électrostatiques entre la protéine et la bicouche, interactions qui préviennent ou promeuvent la translocation de segments polaires chargés (Gallusser and Kuhn, 1990 ; van Klompenburg and de Kruijff, 1998). La longueur du domaine membranaire influe également de manière importante sur la topologie (Brambillasca *et al.*, 2006) (**Figure 56**).

Comme les autres protéines GRA, GRA2 est une petite protéine amphitropique qui pourrait très vraisemblablement s'insérer de manière spontanée dans des membranes, du moins *in vitro*.

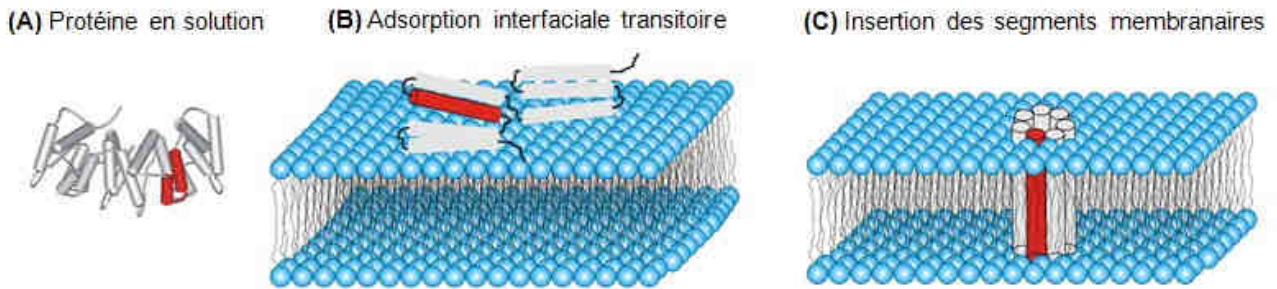


Figure 56 : Processus d'insertion spontanée. Exemple de l'insertion spontanée de la protéine Annexine B12. **(A)** La protéine est sous forme de monomères en solution. Les régions rouges ont une structure hélice-boucle-hélice dans la forme soluble. **(B)** La protéine s'adsorbe à l'interface de la bicouche lipidique, suite à 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. Repris de la thèse de P. Ruffiot, juillet 2007.

d) Stabilisation des protéines après insertion : Réarrangements dans la membrane

La protéine doit trouver une conformation stable, pendant ou après son insertion. Pour cela, les segments de la protéine se réarrangent ou s'insèrent éventuellement dans la membrane *a posteriori*. Plusieurs types d'interaction entrent en jeu : i) 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 ; ii) des interactions entre hélices, voire entre protéines. Le réarrangement de la protéine dans la membrane vise à minimiser toutes les forces en jeu (Lee, 2004).

✓ Interactions protéine-lipides.

La composition lipidique de la membrane-hôte peut déterminer le sort des protéines en cours d'association. Elle peut affecter non seulement l'efficacité de la translocation et la topologie de la protéine membranaire, mais également sa stabilité, son assemblage en complexes oligomériques et son activité (Schneiter and Toulmay, 2007). Ainsi, la longueur du domaine transmembranaire de la protéine insérée est un paramètre important car son inadéquation avec l'épaisseur du cœur hydrocarboné de la bicouche serait à l'origine d'une tension de décalage hydrophobe. De même, la forme de la protéine doit être en adéquation avec celle de la bicouche : 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 cœur 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 and 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.

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, notamment le ciblage de GRA2 au niveau du RNM. Comme il l'a été démontré pour GRA7 avec des phosphoinositides (PIs) (Coppens *et al.*, 2006), des interactions spécifiques GRA2-lipides pourraient permettre la stabilisation de GRA2 dans les membranes du RNM.

✓ Interactions protéine-protéine.

L'acquisition par la protéine de sa conformation stable dans la bicouche membranaire est une étape clé qui est permise par les interactions que la protéine établit avec d'autres protéines associées à la membrane et par les interactions entre ses propres domaines. En effet, la protéine recherche sa conformation stable *via* la compaction de ses hélices insérées de manière stable dans la membrane, en particulier par le biais d'interactions polaires entre les "arêtes" centrales des hélices (Adamian and Liang, 2002). Le réarrangement de la protéine pourrait même induire des translocations complémentaires de segments dans ou à travers la membrane.

L'association de GRA2 avec GRA7 et GRA5 ou avec GRA4 et GRA6 (interactions mises en évidence par l'utilisation de l'agent pontant DSP (Dithio-bis Succinimidyl Propionate) (Labruyère *et al.*, 1999)) au niveau des membranes du RNM, pourrait faciliter la stabilisation de GRA2 au niveau du RNM.

2. Génération et maintenance de courbures membranaires

La compréhension des mécanismes de courbure membranaire et de formation de tubules membranaires est une question centrale en biologie. Elle fait l'objet d'intenses recherches à l'interface entre la biologie cellulaire, la biochimie et la biophysique. En effet, la genèse de membranes courbées est par exemple, le point de départ de la formation des compartiments cellulaires qui sont au centre des mécanismes de synthèse, modification, tri et trafic des protéines (membranes du réticulum endoplasmique, des saccules Golgiens, du système endomembranaire), etc.

De nombreux paramètres entrent en jeu pour créer la courbure initiale des membranes, parmi lesquels une composition particulière en lipides et une asymétrie de ces lipides (Matsuo *et al.*, 2004 ; Sonnino *et al.*, 2007 ; Zimmerberg and Koslov, 2006). Cependant, la genèse de membranes cylindriques requiert une énergie importante qui ne peut être apportée que par des protéines. En effet, ce sont les protéines qui sont capables de changer la courbure des membranes en appliquant des forces sur la surface membranaire et en réduisant ainsi les tensions générées par la seule asymétrie des lipides (Zimmerberg and Koslov, 2006).

Les protéines impliquées dans la courbure des membranes peuvent agir selon plusieurs mécanismes différents : le charpentage, la courbure spontanée, les senseurs de courbure, ou par l'action d'une protéine

motrice du cytosquelette. Toutefois, ces protéines agissent souvent de concert pour générer un tubule membranaire ou une vésicule à partir d'une membrane plate. Il est à noter que dans les cellules eucaryotes, la plupart des protéines impliquées dans la courbure initiale de membrane et/ou la tubulation ont une affinité pour les PIs et notamment pour le Phosphatidylinositol (4,5) Bi-Phosphate (PI(4,5)P₂) et qu'elles interagissent directement ou indirectement avec les filaments d'actine.

a) Courbure générée par mécanisme de charpentage

Certaines protéines peuvent courber des membranes par un mécanisme de charpentage qui contraint la membrane et lui impose une courbure. Cela implique que les composants du manteau se multimérisent pour former 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 une forte affinité pour la membrane : l'énergie de liaison protéine-membrane doit être supérieure à l'énergie de courbure de la membrane (Zimmerberg and Kozlov, 2006). Les protéines connues pour agir *via* ce mécanisme sont nombreuses. Elles comprennent les complexes protéiques COPI, COPII et les adaptateurs de clathrine qui permettent d'induire la courbure sphérique nécessaire à la formation des vésicules de transport. C'est le cas également de la dynamine, des protéines à IMD (IRSp53/Missing-in-Metastasis domain) et des protéines contenant un domaine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs), y compris l'endophiline qui permettent d'initier une courbure cylindrique (Dawson *et al.*, 2006) (**Figure 57**).

✓ *Dynamines*

Les protéines de la famille des dynamines (**Figure 57A**) s'assemblent en hélices alpha (en présence ou en absence de lipides) et peuvent s'associer aux membranes en liant les PIs, imposant une forme cylindrique aux membranes (Takei *et al.*, 1995 ; Hinshaw and Schmid, 1995 ; Sweitzer and Hinshaw, 1998). Parmi les assemblages protéiques formant des manteaux (clathrine et adaptateurs, complexes COPI, COPII), seuls les assemblages de dynamine semblent remplir les conditions permettant de générer une courbure membranaire (Praefcke and McMahon, 2004).

✓ *Protéines à domaine BAR*

Certaines protéines à domaines BAR (Bar/Amphiphysin/Rvs) semblent également capables d'incurver des membranes par le mécanisme de charpentage. Ces protéines sont impliquées dans de très nombreux processus de tubulation tels que la formation de tubules T 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 comme les PIs. Le cas est souvent compliqué par le fait que de nombreuses protéines à domaines BAR contiennent également une ou plusieurs hélices amphipatiques qui jouent un rôle majeur dans la déformation des membranes. Cependant, certaines telles que l'arfaptine ne contiennent aucune hélice amphipatique et sont cependant capables de tubuler des membranes (**Figure 57B**). De plus,

certaines dont l'hélice amphipatique a été enlevée par mutagenèse dirigée sont toujours capables de déformer efficacement des membranes (domaine BAR de l'amphiphysine) (Peter *et al.*, 2004).

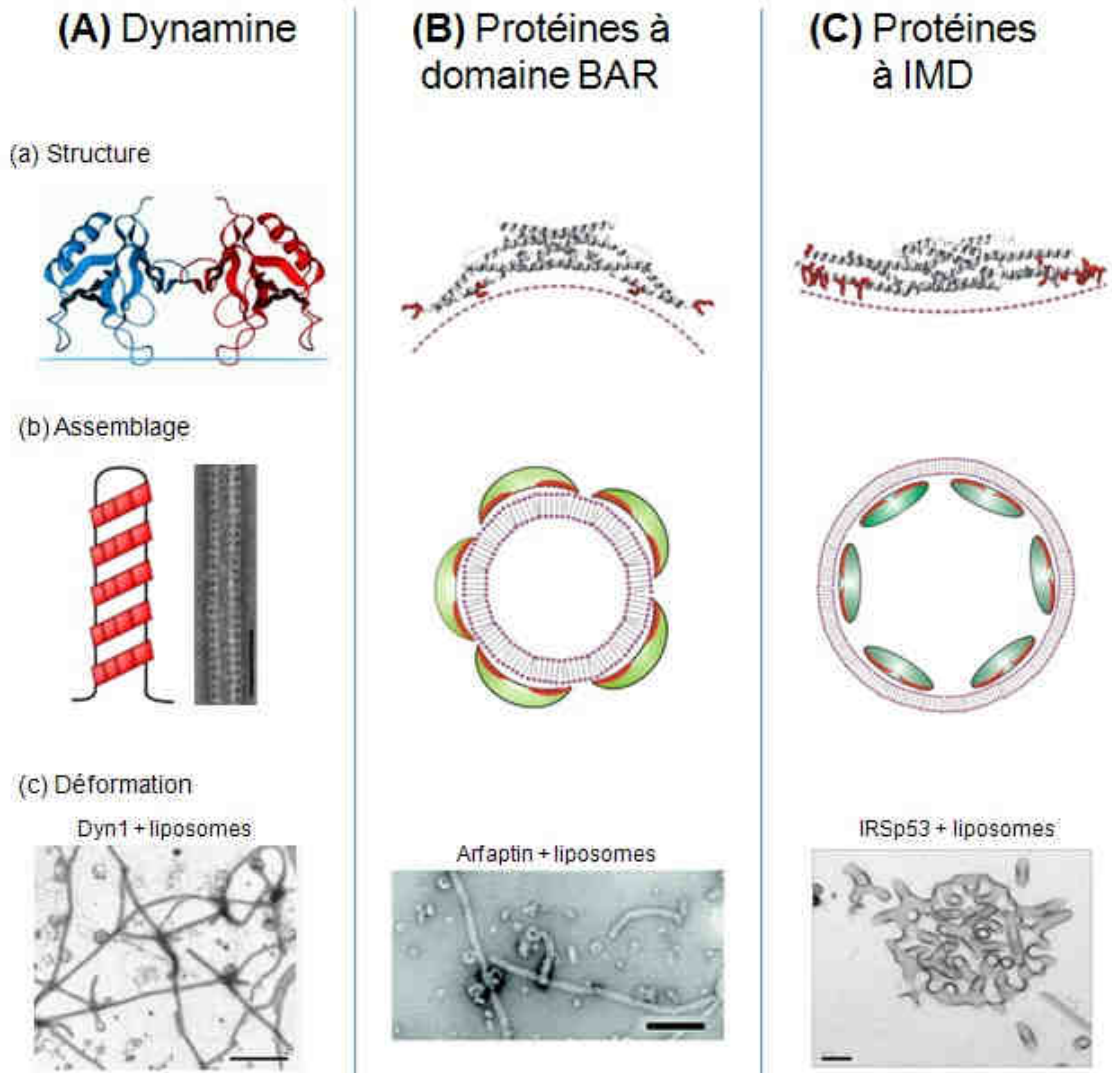


Figure 57 : Courbure générée par mécanisme de charpentage. (A) Charpentage par les protéines de la famille des dynamines. **(B)** Charpentage par les protéines à domaine BAR. **(C)** Charpentage par les protéines à IMD. (a) Les dynamines, tout comme les protéines à domaines BAR et IMDs, doivent s'assembler en dimères pour que leur courbure apparaisse. (b) Lorsqu'elles s'oligomérisent autour de membranes, la dynamine s'assemble en hélice (Echelle : 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 : invaginations tubulaires en présence de dynamine-1 (Dyn1) ou en présence d'arfaptine ; protrusions tubulaires en présence d'IRSp53. Echelle : 300nm. D'après Lomize *et al.*, 2006 ; Mattila *et al.*, 2007 ; Farsad and De Camilli, 2003 ; Sweitzer and Hinshaw, 1998 ; Peter *et al.*, 2004. Repris et modifié de la thèse de P. Ruffiot, juillet 2007.

✓ Protéines à IMD

On peut enfin évoquer des protéines nouvellement étudiées, appelées génériquement protéines à IMD (**Figure 57C**), 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 celle des domaines BAR : les domaines BAR génèrent des invaginations vers l'extérieur des liposomes ou des cellules, tandis que les domaines IMD génèrent des protrusions vers l'intérieur (Mattila *et al.*, 2007 ; Millard *et al.*, 2007 ; Suetsugu *et al.*, 2006). Ces protéines formeraient donc une charpente à l'intérieur des tubules formés. Les protéines possédant des domaines IMD présentent la particularité de déformer les domaines membranaires riches en PI(4,5)P₂ pour former des protrusions membranaires, à la base par exemple, de la formation des filopodes (Mattila *et al.*, 2007).

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

b) Courbure générée par mécanisme de courbure spontanée locale

✓ Insertion partielle d'une hélice amphipatique

Un des mécanismes majeurs de déformation des membranes est l'insertion partielle ou interfaciale d'une hélice amphipatique. L'insertion superficielle d'une hélice amphipatique 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. 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 telles que Sar1 (Lee *et al.*, 2005) et des protéines à domaines BAR : endophiline (Farsad *et al.*, 2001 ; Gallop *et al.*, 2006), amphiphysine (Peter *et al.*, 2004). Ce mécanisme a été observé expérimentalement pour diverses hélices amphipatiques : domaines ENTH (Epsin N-Terminal Homology), protéine Sar1 et amphiphysine (Ford *et al.*, 2002 ; Horvath *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2005 ; Itoh and DeCamilli, 2006) (**Figure 58**).

La protéine GRA2 impliquée dans la biogénèse du RNM (Mercier *et al.*, 2002) est décrite comme contenant deux hélices amphipatiques : 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 amphipatique. Cela semble être le cas en particulier

pour des protéines impliquées dans la reformation du réticulum endoplasmique après mitose : Rtn4a/NogoA et DP1-Yop1p (Voeltz *et al.*, 2006).

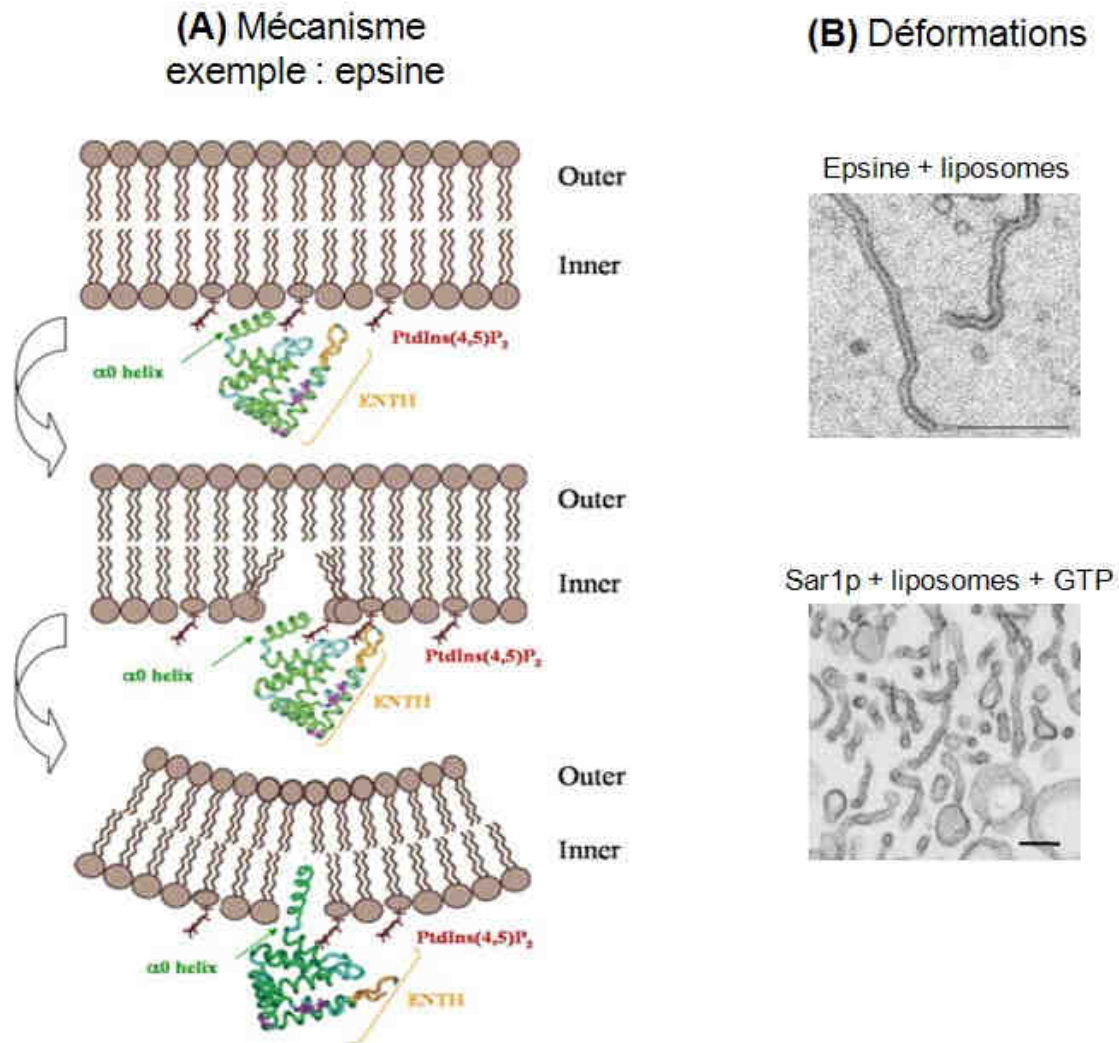


Figure 58 : Courbure générée par insertion d'hélice amphipathique. (A) Mécanisme de courbure spontanée locale : exemple de l'epsine. L'epsine, sous forme soluble, a un site de reconnaissance spécifique du PI(4,5)P₂, qui lui permet de se lier à la membrane. Le changement de conformation permettant l'exposition 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. Echelle : 100 nm. D'après Horvath *et al.*, 2007 ; Ford *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2005. Repris et modifié de la thèse de P. Ruffiot, juillet 2007.

c) Rôle du cytosquelette

Les microtubules et les filaments d'actine sont susceptibles d'exercer sur les membranes, des forces de traction par le biais de moteurs moléculaires en déplacement ou des forces de poussée par polymérisation, impliquant l'attachement des membranes à l'extrémité en croissance (**Figure 59**).

✓ **Déformations générées par les microtubules**

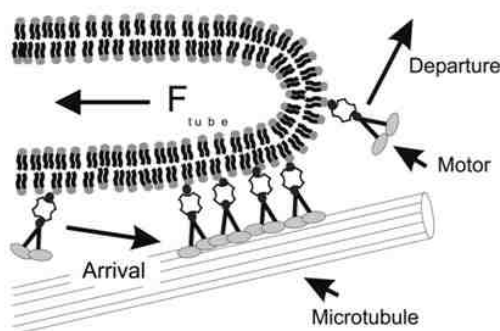
Des moteurs moléculaires tels que la dynéine, attachés à une membrane et en circulation sur un microtubule exercent une force localisée qui tire la membrane. La force fournit l'énergie nécessaire à la formation du tube membranaire sous tendu par le microtubule (Zimmerberg and Kozlov, 2006 ; Koster *et al.*, 2003). Il a été vérifié 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 and Lippincott-Schwartz, 1995). Les microtubules peuvent agir sur les membranes d'une autre façon, moins bien documentée, par poussée de microtubules dont l'extrémité positive est attachée à une membrane. Ce processus est décrit pour l'organisation du réticulum endoplasmique (Waterman-Storer and Salmon, 1998 ; Waterman-Storer *et al.*, 1995).

✓ **Déformations générées par les filaments d'actine**

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 and Gallop, 2005 ; Buss *et al.*, 2002). La force de poussée sur la membrane a été observée, entre autres, dans la formation de lamellipodes (Pollard and Borisy, 2003).

Les HOST sont des invaginations de la MVP dans lesquelles sont présents des microtubules de la cellule-hôte. Il est très probable que ces microtubules 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 MVP.

(A) Traction de la membrane



(B) Poussée de la membrane

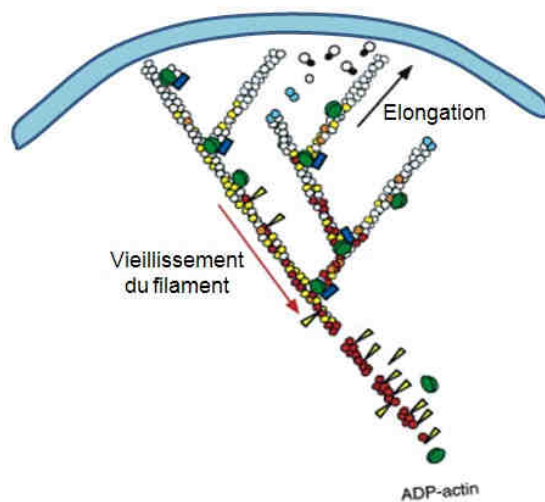


Figure 59 : Courbure générée par le cytosquelette. (A) Force de traction exercée par des moteurs moléculaires, attachés à une membrane, en déplacement sur des microtubules. (B) Force de poussée de filaments d'actine en polymérisation continue. L'élongation des filaments d'actine en polymérisation peut exercer une poussée sur la membrane. D'après Koster *et al.*, 2003 ; Pollard and Borisy, 2003. Repris de la thèse de P. Ruffiot, juillet 2007.

d) Les senseurs de courbure

Depuis les années 2000 est apparu le concept des protéines « senseurs de courbure ». Ce sont des protéines dont l'affinité de liaison aux membranes dépend du rayon de courbure de la membrane. Certaines de ces protéines contiennent une ou plusieurs hélices alpha-amphipatiques riches en sérines/thréonines/glycines mais pauvres en acides aminés chargés (domaine ALPS : Arf GAP1 Lipid packing Sensor). Ces domaines présentent la particularité de ne pas être structurés lorsqu'ils sont en solution mais lorsqu'ils sont amenés au contact d'une surface membranaire très courbée, ils forment une hélice alpha-amphipatique grâce à l'insertion des acides aminés hydrophobes de l'hélice dans la bicouche membranaire (Drin *et al.*, 2007). D'autres senseurs, tels que l'annexine B12 (**cf Figure 56**), subissent un changement conformationnel important à pH neutre et en présence de membranes courbes uniquement (Fischer *et al.*, 2007).

B. PROBLEMATIQUE

Comme les autres protéines GRA, GRA2 est sécrétée dans la VP sous forme soluble dès la fin du processus d'invasion où elle contribue à la maturation de la VP. Elle est directement impliquée dans la constitution du RNM qui assure l'organisation des parasites dans la VP en les retenant étroitement liés au cours des endodyogénies successives. Plus précisément, GRA2 s'associe au niveau de la partie postérieure invaginée du parasite au niveau de vésicules lamellaires (Mercier *et al.*, 1998a) qui sont à l'origine du RNM. Elle y amène également GRA6 qui stabilise le RNM mature (Mercier *et al.*, 2002). Les études précédentes ont montré que GRA2 (185 acides aminés) s'associe aux membranes du RNM *via* ses hélices alpha-amphipatiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (acides aminés 69-87 et 99-116, respectivement) (Mercier *et al.*, 1998a). Par contre, le mécanisme par lequel ces hélices alpha-amphipatiques déforment les membranes de manière à induire la formation des vésicules puis des tubules constitutifs du RNM n'a pas été élucidé.

L'utilisation des nouveaux programmes d'analyse bioinformatique de séquences protéiques a mis en évidence la présence de non pas deux, mais trois hélices alpha-amphipatiques dans la séquence de GRA2 : $\alpha 1$ (acides aminés 70-92), $\alpha 2$ (acides aminés 95-110) et $\alpha 3$ (acides aminés 119-139). L'objectif était donc de déterminer le rôle de chacune de ces trois hélices alpha-amphipatiques dans la formation du RNM et le maintien de la structure des parasites dans la VP. Ces travaux seront suivis d'une étude préliminaire de la réactivité de GRA2, et plus généralement des autres protéines GRA, sur différents lipides. Enfin, je conclurai sur le rôle et le mécanisme de tubulation de GRA2 en incluant d'autres résultats récents du laboratoire.

C. ETUDE DU ROLE DES HELICES ALPHA-AMPHIPATIQUES DE GRA2 DANS LA FORMATION DU RNM

1. « Functional domains of the Toxoplasma GRA2 protein in the formation of the Membranous Nanotubular Network of the parasitophorous vacuole »

Article accepté le 19-10-07 dans le Journal « International Journal for Parasitology ».

Afin de déterminer le rôle des trois hélices alpha-amphipatiques de GRA2 dans la formation du RNM, huit souches parasitaires présentant des délétions de GRA2 ont été construites. Ces mutants permettent l'expression de la partie N- ou C-Terminale avec une, deux ou les trois hélices alpha-amphipatiques de GRA2. Le trafic, l'hydrophobicité, l'association à GRA6, l'association membranaire, l'initiation de la tubulation du RNM et le maintien des parasites dans la VP de ces différents mutants ont été analysés par microscopie à fluorescence, microscopie électronique à transmission et à balayage, fractionnement parasitaire et vacuolaire.

Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the Membranous Nanotubular Network in the parasitophorous vacuole

LAETITIA TRAVIER¹, RICARDO MONDRAGON², JEAN-FRANÇOIS DUBREMETZ³, KARINE MUSSET¹,
MONICA MONDRAGON², SIRENIA GONZALEZ⁴, MARIE-FRANCE CESBRON-DELAUW¹, AND
CORINNE MERCIER^{1,*}

¹ Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5163, Université Joseph Fourier Grenoble I, Institut Jean Roget. Campus Santé. BP 170. 38042 Grenoble cedex 09, France

² Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV). Av. IPN 2508. CP 07300. D.F. México.

³ Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5535, Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon. Montpellier, 34095, France

⁴ Unidad de Microscopia electrónica. CINVESTAV. México

* Corresponding author.

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

fax: (+33) (0)4 76 63 74 97.

E-mail address: corinne.mercier@ujf-grenoble.fr

ABSTRACT

Amphipathic α -helices have been proposed as a general mean used by soluble proteins to induce membrane tubulation. Previous studies had shown that the GRA2 dense granule protein of *Toxoplasma gondii* would be a crucial protein for the formation of the intravacuolar membranous nanotubular network (MNN) and that one of the functions of the MNN is to organize the parasites within the parasitophorous vacuole. GRA2 is a small protein (185 amino acids only), predicted to contain three amphipathic α -helices (α 1: 70-92; α 2: 95-110 and α 3: 119-139) when using the prediction standard programs of secondary structure prediction. To investigate the respective contribution of each α -helix in the GRA2 functions, we used the Δ GRA2-HXGPRT knock-out vacuole as a natural complementation system to investigate systematically the functional domains of GRA2 complementation: eight truncated forms of GRA2 were expressed in the deleted recipient and the phenotypes of these mutants were analyzed. This study showed that 1) α 3, when associated to the N-terminal region (NT) and the C-terminal region (CT), is sufficient to target the protein to the parasite posterior end, where membrane association occurs, and to induce formation of membranous vesicles within the vacuole. Yet, when associated to CT only, α 3 is not sufficient to provide the hydrophobicity required for membrane association; 2) the α 1 α 2 region expressed alone is not sufficient to induce membrane tubulation within the PV and 3) only one mutant, NT- α 1 α 2 α 3, restores most of the biochemical and functional properties of GRA2, including traffic to the dense granules, secretion into the vacuole, association with vacuolar membranes, induction of the MNN formation and organization of the parasites within the vacuole. Finally, recent release of a new program constructed to predict amphipathic α -helices led us to discuss the possibility of only two amphipathic α -helices (70-112 and 119-139) in GRA2.

Index Keywords: *Toxoplasma gondii*, protozoa, parasitophorous vacuole, tubular membranes, membrane association; amphipathic alpha helix

1. Introduction

In eukaryotic cells, formation of tubular membranes is a matter of general interest because it is the starting mechanism which drives formation of all the sub-cellular compartments involved in protein synthesis, modification, selection and trafficking. Despite an increasing number of studies investigating this mechanism, it is still not fully understood. Specific composition in lipids or asymmetry in the lipid composition between membrane leaflets have been shown to be sufficient triggers to induce the initial membrane curvature responsible for the formation of membranous tubules ([Matsuo et al., 2004](#); [Sonnino et al., 2007](#)). However, proteins usually also contribute to the formation of membranous tubules by applying

pulling or bending forces on the membrane, thus reducing local tensions induced by lipid asymmetry (Zimmerberg and Koslov, 2006). Amongst the proteins which can induce changes in membrane curvature and/or act on the membrane to change its properties, are the amphitropic proteins which contain amphipathic α -helices (Cornell and Taneva, 2006): Lee et al. (2005) thus hypothesized that insertion of amphipathic α -helix(es) into a membrane bilayer could be the general mechanism used by cytosolic soluble proteins to initiate membrane curvature.

The intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* resides within its host cell, in a compartment named the parasitophorous vacuole (PV). The PV is formed during parasite active invasion from both the host cell plasma membrane and parasite secretory products (Håkansson et al., 2001; Charron et al., 2002, 2004). This non fusogenic compartment, devoid of most of the host cell proteins (Mordue et al., 1999), allows free diffusion of molecules up to 1,300 Da (Schwab et al., 1994). One of the most intriguing features of the *Toxoplasma* PV is the presence of a network of membranous nanotubes, here referred as the membranous nanotubular network (MNN). It is assembled 10-20 min post-invasion at the posterior end of the parasite. The membranous nanotubes of 40-60 nm in diameter are decorated with intramembrane particles (Lemgruber et al., 2007), extend up to 1 μ m in length within the vacuolar space, between the parasites, and connect with the PV membrane (Sibley et al., 1995; Magno et al., 2005). The function of the MNN is not yet clear; current hypotheses involve its participation in parasite intracellular development by increase of the surface of exchange between parasites and the host cell (Coppens et al., 2006; for a review, Mercier et al., 2005). Alternatively, a structural role in maintaining an ordered arrangement of daughter parasites during parasite division within the PV is proposed (Magno et al., 2005; Muniz-Hernandez-Hernandez et al., personal communication).

Shortly after invasion, the parasite secretes numerous proteins from Apicomplexa specific electron dense vesicles named the dense granules (reviewed by Mercier et al., 2005; Mercier et al., 2007). Most of the dense granule proteins, including a subset named the GRA proteins (Sibley et al., 1991), do not share any obvious homology with proteins of known function; thus, their abundance and timing of release into the PV led to hypothesize that they would play an important role in the maturation of the newly formed PV (Dubremetz et al., 1993). Amongst the nine GRA proteins described so far, GRA2, GRA4, GRA6, GRA9 and to a lesser extend, GRA3, GRA5 and GRA7 become associated with the MNN following secretion into the PV (for reviews: Mercier et al., 2005; 2007). One protein, GRA2, is particularly important for the MNN formation. Upon publication of the *GRA2* sequence, GRA2 was predicted to contain a N-terminal signal peptide of 23 amino acids, two amphipathic α -helices, comprising 18 (region [69-87]) and 17 amino acids (region [99-116]) in frame with two hydrophilic domains of 46 and 69 amino acids in N- and in C-terminus, respectively (Mercier et al., 1993). Subsequent studies performed on an HA9 tagged form of GRA2 expressed in the wild-type parasite showed that both the aforementioned amphipathic α -helices are essential for stable association of the protein with the vacuolar network membranes (Mercier et al., 1998a). Furthermore, analysis of mutant parasites deleted of their unique *GRA2* gene showed that GRA2 organizes the vacuolar components into elongated membranous tubules forming network (Mercier et al., 2002; Muniz-Hernandez-Hernandez et al., personal communication).

The increasing number of methods available to predict the secondary structure of proteins led us to analyze again the GRA2 protein sequence. The existence of a third amphipathic α -helix was predicted, placing α 1 in [70-92], α 2 in [95-110] and α 3 in [119-139]. This work was thus undertaken to investigate the contribution of each amphipathic α -helix in the MNN formation and in parasite organization by carrying out targeted deletions within the GRA2 coding sequence. The Δ GRA2 mutant was complemented with eight truncated forms of GRA2 and traffic, membrane association and function within the PV of mutant GRA2 proteins were explored.

2. Material and methods

2.1. GRA2 predicted secondary structure

The GRA2 protein sequence (185 amino acids) was analyzed using the programs of secondary structure prediction methods available at the **Expert Protein Analysis System** proteomics server (ExPASy server) (<http://kr.expasy.org/>), i.e. jpred (http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/results/jp_HR6pDYj/jp_HR6pDYj.results.html), nnpredict (<http://alexander.compbio.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html>), porter (<http://distill.ucd.ie/porter/>), predict protein (http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/submit_def.html), prof (http://www.aber.ac.uk/cgi-bin/user/~phiwww/get_prof_info), psa (<http://bmerc-www.bu.edu/psa/request.htm>), psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>), sopma (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), GOR (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html), HNN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html), or using the Amphipaseek program In Plane-Membrane Anchors prediction (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_amphipaseek.html) available at Pôle BioInformatique Lyonnais Gerland (<http://pbil.ibcp.fr/htm/index.php>). The amphipathic α -helices were represented using Protean from the DNASTAR software (Lasergene, Madison, WI) or the Pepwheel program available at EMBOSS (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/EMBOSS/>).

2.2. Parasites and cell culture

Tachyzoites of the RH wild-type (ATCC-50174); the RH *HXGPRT*⁻ (Donald et al., 1996); the Δ GRA2 mutant (Mercier et al., 1998b); the Δ GRA2-*HXGPRT* mutant (this study); and RH stably expressing GRA2-HA9 (Mercier et al., 1998a) were used in this study. Parasites were propagated in human foreskin fibroblasts (HFFs) maintained in Dulbecco modified minimum essential medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), 1% glutamine, and in presence of penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 μ g/ μ l). Parasites were harvested after complete lysis of the monolayer, purified through 3.0- μ m filters, and washed in PBS (Gibco). Epidermoid carcinoma cells from human larynx (Hep-2 cells,

ATCC-CCL23) were maintained in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% FBS, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin.

2.3. Antibodies

To detect the GRA proteins, both the monoclonal antibodies (mAbs) TG17-43 anti-GRA1, TG17-179 anti-GRA2, TG17-113 anti-GRA5 (Charif et al., 1990; Cesbron-Delauw et al., 1992), 6B5 anti-GRA6 (Labruyère et al., 1999) and the rabbit polyclonal serum directed against HISx6-GRA2 (Labruyère et al., 1999) were used. The mAb TG054 anti-SAG1 (Rodriguez et al., 1985) and the rabbit serum against *Toxoplasma* actin (Dobrowolsky et al., 1996) were used as controls. The HA9 epitope-tag was detected using the rabbit serum anti-HA11 or the rat mAb anti-HA9 purchased from Covance (Berkeley, CA) and Roche (Penzberg, Germany), respectively.

2.4. Construction of the Δ GRA2-HXGPRT knock-out *Toxoplasma* mutant

To disrupt the *GRA2* gene in RH *HXGPRT*⁻, the plasmid pGRA2/Ble/GRA2(8.9) previously used to generate the Δ GRA2 mutant in RH (Mercier et al., 1998b) was electroporated into freshly harvested RH *HXGPRT*⁻ tachyzoites. Phleomycin was added to allow integration of the plasmid vector into the *Toxoplasma* genome, as previously described (Mercier et al., 1998b). Stable clones were isolated by limited dilution in 96-well microtiter plates and further amplified in HFF cells.

2.5. Construction of *GRA2* deletion mutants

Eight plasmids expressing either the N- or the C-terminal hydrophilic domain of GRA2 (NT and CT, respectively), in frame with or without the predicted amphipathic α -helices, were constructed (Fig. 2A). The corresponding GRA2 fragments were PCR amplified from the *GRA2* full length cDNA (Mercier et al., 1993). All constructs contain the signal peptide of GRA2 (region [1-23]) and place the *GRA2* sequence between both the *SacI* and *NheI* cloning sites of GRA2-HA9 (Mercier et al., 1998a), from which the SAG1/Bleo/SAG1 cassette had been deleted, leading to C-terminal fusion of each GRA2 truncated protein with the HA9 epitope tag. In $\alpha1\alpha2$, $\alpha1\alpha2$ -CT, $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT, $\alpha3$ -CT and CT, the first five amino acids of the GRA2 N-terminal domain (NT) were added behind the signal peptide to allow efficient cleavage of the signal peptide (Fig. 2A). Each construct places the *GRA2* coding sequence under the control of its endogenous regulatory regions (promoter, 5' untranslated region (UTR), 3' UTR and poly A). The *Toxoplasma* mutant expressing NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$ was obtained by co-transfection into freshly harvested Δ GRA2-*HXGPRT* tachyzoites, of both the *GRA2* expression plasmid and the plasmid pmini *HXGPRT* carrying the *HXGPRT* selectable marker placed under the regulatory sequences of *dhfr* (Roos, 1993). All the other mutants were obtained by transfection of a plasmid vector containing the corresponding *GRA2* expression cassette PCR amplified and ligated into both the *HindIII* and *XbaI* cloning sites of the plasmid pTUB8myccGFPftailTy/HX (provided by D. Soldati) from which the 5'TUB/myc/GFP/Ty/3'Myo expression cassette had been deleted. The final plasmids thus carried both the mutated *GRA2* expression cassette and the *HXGPRT* selectable marker, cloned in opposed orientations. Freshly isolated tachyzoites were

electroporated with plasmid DNA suspended in cytomix buffer. Following transfection, parasites were grown in HFF cells without selection for 2 days, then selected for incorporation of both xanthine and mycophenolic acid (HXGPRT selection), as described by (Roos et al., 1994), isolated by limited dilution in 96-well microtiter plates and further amplified in HFF cells.

2.6. Immunoblot detection

Proteins were separated on 13% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. Membranes were blocked for 1 h with saturation solution (PBS containing 5% powder milk, 5% goat serum, 0.05% Tween-20 and 0.05% Triton-X114) and incubated for 2 h with primary antibodies in saturation solution. After incubation with peroxidase-conjugated goat secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Laboratories), proteins were detected using the Supersignal ECL system (Pierce Chemical).

2.7. Indirect immunofluorescence

Targeting of GRA2 truncated proteins to dense granules was investigated in extracellular parasites, fully permeabilized with Triton-X100. In order to study if truncated GRA2 proteins were secreted into the PV, HFF monolayers grown on coverslips were pulse-invaded for 5 min with freshly isolated tachyzoites, washed with PBS to eliminate non invaded parasites, and returned to culture for 10 min or for 24 h. Extracellular parasites or infected monolayers were fixed in 4% formaldehyde in PBS for 20 min, permeabilized for 10 min with 0.1% Triton-X100 or 0.002% saponin, respectively. When used, the same concentration of saponin was maintained throughout the staining process. Parasites and infected cells were blocked for 1h30 with PBS containing 5% FBS and 5% goat serum, and incubated for 1 h with primary antibodies in PBS containing 1% FBS. After washes, primary antibodies were revealed using BODIPY-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) or Texas-Red-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories). Coverslips were mounted on glass slides using Prolong Antifade reagent (Molecular Probes) and examined using an Axioplan 2 (Carl Zeiss) equipped for phase contrast and epifluorescence microscopy. Images were acquired with an x100 objective, using an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss) coupled to the Axiovision 3.1 software (Carl Zeiss) and the background was reduced using the "Image Processing and Analysis in Java" (Image J) software available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. To confirm that the "irregular" PV (see section 2.10) observed on figure 6B were the result of proliferation of only one parasite, HFF cells infected for 30 h were fixed, permeabilized with saponin and the PV membrane was decorated with the mAb anti-GRA5 followed by BODIPY-conjugated goat anti-mouse IgG.

2.8. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Monolayers of HFF cells grown on Permanox slides (Lux Scientific, Newbury, CA) were infected with parasites by rapid pulse invasion, fixed 20-24 h post-infection, and processed for TEM as described previously (Sibley et al., 1995; Mercier et al., 1998a).

2.9. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Hep-2 cells grown on glass coverslips were incubated with freshly lysed parasites for 2 hrs at 37°C. After elimination of non invaded parasites, infected cells were returned to culture for 12 hrs. Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS at room temperature and 1% OsO₄ in PBS for 1 h at 4°C. Fixed cells were dehydrated with increasing concentrations of ethanol, critical point dried in a CO₂ atmosphere in a Samdry-780A apparatus (Tousimis Research, USA) and gold coated in a Denton Vacuum Desk II (INXS Inc, Florida). Following attachment of coverslips to SEM aluminium holders, the apical membrane of host cells was removed using a metallic rod covered at one extremity by double faced adhesive tape. Both the treated coverslips and the adhesive tapes recovered from the rod were coated with gold particles and observed using a Scanning Electron Microscope JEOL JSM-35C (JEOL, LTD, Japan).

2.10. Determination of the ratio of "globular" PV versus "irregular" PV

Duplicated coverslips of HFF cells were infected for 30 h with GRA2 mutants at the ratio of 2 parasites per host cell to avoid multiple infections. Infected cells were rinsed, fixed in 4% formaldehyde in PBS, mounted and 150 PV randomly selected on each slide were observed by phase contrast with a 63x/1.25 plan neofluar objective. At this late development stage, just before parasite egress, wild-type parasites are contained within a globular PV which is observed close to the host cell nucleus. In contrast, most PV of GRA2 mutants were irregular in shape. Both normal looking "globular" PV and abnormal looking, "irregular" PV were counted for each mutant. The mean percentages + SD were calculated from 2 independent experiments. The ratio ["globular"- to "irregular" PV] was calculated for each mutant. The ratios were compared using a pairwise Wilcox test. Two-sided P values <0.01 were considered to indicate statistical significance.

2.11. Triton-X114 partitioning and cell fractionation experiments

The solubility of truncated GRA2 proteins within the parasite was examined by detergent partitioning: parasites were lysed in 10% Triton-X114 and after removal of the insoluble material (I), the aqueous phase (A) was separated from the detergent phase (D) by 10 min incubation at 37°C. Proteins were acetone precipitated and the GRA proteins were analyzed by immunoblot, as previously reported (Mercier et al., 1998a, Adjogble et al., 2004).

Association of GRA proteins with PV membranes was examined by cell fractionation of overnight infected cells. Both host cell and PV membranes were mechanically disrupted by passing infected host cells through 27g needles and released intracellular parasites were eliminated by 2,000 g centrifugation. The soluble fraction (high-speed supernatant, HSS) was separated from the membrane-associated fraction (high-speed pellet, HSP) by further centrifugation at 100,000 g for 1 h. Stability of association of the GRA proteins to the MNN was examined by treatment of HSP with 0.5 M KCl, 0.1 M carbonate pH 11, 1% NP-40, or 6 M urea, as previously described (Sibley et al., 1995; Mercier et al., 2002; Adjogble et al., 2004). Equal fractions of pellets and supernatants were analyzed by immunoblot.

3. Results

3.1. Revised prediction of the GRA2 secondary structure

Upon publication of the GRA2 cDNA sequence (Mercier et al., 1993), prediction of the secondary structure was performed according to the method derived from Garnier et al. (1978) and available on the DNASTAR software at that time. Except for an N-terminal signal peptide of 23 amino acids, two amphipathic α helices were predicted between amino acids 69 and 87, and 99 and 116, respectively. We made use of the numerous secondary structure prediction methods now available on the ExPASy server (<http://kr.expasy.org/>) to run new analysis of the GRA2 sequence, compile and compare their results. This led us to predict the presence of a third amphipathic α -helix: the helices α 1, α 2 and α 3, were thus defined as the segments [70-92], [95-110] and [119-139], respectively (Fig. 1A). The predicted GRA2 amphipathic α -helices were analyzed accordingly to the methods used for the representation of amphipathic structures in proteins: the Schiffer-Edmundson projection (Schiffer and Edmundson, 1967), which is a qualitative measure of amphipathy (Fig. 1B) and the calculation of the mean hydrophobicity (Eisenberg et al., 1982) (Table 1), which quantifies the amphipathy of an α -helix. The predicted GRA2 α -helices (16 to 23 amino acids), which have a net positive charge, were predicted to be truly amphipathic, according to their peak hydrophobic moment $\langle \mu H \rangle$ and their mean hydrophobicity $\langle H \rangle$ (Table 1). The mean hydrophobicity of their non polar face (Table 1) was in the range of those reported for other amphipathic α -helices-bearing proteins (Cornell and Taneva, 2006). However, using the hydrophobic moment plot reported by (Sharadadevi et al., 2005), only α 1 and α 3 were predicted to be surface active while α 2 was predicted to be globular.

3.2. Construction of a new *Toxoplasma* Δ GRA2 mutant

In order to investigate the functional importance of each amphipathic α -helix, we sought to complement a Δ GRA2 mutant with GRA2 proteins truncated in their respective amphipathic α -helices. To facilitate this complementation, we first created a new Δ GRA2 knock-out parasite by homologous recombination at the GRA2 locus in RH $HXGPRT^-$ (Δ HXGPRT) (Donald et al., 1996) after transfection of the pGRA2/Ble/GRA2 (8.9) plasmid (Mercier et al., 1998b) into Δ HXGPRT. To compare the phenotype of the Δ GRA2-HXGPRT mutant to that of the Δ GRA2 knock-out mutant previously reported (Mercier et al., 1998b, 2002), the PV ultrastructure of both mutants was compared by TEM, in HFF infected cells. Complete disappearance of the MNN was observed within the PV of Δ GRA2-HXGPRT, demonstrating that Δ GRA2-HXGPRT parasites behave in vitro in a similar manner as Δ GRA2 mutants (Fig. 5).

3.3. Complementation of Δ GRA2-HXGPRT with GRA2 truncated forms

Eight plasmids derived from GRA2 (Fig. 2A) were constructed, transfected into Δ GRA2-HXGPRT and positively selected for the integration of HXGPRT. All these constructs code for the 23 N-terminal amino acids of GRA2, which correspond to the predicted signal peptide. Each construct was fused in C-

terminal, with the HA9 epitope tag to facilitate immunodetection. The truncated GRA2 proteins contain either the N- (amino acids 24-69) or the C-terminal hydrophilic domain of GRA2 (amino acids 140-185), in frame with one, two or three amphipathic α -helices (Fig. 2A). Despite 9 attempts, the construct $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT failed to provide stable transformants. Analysis of this truncated protein was thus carried out during transient expression of the transgene, *ie* during the first three weeks consecutively to electroporation and under drug pressure. To distinguish the results obtained with this mutant from those obtained with all the other mutants, the truncated protein $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT as well as the corresponding *Toxoplasma* mutant were preceded by "Tr", the abbreviation of "transient protein expression".

3.4. The truncated proteins are targeted to dense granules and except for $\alpha3$ -CT, they present an hydrophobicity pattern similar to that of endogenous GRA2

We first verified that all the GRA2 truncated proteins were targeted to dense granules by co-labeling of extracellular parasites permeabilized with Triton-x100, with both a rabbit serum anti-HA and the mAb anti-GRA1 (supplementary data). To run basic biochemical analysis of truncated GRA2 proteins within the parasite, both their apparent molecular masses and their solubility were compared. Parasite lysates were separated by SDS-PAGE, probed by immunoblot with rabbit polyclonal serum anti-HA9, -GRA2 or the mAb TG17-179 anti-GRA2, and compared to the profiles of both GRA2-HA9 (Mercier et al., 1998a) and Δ GRA2-HXGPRT (Fig. 2B). The apparent molecular weight of each truncated GRA2 protein (from 12 kDa for $\alpha1\alpha2$ to 25 kDa for Tr $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT) was larger than the calculated one (from 5.9 kDa for $\alpha1\alpha2$ to 13.1 kDa for $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT, Table 1). This is in agreement with the observations previously made for the wild-type GRA proteins, including GRA2 (Mercier et al., 2005). As expected, the GRA2 mutant proteins deleted of CT (mutants NT- $\alpha1\alpha2$, NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$ and $\alpha1\alpha2$) were not detected by the mAb TG17.179 anti-GRA2, which recognizes specifically the C-terminus of GRA2 (Cesbron-Delauw et al., 1993) (Fig. 2B). We next verified that the truncations performed within the GRA2 sequence did not affect the relative hydrophobicity of the protein within the parasite. Indeed, endogenous GRA2 was previously shown to exist under three forms: a soluble-, an insoluble fraction and a hydrophobic form solubilized by Triton-X114 (Mercier et al., 1998a and Fig. 2B). Two kinds of GRA2 mutants were observed: similarly to endogenous GRA2, most of the mutant proteins partitioned either into the three phases (NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$, NT- $\alpha3$ -CT, $\alpha1\alpha2$ -CT, Tr $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT) or predominantly into the detergent phase (NT- $\alpha1\alpha2$ and $\alpha1\alpha2$). The two noticeable exceptions were NT-CT (control of soluble protein) and $\alpha3$ -CT, which both partitioned completely into the aqueous phase (Fig. 2C). We concluded from this experiment that the mutants which partition at least partially or totally into the detergent phase should, in theory, be capable of association with the vacuolar membranes while both NT-CT and $\alpha3$ -CT would be incapable of membrane association following secretion into the PV.

3.5. Stably expressed NT associated to at least one amphipathic alpha helix, is sufficient to drive posterior accumulation of GRA6

Since we had previously shown that the GRA2 truncated proteins were delivered to dense granules, we next verified that they would be efficiently secreted into the PV. Firstly, HFF cells were

infected overnight and then fixed; host cell membranes as well as the PV membrane were specifically permeabilized with 0.002% saponin and co-staining of both HA and GRA6 was performed. All the mutants provided a vacuolar signal, showing that the truncated proteins were efficiently secreted into the PV. All the HA signals but that of NT-CT overlaid predominantly the signal of GRA6, a MNN associated protein (Fig. 3A).

Following secretion into the PV, one peculiarity of both endogenous GRA2 and GRA6 is to transiently accumulate in an invaginated pocket of the parasite posterior end, at a cluster of multi-vesicular membranes which comprise the nascent MNN. This posterior accumulation of both GRA2 and GRA6, easily detected by immunofluorescence as a prominent dot, highlights the earliest association step of both GRA2 and GRA6 with PV membranes (Labruyère et al., 1999; Mercier et al., 1998a; Sibley et al., 1995 and Fig. 3B). In Δ GRA2 parasites, the vacuolar traffic of GRA6 is altered: the protein was shown homogeneously distributed within the vacuolar space 15 min post invasion, which demonstrated that GRA2 plays a crucial role in the posterior recruitment of GRA6 (Mercier et al., 2002 and Fig. 3B). Amongst the GRA2 mutants, both α 1 α 2-CT and α 3-CT restored a GRA2 dot but failed to restore the GRA6 dot while both NT-CT and α 1 α 2 failed to restore any dot. In contrast, both the GRA2 and GRA6 dots were detected in all the mutants expressing NT associated to at least one amphipathic α -helix (mutants NT- α 1 α 2, NT- α 1 α 2 α 3 and NT- α 3-CT) as well as in Tr α 1 α 2 α 3-CT (Fig. 3B). The HA dots observed in both NT- α 3-CT and α 3-CT suggested that α 3, like α 1 (Mercier et al., 1998a; 2002), is sufficient to drive posterior recruitment and early association of GRA2 with the vacuolar vesicles forming network. However, failure of both α 1 α 2-CT and α 3-CT to restore the GRA6 dot as well as its restoration by NT- α 1 α 2, NT- α 1 α 2 α 3, NT- α 3-CT or Tr α 1 α 2 α 3-CT also suggested that posterior accumulation of GRA6 requires more than any GRA2 α -helix.

3.6. Stably expressed NT associated to at least one amphipathic α -helix, as well as both Tr α 1 α 2 α 3-CT and α 1 α 2-CT, associate with the vacuolar membranes

Wild-type GRA2 partitions as both a soluble and a membranous fraction within the PV and the membranous form was shown to behave as an integral membrane protein (Sibley et al., 1995; Mercier et al., 1998a). To examine if GRA2 truncated proteins would be associated with PV membranes, cell fractionation of overnight infected cells was carried out to partially purify vacuolar membranes from intracellular parasites. Both wild-type GRA2 and GRA2-HA9 were detected in both the membranous (HSP) and the ultrasoluble vacuolar fractions (HSS) while the soluble controls NT-CT and α 3-CT were detected in the HSS only (Fig. 4A). α 1 α 2 was only detected in the PV membranous fraction only, which is in agreement with its hydrophobic composition. The mutants expressing NT associated to at least one amphipathic α -helix (mutants NT- α 1 α 2, NT- α 1 α 2 α 3 and NT- α 3-CT) as well as both Tr α 1 α 2 α 3-CT and α 1 α 2-CT partitioned into both the membranous- and the soluble fractions of the PV (Fig. 4A).

Several bands, usually a doublet or a triplet of similar size associated with the HSP fraction, were observed for most of the mutants (Fig. 4A,B). GRA2 is phosphorylated (Mercier et al., 2005). The different bands

detected here might thus correspond to different phosphorylation steps of the mutant proteins but we did not investigate further their significance.

Treatment of the HSP fractions with different membrane destabilizing agents showed that similarly to endogenous GRA2, the membrane-associated forms of both NT- $\alpha1\alpha2$ and NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$ were extracted totally by NP-40 (Fig. 4B). This suggested that both these mutant proteins associate with the vacuolar membranes through hydrophobic interactions mainly (Fig. 4B). In contrast, the NT- $\alpha3$ -CT, Tr $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT and $\alpha1\alpha2$ -CT mutant proteins were extracted only partially from the vacuolar membranes by NP-40. They were also partially extracted by both KCl and Carbonate treatments, suggesting that association of these truncated proteins with vacuolar membranes would be mediated through mixed interactions, including both hydrophobic and ionic interactions (Fig. 4B).

Together with the study of the vacuolar targeting of GRA2 mutant proteins (Fig. 3), these results showed that $\alpha1\alpha2$ -CT is capable of normal trafficking to the posterior end of the parasite shortly after secretion, where it stably associates with the forming vacuolar network membranes. Yet, it fails to drive GRA6 to the parasite posterior end. GRA6 was previously shown to stabilize the MNN once formed (Mercier et al., 2002). It was thus likely that formation of PV membranous tubules would be initiated in $\alpha1\alpha2$ -CT but that these tubules would not be stabilized. Despite its global hydrophily within both the parasite and the PV, $\alpha3$ -CT traffics to the posterior end of the parasite (GRA2 dot) but fails to recruit GRA6 and to stably associate with the vacuolar membranes. Formation of membranous nanotubes within the vacuolar space was thus not expected. In contrast, NT- $\alpha3$ -CT, NT- $\alpha1\alpha2$ and NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$, which all traffic normally to the posterior end of the parasite while recruiting GRA6 efficiently, are sufficient for stable association of GRA2 with the vacuolar membranes. They were thus expected to initiate membrane tubulation within the PV.

3.7. Amongst the GRA2 deletion mutants, only NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$ partially restores formation of the MNN

An important common phenotype observed consecutively to the deletion of either *GRA2* or *GRA6*, is the loss of the vacuolar MNN tubular structure. Yet, comparison of the PV of these Δ *GRA* mutants showed clear differences in their vacuolar ultrastructure: while mainly aggregated material was observed within the PV of Δ *GRA2*, the PV content of Δ *GRA6* consisted in small vesicles. These results led to conclude that GRA2 would initiate membrane curvature and induce formation of small vesicles while GRA6 would stabilize the membranous tubules once formed (Mercier et al., 2002).

To investigate if the mutants which restore both the GRA2 and GRA6 dots (Fig. 3B) and which stably associate with the vacuolar membranes (Fig. 4) would restore the MNN, infected cells were fixed 24 h post-invasion, processed for TEM and their vacuolar ultrastructure was compared to that of both Δ *HXGPRT* (normal MNN composed of long membranous tubules) and Δ *GRA2-HXGPRT* (aggregated material mainly) (Fig. 5). The PV ultrastructure of NT- $\alpha1\alpha2$, $\alpha1\alpha2$, $\alpha3$ -CT and of $\alpha1\alpha2$ -CT was very similar to that of Δ *GRA2-HXGPRT*, with aggregated material mainly, while the PV ultrastructure of both NT- $\alpha3$ -CT and Tr $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT was similar to that of Δ *GRA6*, with small vesicles. Interestingly, the sole mutant which was capable of restoring short membranous tubules mixed with sparse small vesicles and aggregated

material, was NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$ (Fig. 5). These results thus showed that despite their capability in driving GRA6 to the parasite posterior end and despite their association with PV membranes, NT- $\alpha1\alpha2$, NT- $\alpha3$ -CT and Tr $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT fail to induce stable tubular membranes within the PV. Together, these results thus demonstrate directly, using the Δ GRA2-HXGPRT PV as a natural complementation system, that 1) $\alpha3$ alone is sufficient to induce membranous vesicles when it is associated with the N- and C-terminus of GRA2 (mutant NT- $\alpha3$ -CT); 2) presence of the three amphipathic α -helices compensate lack of the N-terminal domain to induce membranous vesicles (mutant Tr $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT) and 3) association of the N-terminal domain with the amphipathic α -helices is sufficient to induce stable membranous tubules (mutant NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$).

3.8. Amongst the GRA2 deletion mutants, only NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$ partially restores parasite organization within the PV.

Using a SEM technique which allows observation of the PV content in three dimensions, Muniz-Hernandez et al. (personal communication) have recently demonstrated that loss of the MNN consecutively to targeted deletion of the GRA2 gene, leads to parasite disorganization within PV containing 8 or 16 parasites, which is in favor of a structural role for the MNN within the PV. Hep-2 cells were infected with NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$, observed 24 h post-infection by SEM and compared to cells infected with either Δ HXGPRT (normal looking PV containing parasites arranged in a typical rosette around the central residual body) or Δ GRA2-HXGPRT (abnormal looking PV deprived in MNN and containing parasites loosely connected to each other and to a residual body, which is often reduced in size). Most of the PV of the NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$ mutant showed a normal phenotype (Fig. 6A), suggesting that the N-terminal domain of GRA2 associated to the amphipathic helical region is sufficient to restore parasite organization within the PV.

Since the SEM technique is not appropriate to observe the morphology of numerous PV, we hypothesized that loss of the MNN consecutively to GRA2 truncations would result in drastically altered PV morphology at later stages of parasite development. Indeed, when HFF cells were inoculated with a low dose of parasites to avoid multiple infections, fixed just before parasite egress, permeabilized with saponin, immunolabelled with the mAb TG17-113 directed against the PV membrane marker GRA5 (Lecordier et al., 1999) and examined both by phase contrast and immunofluorescence, two different phenotypes were observed. At this late stage of parasite development, the vacuoles of wild-type parasites are globular structures containing tightly packed parasites. We will refer to this normal phenotype as "globular PV". In contrast, most of the vacuoles of GRA2 mutants were irregular in shape; they often spread out into the host cell cytoplasm and contained parasites loosely connected to each other. We will refer to this phenotype as the "irregular PV" (Fig. 6B). More than 87% of the PV from the wild-type RH or the GRA2-HA9 mutant were globular (87.2 + 4.8% in RH and 87.2 + 4.6% in GRA2-HA9). This resulted in a calculated ratio of globular- to irregular PV equal to 6.81 in RH and 7.20 in GRA2-HA9, respectively (Fig. 6C). In contrast, the most frequent phenotype observed in cells infected with Δ GRA2-HXGPRT consisted in irregular PV (58.4 + 5.9%), with a ratio of globular- to irregular PV equal to 0.71 only (Fig. 6C). Mutants NT- $\alpha1\alpha2$, NT- $\alpha1\alpha2\alpha3$, NT- $\alpha3$ -CT, NT-CT, $\alpha1\alpha2$, $\alpha1\alpha2$ -CT, Tr $\alpha1\alpha2\alpha3$ -CT and $\alpha3$ -CT led to mixed phenotypes (Fig. 6B) but

always with a higher percentage of irregular PV and a calculated ratio of globular- to irregular PV comprised between 1.13 and 3.62 (Fig. 6C). In agreement with the observations made by TEM and by SEM (Fig. 5 and 6A), the mutant which restored the highest percentage of globular PV was NT- α 1 α 2 α 3 (78.4 + 3.8%), with a calculated ratio of globular- to irregular PV equal to 3.62. Using a Wilcox test, all pair wise comparisons between the ratio of NT- α 1 α 2 α 3 and that of all the other complementation mutants showed a difference at a significance below P= 0.01. None of the other comparisons was significant (Fig. 6C).

Discussion

Numerous studies have recently shown that proteins containing amphipathic α -helices play crucial roles in the initial membrane curvature leading to the formation of membranous tubules (for a review: Cornell and Taneva, 2006). Previous analysis of the phenotype of a *Toxoplasma* Δ GRA2 knock-out mutant had shown that the dense granule protein GRA2, which is normally stably associated with the vacuolar MNN (Sibley et al., 1995) and which was originally predicted to contain two amphipathic α -helices (Mercier et al., 1993), is a key protein for the formation of the intravacuolar MNN (Mercier et al., 2002) and for the organized arrangement of parasites within the PV (Muniz-Hernandez-Hernandez et al., personal communication).

The increasing number of prediction methods available online led us to re-analyze the secondary structure of the GRA2 protein (185 amino acids): except for a central α -helical region and an N-terminal putative signal peptide, GRA2 was predicted to be in a large part, under a coiled conformation (Fig.1A). Three α -helices with slightly different boundaries depending on the used method were predicted within the central region of GRA2 (Fig. 1A): we delimited these α -helices between amino acid 70 and 92 (α 1); 95 and 110 (α 2); and 119 and 139 (α 3), respectively. Although Gly residues in an hydrophobic environment are usually considered as hydrophobic residues, the C-terminal boundary of α 3 could have been terminated at Ala 131 instead of at Lys 139 (Fig. 1A). Experimental results obtained with a stable *Toxoplasma* mutant expressing NT- α 1 α 2 α 3 (Ala 131) (data not shown) were similar to those obtained with NT- α 1 α 2 α 3 (Lys 139) (this study), although the ratio globular- to irregular PV (Fig. 6C) was slightly decreased. Inclusion of Pro 70 as the first amino acid of α 1 could also be questioned. Indeed, presence of Pro residues in α -helices creates a kink in the peptide backbone. Therefore, Pro residues are usually not found in α -helices, except within amphipathic α -helices of antimicrobial peptides (Kobayashi et al., 2004) or of signal peptides (Chupin et al., 1995), where they are thought to promote translocation of the peptide/protein across lipid bilayer. However, there are proteins which contain amphipathic α -helices that commence by a Pro residue. However, there are proteins which contain amphipathic α -helices starting with a Pro residue (Segrest et al., 1992). Therefore, we can not exclude that Pro 70 would be the first amino acid of α 1.

The amphipathic α -helices which mediate membrane interaction, show large variation in length (14 to 52 amino acids) and in hydrophobicity of their non polar face (1.65 to 9.48 kcal/mol) (for a review: Cornell and Taneva, 2006). The three amphipathic α -helices predicted in GRA2 are in this range. However, most of the amphipathic motifs described so far in amphitropic proteins are localized either in N- or in C-terminus of the proteins (Cornell and Taneva, 2006). GRA2 is thus peculiar in the sense that its amphipathic α -helices are localized in the central part of the protein sequence. The net positive charge of each GRA2 amphipathic α -helix would ensure binding to negatively charged phospholipids.

Our study used methods that were devised to predict α -helical transmembrane segments. Yet, GRA2 was unambiguously shown to be an amphitropic protein within the PV (Sibley et al., 1995). These programs would thus not apply perfectly to GRA2. During the course of this study, a new prediction method, specifically designed to predict amphipathic α -helices which are inserted at the membrane interface, parallel to the membrane plane, the so called In-Plane Membrane Anchors (IPM anchors) (Sapay et al., 2006), was made available. Using this Amphipaseek program, GRA2 was predicted to contain an IMP anchor of 43 amino acids (Pro 70 to Phe 112, Fig. 1A). This amphipathic α -helix would present a neat segregation of negatively- from positively charged residues, with a noticeable clustering of negatively charged amino acids at one polar/non polar interface (Fig. 1C). The calculated peak hydrophobic moment $\langle \mu H \rangle$ and mean hydrophobicity $\langle H \rangle$ of this amphipathic α -helix (Table 1) led to predict that it would be surface active. None of our results contradicts the possibility of a large amphipathic α -helix [70-112] (Fig. 1C) in GRA2 instead of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ helices predicted by standard prediction methods of secondary structure (Fig. 1A and B).

Most of the studies investigating induction of curvature and formation of tubular membranes were performed in vitro using liposomes generated with defined lipid composition and recombinant proteins or synthetic peptides. Although very informative, these tubulation assays often use very high protein concentrations ($\sim 1/1$ protein/lipid weight ratios), which might exaggerate the observed phenotype. The originality of our work is that we have used an alternative approach, using the Δ GRA2 knock-out vacuole as a natural complementation system to investigate systematically the functional domains of GRA2. Our results are not in favour of the amphipathic α -helical region of GRA2 stopping at Phe 112. Indeed, we showed unambiguously in the present study that $\alpha 3$ alone (mutant NT- $\alpha 3$ -CT) is sufficient to ensure membrane association of the protein (Fig. 4) and to restore formation of membrane vesicles within the PV (Fig. 5). Having recently demonstrated that both native and recombinant GRA2 induce tubulation of liposomes in vitro (Bittame et al., data not shown), we are confident that the phenotypes observed for the NT- $\alpha 3$ -CT mutant result from presence of $\alpha 3$ rather than from any potential tubulogenic GRA2 partner. Interestingly, in the natural system of the *Toxoplasma* PV, the $\alpha 1\alpha 2$ peptide does not induce membrane tubulation. It will be interesting to compare this result with the effect of the corresponding synthetic peptide on liposomes. Furthermore, we showed directly that integrity of the entire helical region is necessary for formation of intravacuolar membranous tubules and consequently, to maintain parasites close to each other within the PV. Indeed, amongst the 8 GRA2 mutants analyzed in this study, only one, NT- $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$, is capable of restoring partially 1) membranous tubules and 2) ordered arrangement of parasites within PV

containing 8-16 parasites. Furthermore, deletion of $\alpha 1\alpha 2$ (mutant NT- $\alpha 3$ -CT, this study) or of $\alpha 1$ (mutant " $\Delta\alpha 1$ ", which could now be dubbed NT- $\alpha 2\alpha 3$ -CT, Fig. 2A and Table 2, [Mercier et al., 2002](#)), is sufficient to prevent formation of the intravacuolar MNN.

The general idea is that amphipathic α -helical motifs are used in amphitropic proteins to respond to changes in physical properties of their environment, such as membrane negative charge density, surface voids, or negative membrane curvature ([Cornell and Taneva, 2006](#)). Amongst the proteins containing amphipathic α -helices and involved in membrane curvature, three categories, which act together, are now described: 1) proteins acting through a scaffold mechanism, which impose the curvature to the membrane through their rather rigid "banana shape" ([Dawson et al., 2006](#); [Gallop and McMahon, 2005](#)), 2) those inducing a spontaneous local membrane curvature and which act through insertion of an amphipathic α -helix into the superior leaflet of the membrane bilayer ([Horvath et al., 2007](#); [Itoh and DeCamilli, 2006](#)), and 3) membrane "sensors", which constitute unstructured proteins in solution but reveal binding affinity for the membrane when placed in contact to a membrane ([Drin et al., 2007](#), [Fischer et al., 2007](#)). It will be interesting to investigate if GRA2 fits into one of these categories of tubulogenic proteins, using membrane models. We are also in need of structural data to ascertain the secondary structure of GRA2 and to better understand the arrangement of GRA2 α -helices in membrane bilayers. Deciphering the mechanism by which GRA2 induces formation of membrane nanotubes will provide invaluable information to better understand the formation of the *Toxoplasma* PV, this crucial host-parasite interface compartment.

Acknowledgements

The help of L.D. Sibley (Washington University School of Medicine, Saint Louis, MO), who provided most of the antibodies used in this study, was particularly appreciated. The authors acknowledge D. Soldati (Faculty of Medicine-University of Geneva, Switzerland), M. Lebrun (CNRS UMR 5535–Université de Montpellier II, France), D.S. Roos (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) and M.A. Hakimi (CNRS UMR5163-Université Joseph Fourier, Grenoble I, France) for sharing reagents; D.K.Z. Adjogble (Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany) for providing access to DNASTAR, and H. Geiselman (CNRS UMR5163-Université Joseph Fourier, Grenoble I, France) for his help with the statistical comparison. Transmission Electron Microscopy was performed with the help of V. Richard (SCME, University of Montpellier 2). L. Travier was financially supported by a doctoral fellowship from Région Rhône-Alpes and a Temporary Position of Teaching and research (ATER) from the Faculty of Pharmacy, Grenoble. Research in our laboratories was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (MFCD and J.F.D), CINVSTAV-Mexico (RM and SG) and the Emergence Program N°03 014952 01 from Région Rhône-Alpes (CM).

References

- Adjogble, K. D. Z., Mercier, C., Dubremetz, J. F., Hucke, C., MacKenzie, C. R., Cesbron-Delauw, M. F., Däubener, W. 2004. GRA9, a new *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Intern. J. Parasitol.* 34, 1255-1264.
- Cesbron-Delauw, M. F., Boutillon, C., Mercier, C., Fourmaux, M.P., Murray, A., Miquey, F., Tartar, A., Capron, A. 1992. Amino acid sequence requirements for the epitope recognized by a monoclonal antibody reacting with the secreted antigen GP28.5 of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Immunol.* 29, 1375-1382.
- Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M. F. and Capron, A. 1990. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 71, 114-124.
- Charron, A. J. and Sibley, L. D. 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 115, 3049-3059.
- Charron, A. J., Sibley, L. D. 2004. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic.* 5, 855-867.
- 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, 463-472.
- Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C., Joiner, K. A. 2006. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell.* 125, 261-274.
- Cornell, RB, Taneva SG. 2006. Amphipathic helices as mediators of the membrane interaction of amphitropic proteins, and as modulators of bilayer physical properties. *Curr Protein Pept Sci.* 7, 539-552.
- Chupin V, Killian JA, Breg J, de Jongh HH, Boelens R, Kaptein R, de Kruijff B. 1995. PhoE signal peptide inserts into micelles as a dynamic helix-break-helix structure, which is modulated by the environment. A two-dimensional 1H NMR study. *Biochemistry.* 34, 11617-11624
- Dawson JC, Legg JA, Machesky LM. 2006. Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol.* 16, 493-498.
- Dobrowolski, J. M., Sibley, L.D. 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84, 933-939.
- Donald, R. G., Carter, D., Ullman, B., Roos, D. S. 1996. Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J Biol. Chem.* 271, 14010-14019.
- Drin G, Casella JF, Gautier R, Boehmer T, Schwartz TU, Antonny B. 2007. A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol.* 14, 138-146.
- Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., Joiner, K. A. 1993. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol. Res.* 75, 402-408.

- Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC. 1982. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*. 299, 371-374
- Farsad, K. and de Camilli, P. 2003. Mechanisms of membrane deformation. *Cur. Op. Cell Biol.* 15, 372-381.
- Fischer T, Lu L, Haigler HT, Langen R. 2007. Annexin B12 is a sensor of membrane curvature and undergoes major curvature-dependent structural changes. *J Biol Chem.* 282, 9996-10004.
- Garnier J, Osguthorne DJ and Robson B. 1978. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120, 97-120.
- Håkansson, S., Charron, A. J., Sibley, L. D. 2001. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* 20, 3132-3144.
- Horvath CA, Vanden Broeck D, Boulet GA, Bogers J, De Wolf MJ. 2007. Epsin: Inducing membrane curvature. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 Jan 17; [Epub ahead of print]
- Itoh T, De Camilli P. 2006. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta.* 1761, 897-912.
- Karsten, V., Qi, H., Beckers, C. J., Reddy, A., Dubremetz, J. F., Webster, P., Joiner, K. A. 1998. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J. Cell. Biol.* 141, 1323-1333.
- Kobayashi S, Chikushi A, Tougu S, Imura Y, Nishida M, Yano Y, Matsuzaki K. 2004. Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry.* 43, 15610-15616.
- Labruyère, 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 *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102, 311-324.
- Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L. D., Cesbron-Delauw, M. F. 1999. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell.* 10, 1277-1287.
- Lee, M.C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., Schekman, R. 2005. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COP II vesicle. *Cell.* 122, 605-617.
- Lemgruber L, De Souza W, Vommaro RC. 2007. Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. *Micron.* 2007 Jan 20; [Epub ahead of print]
- McLaughlin S, Murray D. 2005. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature.* 438, 605-611
- Magno, C. R., Lemgruber, L., Vommaro, R. C., De Souza, W., Attias, M. 2005. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Tech.* 67, 45-52.
- Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Faure J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F, Gruenberg J. 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science.* 303, 531-534

- Mattila PK, Pykalainen A, Saarikangas J, Paavilainen VO, Vihinen H, Jokitalo E, Lappalainen 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, 953-964.
- McMahon HT, Gallop JL. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature.* 438, 590-596
- Mercier, C., Lecordier, L., Darcy, F., Deslée, D., Murray, A., Tourvieille, B., Maes, P., Capron, A., Cesbron-Delauw, M. F. 1993. Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2), associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 71-82.
- 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, 2171-2180.
- Mercier, C., Howe, D.K., Mordue, D.G., Lingnau, M., Sibley, L.D. 1998b. Targeted disruption of the *GRA2* locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect. Immun.* 66, 4176-4182.
- 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, 2397-2409.
- Mercier, C., Adjogble, K. D. Z., Däubener, W., Cesbron-Delauw, M. F. 2005. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all Apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* 35, 1611-1620.
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M.F., Ferguson, D.J.P. 2007. Dense granules of the infectious stages of *Toxoplasma gondii*: Their central role in the host/parasite relationship. In D. Soldati and J. Ajioka, (Eds), *Toxoplasma: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Bioscience p 475-492.
- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M., Sibley, L. D. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* 190, 1783-1792.
- Phoenix DA, Harris F, Daman OA, Wallace J. 2002. The prediction of amphiphilic alpha-helices. *Curr Protein Pept Sci.* 3, 201-221.
- 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, 747-749.
- Roos DS. 1993 Primary structure of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 268, 6269-6280
- Roos, D.S., Donald, R.G., Morissette, N.S., Moulton, A.L. 1994. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Meth. Cell. Biol.* 45, 27-63.
- 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, 509-513.
- Schiffer M, Edmundson AB. 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys J.* 7, 121-135.

- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. 1992. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res.* 33, 141-166.
- Sibley, L.D., Niesman, I.R., Parmley, S.F., Cesbron-Delauw, M.F. 1995. Regulated secretion of multilamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 108, 1669-1677.
- Sibley, L. D., Pfefferkorn, E. R., Boothroyd, J. C. 1991. Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today.* 7, 327-328.
- Sharadadevi A., Sivakamasundari C. and Nagaraj. R. 2005. Amphipathic alpha-helices in proteins: results from analysis of protein structures. *Proteins.* 59, 791-801.
- Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. 2007. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology.* 17:1R-13R.
- Zinecker, C.F., Striepen, B., Tomavo, S., Dubremetz, J.F., Schwarz, R.T. 1998. The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. *Mol. Biochem. Parasitol.* 97, 241-246.
- Zimmerberg J, Kozlov MM. 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 9-19.

Figure legends

Fig. 1. Prediction of the GRA2 secondary structure. (A) Ten methods of protein secondary structure prediction (Porter, Jpred, Nnpredict, Prof, Psipred, Sopma, Predict protein, GOR, HNN and Amphipaseek respectively) were used to analyze the GRA2 amino acid sequence. Results were presented using the following code: C, coil; H, helical; E: extended; T, turn; A, amphipathic; (-), no prediction. The limits of the signal peptide and of the amphipathic α -helices α 1, α 2 and α 3 retained for this study are shown above the amino acid sequence. A schematic representation of the GRA2 sequence is presented below the alignments. Vertically striped box: signal peptide (SP); white box: N-terminal hydrophilic region (NT); grey box: C-terminal hydrophilic region (CT); black boxes: amphipathic α -helices α 1, α 2 and α 3, respectively. (B) Schematic representation of the GRA2 putative amphipathic α -helices α 1, α 2 and α 3. Amino acids 70-92, 95-110 and 119-139 are displayed as helical wheels, with the diagonal black line highlighting the repartition of charged versus hydrophobic residues. Grey circles: polar residues (S, T, N, Q, Y, W); white circles: charged residues (D, E, H, R, K); black circles: non polar and hydrophobic residues (A, L, V, I, M, P, F, C, G). (C) Schematic representation of the GRA2 putative amphipathic α -helix (70-112) predicted from the Amphipaseek program. Hydrophobic amino acids (A, L, V, I, M, P, F, C, G) are squared; positively charged amino acids (H, R, K) are in bold and italics; negatively charged amino acids (D, E) are underlined. The diagonal black line highlights the repartition of charged versus hydrophobic residues.

Fig. 2. Construction of *Toxoplasma* mutants expressing truncated GRA2. (A) Schematic representation of the GRA2 deletion constructs used to complement Δ GRA2-HXGPRT. The constructs deleted either the N- (white box, NT) or the C-terminal hydrophilic region (grey box, CT) of GRA2 and maintained or deleted the amphipathic α -helices (black boxes α 1, α 2 and α 3, respectively). Each construct contained the signal peptide (SP; vertically striped box) at the N-terminal end of GRA2. All the constructs were in frame with a C-terminal HA9 epitope tag (star, HA9). Numbers below GRA2-HA9 indicate the putative limits of each domain. Thick black lines show the stretches of GRA2 coding sequence expressed in the mutant while dotted lines indicate the truncations. NT- α 2 α 3-CT* corresponds to the " $\Delta\alpha$ 1" construct reported in [Mercier et al. \(2002\)](#). (B) Immunoblot analysis of lysates of *Toxoplasma* mutant parasites expressing truncated GRA2 proteins. Membranes were incubated with rabbit polyclonal serum to HA9 (rb α HA9), rabbit polyclonal serum to GRA2 (rb α GRA2) or the monoclonal antibody TG17-179 directed against the C-terminus of GRA2 (mAb α GRA2). As an internal control of the quantity of proteins loaded in each lane, the membranes were probed with rabbit polyclonal serum to *Toxoplasma* actin (rb α actin). + indicates the clones for which the quantity of proteins was increased by five times. (C) Triton-X114 partitioning of extracellular parasites. A: aqueous phase; D: detergent phase; I: insoluble material. Controls included both soluble GRA1 and plasma membrane associated SAG1, which partitioned exclusively into the aqueous phase or which remained in the detergent phase, respectively.

Fig. 3. Stably expressed GRA2 N-terminal domain associated to at least one amphipathic α -helix is sufficient to drive posterior accumulation of GRA6. (A) Immunofluorescence staining of HFF cells infected for 20 h. Both the host cell membrane and the PV membrane were permeabilized with 0.002% saponin. Proteins were detected using both the rabbit polyclonal serum to HA9 and the mAb 6B5 anti-GRA6. (B) Immunofluorescence localization of both truncated GRA2 (revealed by the rabbit serum to HA) and endogenous GRA6 (revealed by the mAb α GRA6) within the PV 15 min post-invasion. White arrowheads indicate the dots of fluorescence detected at the parasite posterior end.

Fig. 4. Membrane association of truncated GRA2 proteins. (A) Vacuolar proteins were fractionated between a soluble (HSS) and a membrane-associated form (HSP). Membranes were probed with the rabbit polyclonal serum to HA9 (HA tagged proteins) or the mAb anti-GRA2 (RH control). Controls included both SAG1 and GRA1, which were detected as expected, in the membranous pellet and in the soluble fraction of the vacuole, respectively. (B) The HSP fraction of each mutant was treated with several agents destabilizing membrane proteins (0.5 M KCl, 0.1 M Carbonate pH11, 6 M urea or 1% NP-40) or with 50 mM Tris pH 8 as a control, and compared to the behavior of the GRA2-HA9 HSP fraction. Fractions were analyzed by immunoblot using the rabbit polyclonal serum to HA9, the mAb TG17-43 anti-GRA1 and the mAb TG17-054 anti-SAG1.

Fig. 5. Amongst the GRA2 deletion mutants, only NT- α 1 α 2 α 3 partially restores the MNN. Transmission electron micrographs illustrating the PV of Δ HXGPRT, Δ GRA2-HXGPRT, NT- α 1 α 2, NT- α 1 α 2 α 3, NT- α 3-

CT, $\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 1\alpha 2$ -CT and $\alpha 3$ -CT parasites grown in HFF cells and fixed 20 h post invasion. The PVM is indicated by arrowheads. Arrows point membranous tubules in $\Delta HXGPRT$ or in NT- $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$; aggregated material in $\Delta GRA2-HXGPRT$, NT- $\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 1\alpha 2$ -CT and $\alpha 3$ -CT; small vesicles in both NT- $\alpha 3$ -CT and Tr $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$ -CT. P: parasite. Bars: 1 μm .

Fig. 6. Stably expressed GRA2 N-terminal hydrophilic domain associated with the amphipathic α -helices 1 is sufficient to restore normal aspect of the PV. (A) Scanning electron micrographs illustrating the PV of NT- $\alpha 1\alpha 2\alpha 3$, as compared to that of $\Delta HXGPRT$ and $\Delta GRA2-HXGPRT$. Bars: 1 μm . (B) Phase contrast microscopy and immunofluorescence labeling of the PV membrane-associated marker GRA5 in HFF cells infected for 30 h with the GRA2 mutants, fixed, permeabilized with saponin and observed at the x63 magnification. Examples of both globular and irregular PV are shown. (C) Quantification of globular- (black rectangles) versus irregular PV (white rectangles) in HFF cells infected for 30 h with GRA2 deletion mutants. The mean + SD was calculated from 150 PV scanned on duplicated coverslips of each mutant, in duplicated experiments. Double headed arrows show that only in $\Delta GRA2-HXGPRT$, a majority of irregular PV was observed. The numbers placed above the rectangles indicate the ratio calculated from the percentage of globular to irregular PV. * indicates the sole complementation mutant for which the ratio globular to irregular PV is statistically significant ($P < 0.01$) in a pairwise Wilcoxon comparison test.

Legend of the supplementary data

Supl. data 1. Scanning electron micrographs illustrating the parasite face (right) and the upper face of infected cells recovered on the adhesive tapes (left). (A) RH wild-type parasite. (B) NT- $\alpha 1\alpha 2$ as an example of the mutant parasites constructed for this study. PV (right) and their replicas (left) are encircled. Bars: 10 μm .

Supl. data 2. Immunofluorescence staining of extracellular parasites permeabilized with triton-X100 and co-labeled with both the anti-HA (green channel) and the anti-GRA1 (red channel) antibodies.

Table 1: Comparison of the properties of the predicted GRA2 amphipathic α -helices

Helix	Number of amino acid residues	Positive charges	Negative charges	Net charge	Peak hydrophobic moment $\langle \mu_H \rangle_{\max}^a$	mean hydrophobicity $\langle H \rangle$ (kcal/mol) ^b	hydropathy of the non polar face (kcal/mol) ^c	mean hydrophobicity of the non polar face (kcal/mol) ^d
$\alpha 1$	23	5	2	+3	0,67	-0,22	9.89	0.82
$\alpha 2$	16	7	2	+5	0,41	-0,29	2.45	0.35
$\alpha 3$	21	5	1	+4	0,45	-0,02	5.12	0.46
A	43	12	4	+8	0.57	-0.20	15.07	0.68

a: helical hydrophobic moment using Eisenberg method, with a sliding window of 10 residues and an angle of rotation of 100 degrees. The reported value is the peak $\langle \mu_H \rangle_{\max}$ of the sequence.

b: hydropathy averaged over entire peptide, using Eisenberg consensus scale

c: sum of the Eisenberg hydropathy of the residues in the hydrophobic face.

d: Eisenberg hydropathy of the residues in the hydrophobic face + number of residues in the hydrophobic face.

Table 2: Major phenotypes of the GRA2 deletion mutants

Construct	Theo.	Extracellular parasites			Intracellular parasites					
	MW	MW	DG ³	Solubility	GRA2	GRA6	vac.	mhn	MNN ⁸	vac./
	(kDa) ¹	(kDa) ²		(Triton-X114) ⁴	dot ⁵	dot ⁵	signal ⁶	assoc. ⁷		irreg. ⁹
GRA2-HA9	17.5	35	+	I/D/A	+	+	+	+	+	+++
Δ GRA2-HXGPRT	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	NA	-	-
NT- α 1 α 2	10.3	18	+	D	+	+	+(faint)	+	-	+
NT- α 1 α 2 α 3	11.9	22	+	D/A	+	+	+	+	±	++
NT- α 2 α 3-CT ¹⁰	15.2	30	+	ND	-	-	+	ND	vesic.	ND
NT- α 3-CT	12.5	23	+	D/A	+	+	+	+	vesic.	+
NT-CT	10.4	23/35	+	A	-	-	+(faint)	-	ND	+
α 1 α 2	5.9	17	+	I/D	-	-	+	+	-	+
α 1 α 2-CT	11.6	25	+	D/A	+	-	+	+	-	+
α 1 α 2 α 3-CT ¹¹	13.1	25	+	I/D/A	+	+	+	+	vesic.	+
α 3-CT	7.8	25	±	A	+	-	+	-	-	+

1: Theoretical molecular weight of the mature protein;

2: Molecular weight (MW) of the major bands, as observed on western blot of figure 2B;

3: (+): dense granule localization verified by co-labeling with GRA1 (supplementary data);

4: solubility within the parasite, as determined by triton-X114 partition on figure 2C. (I): insoluble material; (D): detergent associated fraction; (A): aqueous fraction;

5: posterior dot, as determined by immunofluorescence on figure 3B;

6: vacuolar signal, as determined by immunofluorescence on figure 3A;

7: membrane association, as determined on figure 4A by cell fractionation of overnight infected cells;

8: restoration of intravacuolar membranous tubules (+), as determined on figure 5 by TEM; vesic.: vesicles instead of membranous tubules;

9: ratio between globular and irregular PV, as determined by phase contrast on figure 6; (+++: calculated ratio >5, +: calculated ratio comprised between 2 and 5; ±: calculated ratio comprised between 1 and 2; (-): calculated ratio <1);

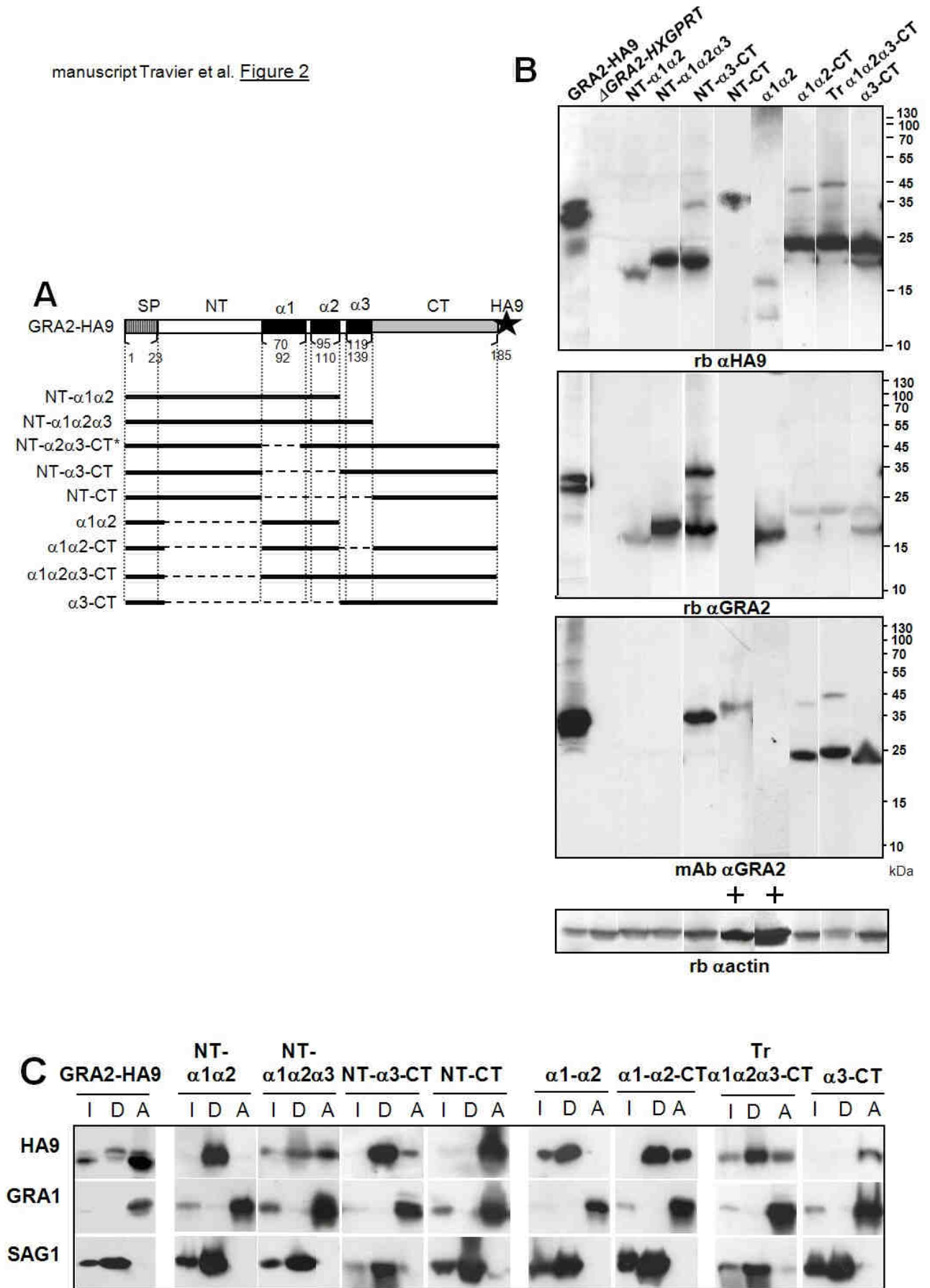
10: complementation of the Δ GRA2 mutant with the mutant $\Delta\alpha$ 1 (from [Mercier et al., 2002](#)), also named as NT- α 2 α 3-CT;

11: the construct α 1 α 2 α 3-CT failed to provide a stable phenotype. The phenotype reported in this study is thus that obtained after transient expression.

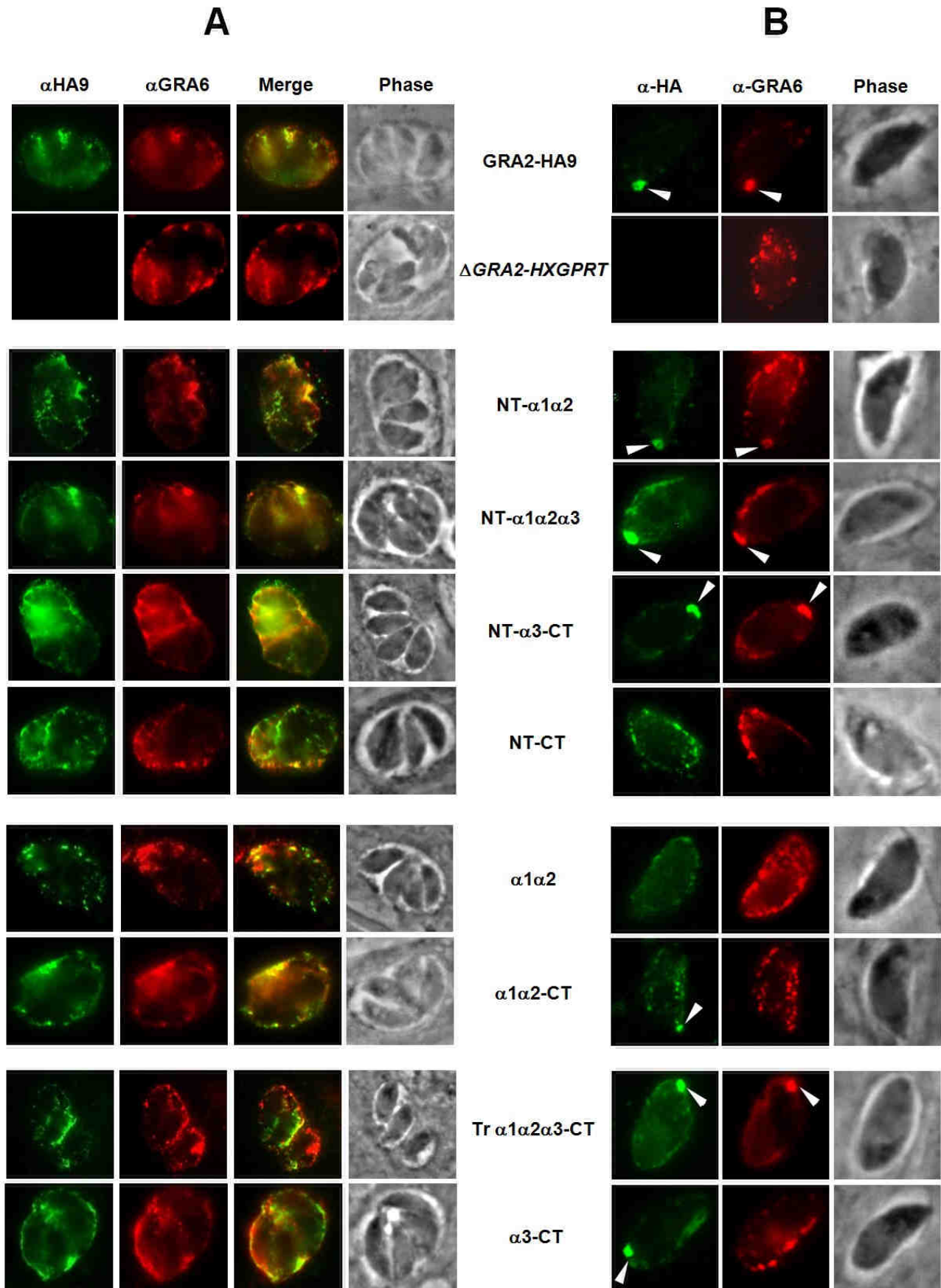
ND: Not Determined

NA: Does not apply

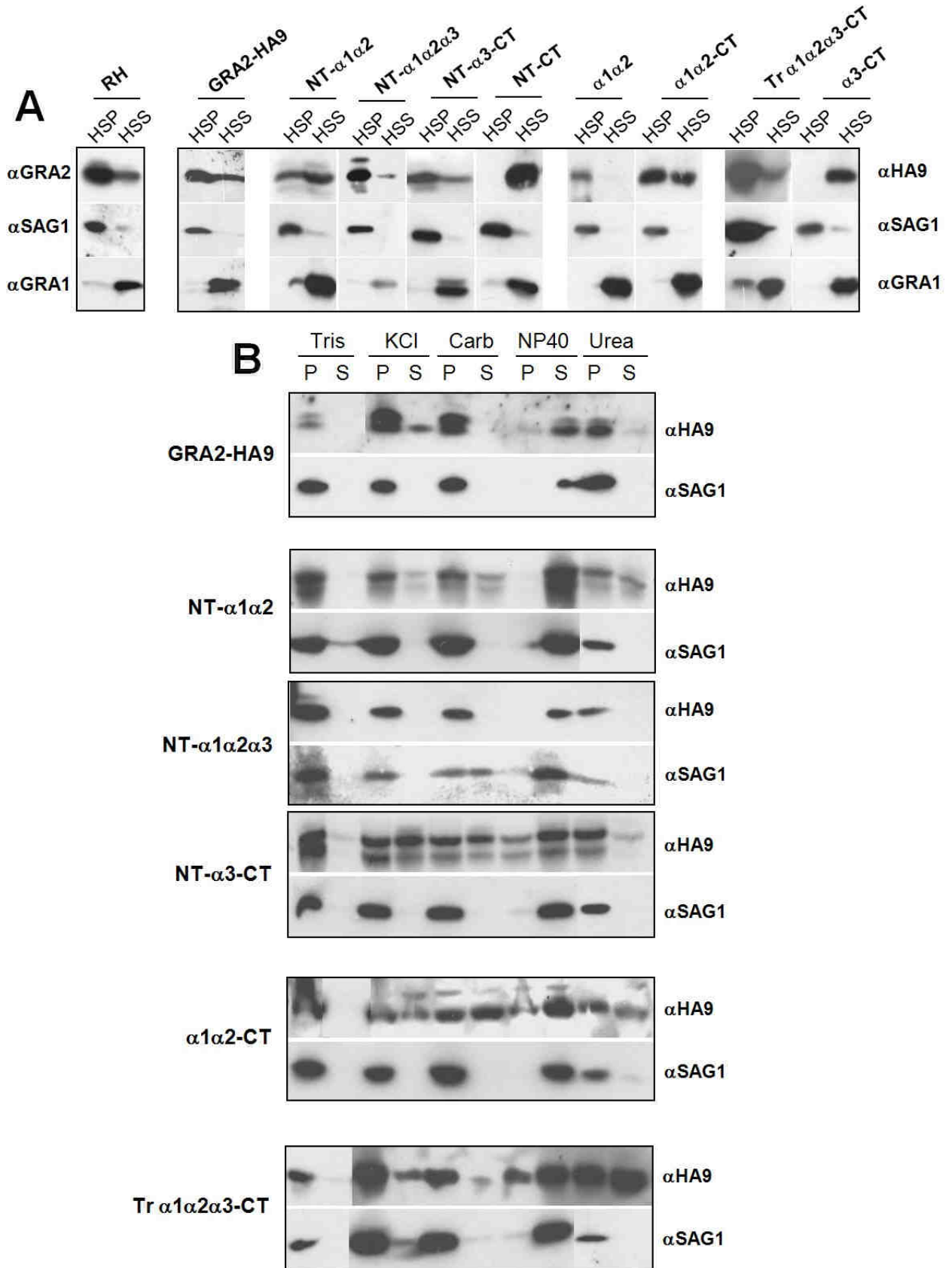
manuscript Travier et al. Figure 2



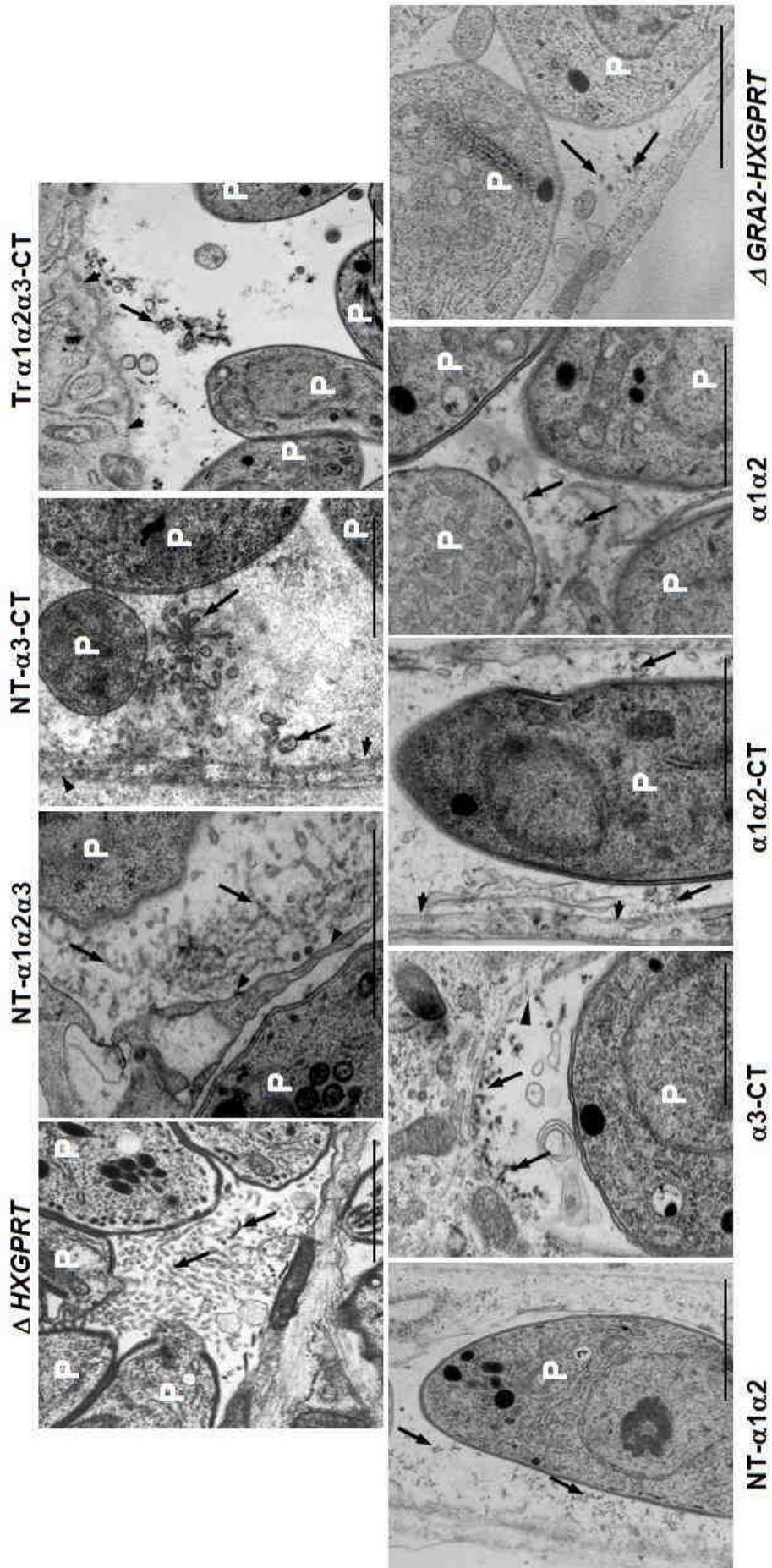
manuscript Travier et al. **Figure 3**



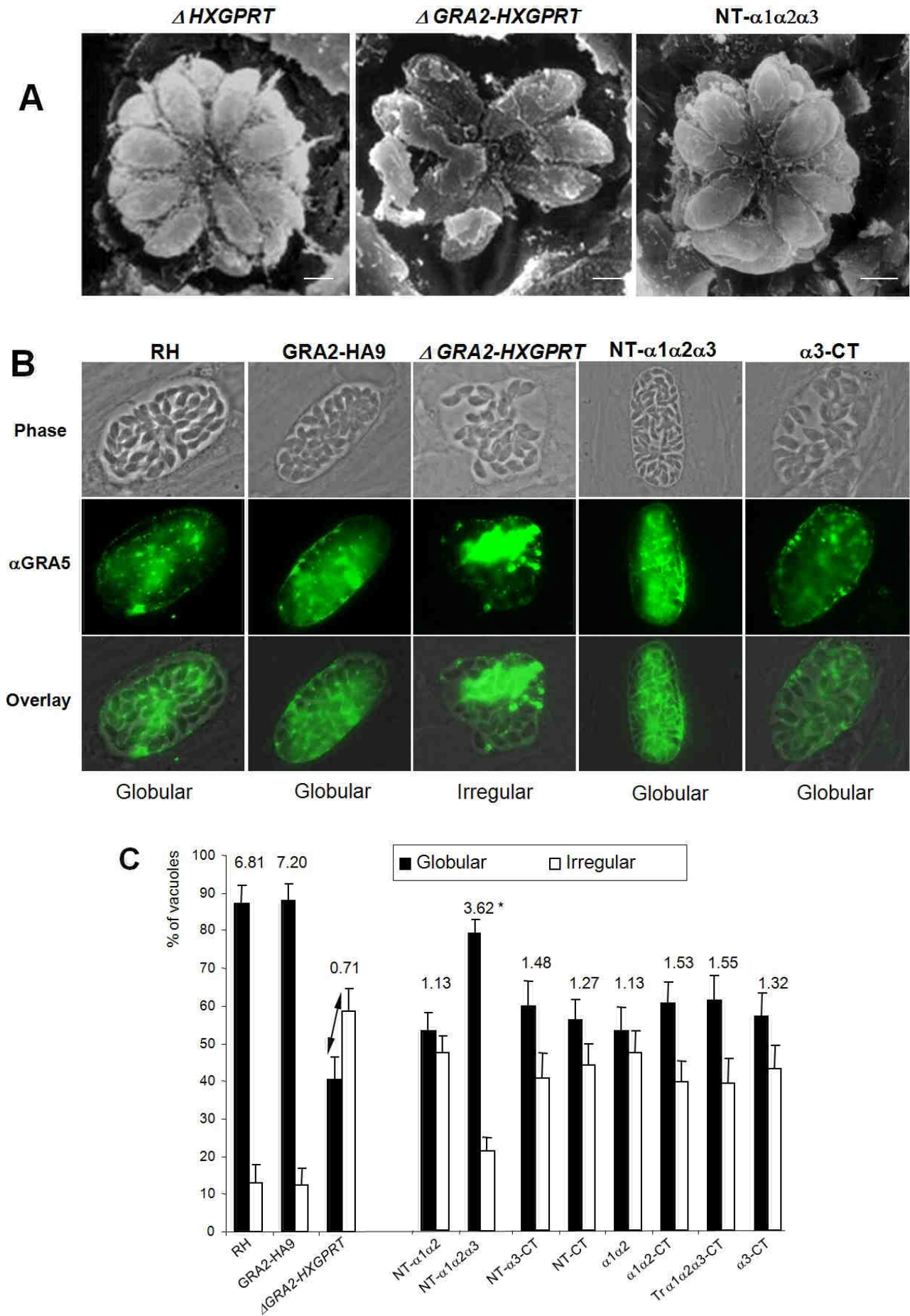
Manuscript Travier et al. **Figure 4**



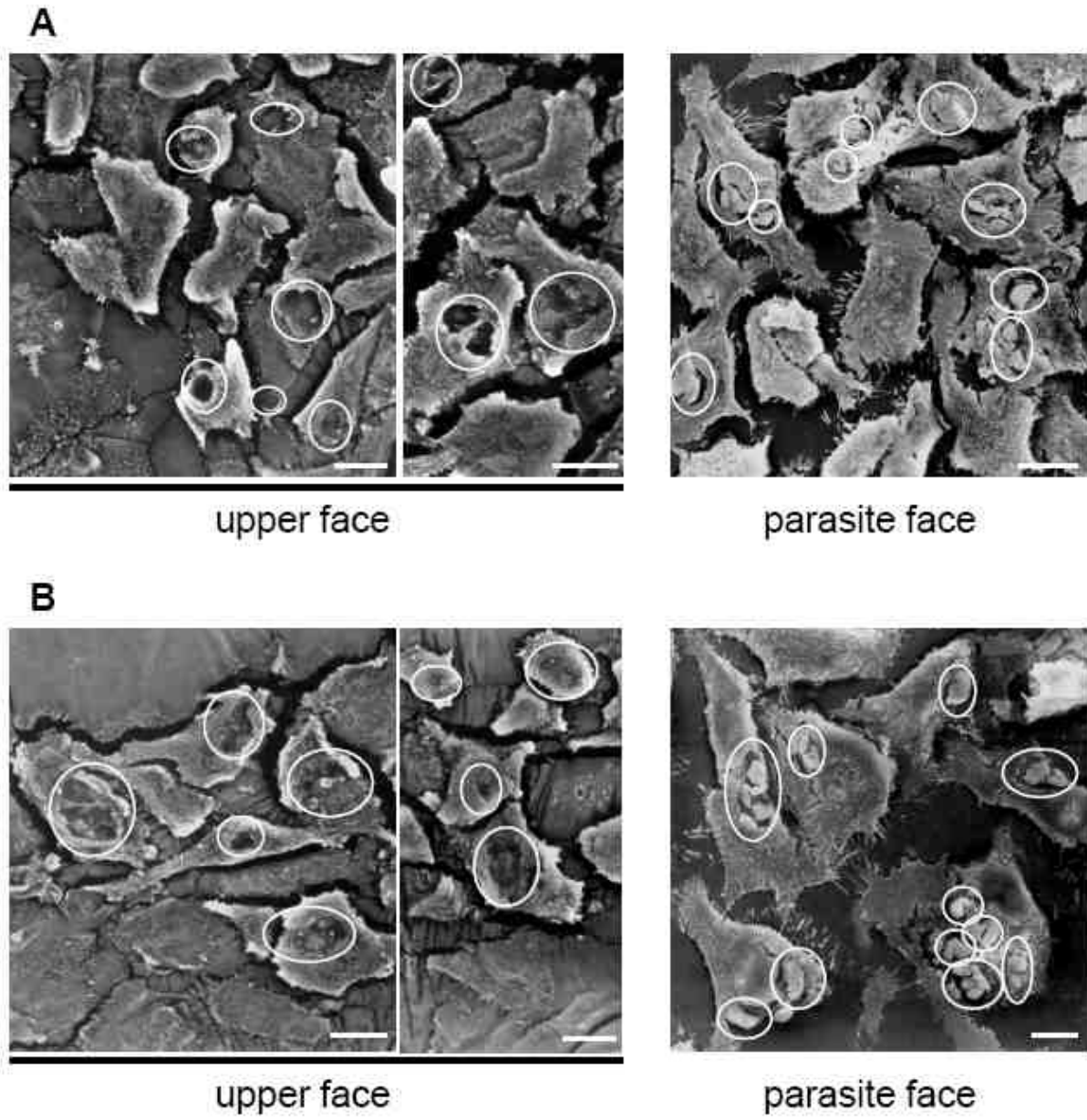
Manuscript Travier et al. Figure 5



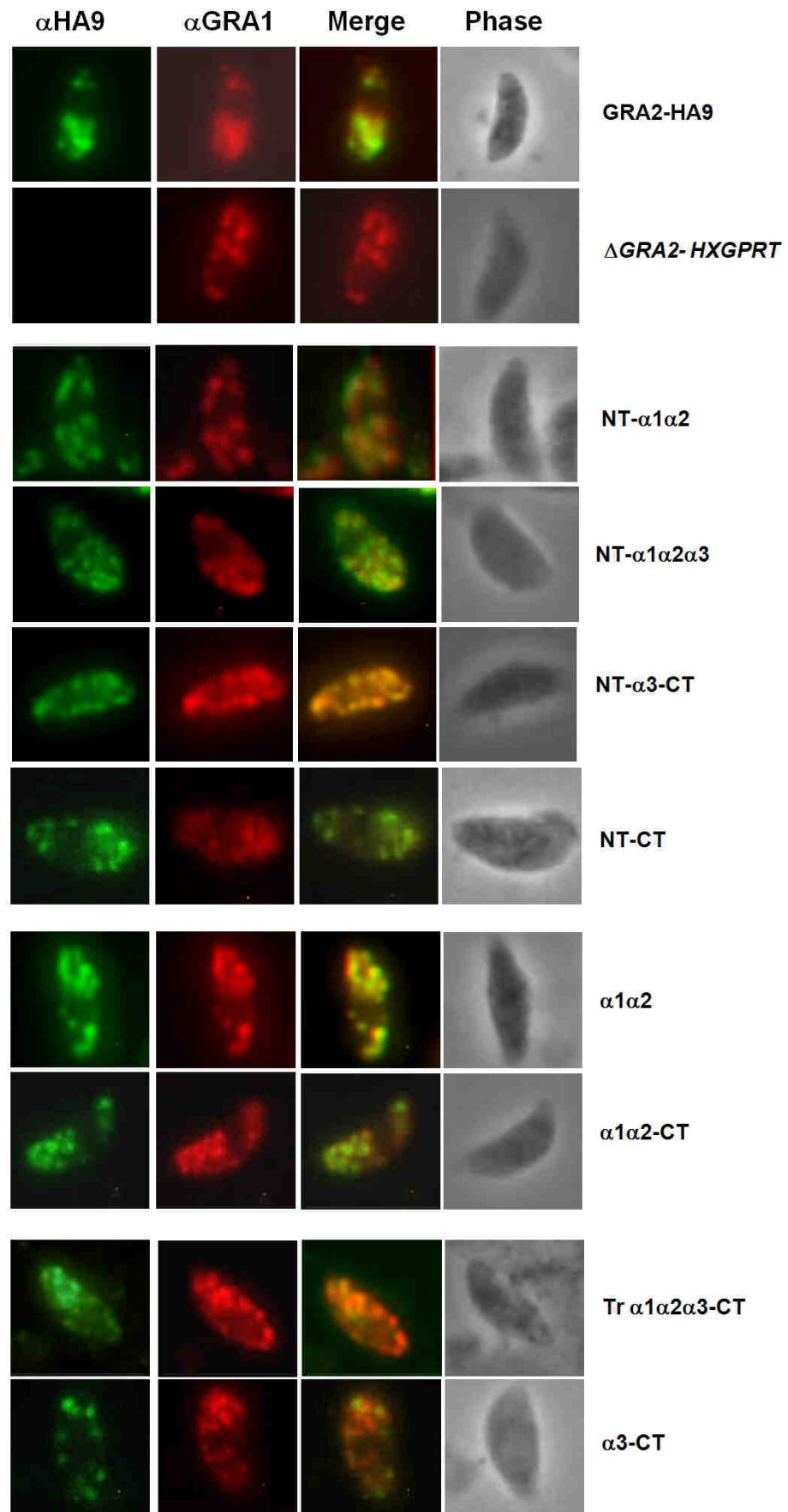
Manuscript Travier et al. **Figure 6**



Supplementary data 1



Supplementary data 2



2. Conclusion

Les résultats de l'article peuvent se résumer en trois points essentiels :

- 1) lorsqu'elle est associée aux domaines N- et C-Terminaux de la protéine, l'hélice alpha-amphipatique α_3 de GRA2 est, comme α_1 , suffisante, pour assurer le recrutement postérieur et la formation de vésicules qui vont former le réseau.
- 2) Par contre, l'association postérieure de GRA6 nécessite la présence de plus d'une hélice alpha-amphipatique et
- 3) la région hélicoïdale entière, associée à la partie N-Terminale, est indispensable pour la formation du RNM et l'organisation des parasites dans la vacuole.

La mesure de l'amphipatie par la projection de Schiffer-Edmundson ainsi que le calcul de l'hydrophobicité moyenne et des moments hydrophobes de chacune des trois hélices de GRA2 permettent de confirmer leur propriété amphipatique et suggèrent que α_1 et α_3 sont des hélices insérées en surface d'une bicouche lipidique tandis que α_2 reste globulaire. Cette prédiction est à moduler par les résultats obtenus avec le programme « Amphipaseek » élaboré pour prédire la présence d'éventuels « In plane Membrane Anchors » ou « IMP Anchor ». En effet, ces résultats suggèrent que les hélices α_1 et α_2 pourraient constituer une seule hélice de 43 acides aminés (acides aminés 70-112) formant une ancre IMP. Cette longue hélice serait alors insérée en surface d'une bicouche membranaire.

Ces résultats permettent de construire deux modèles d'insertion membranaire spontanée de GRA2 (**Figure 60**). Ces modèles ne prennent pas en compte la multimérisation potentielle de GRA2 dans les membranes du RNM. Ils illustrent l'insertion superficielle des hélices amphipatiques α_1 et α_3 ou $\alpha_1+\alpha_2$ et α_3 dans la partie supérieure du feuillet membranaire, ce qui perturberait la compaction des têtes polaires et entraînerait une déformation locale responsable de la courbure et de la formation des vésicules constitutives du RNM. Ces modèles sont donc basés sur ceux des protéines amphitropiques telles que l'epsine, l'endophiline ou l'amphiphysine qui utilisent leurs hélices alpha-amphipatiques en réponse à une charge négative au niveau de la membrane ou à un manque lipidique à un endroit de la bicouche (Ford *et al.*, 2002 ; Horvath *et al.*, 2007 ; Itoh and DeCamilli, 2006).

L'insertion des hélices alpha-amphipatiques de GRA2 α_1 et α_3 ou « $\alpha_1+\alpha_2$ » et α_3 , selon les prédictions, à la surface du feuillet membranaire serait donc responsable de la formation des vésicules à partir desquelles va se déployer les tubules du RNM. GRA2 est donc une protéine singulière car, contrairement aux autres protéines génératrices de courbure membranaire spontanée, GRA2 est une petite protéine (185 acides aminés seulement) qui ne présente aucune homologie avec des domaines impliqués dans les phénomènes de courbure de membrane (domaine ENTH de l'epsine par exemple, Horvath *et al.*, 2007). De plus, alors que les protéines décrites ne contiennent qu'une hélice alpha-amphipatique localisée dans leur région N- ou C-Terminale, GRA2 contient deux ou trois hélices alpha-amphipatiques centrales.

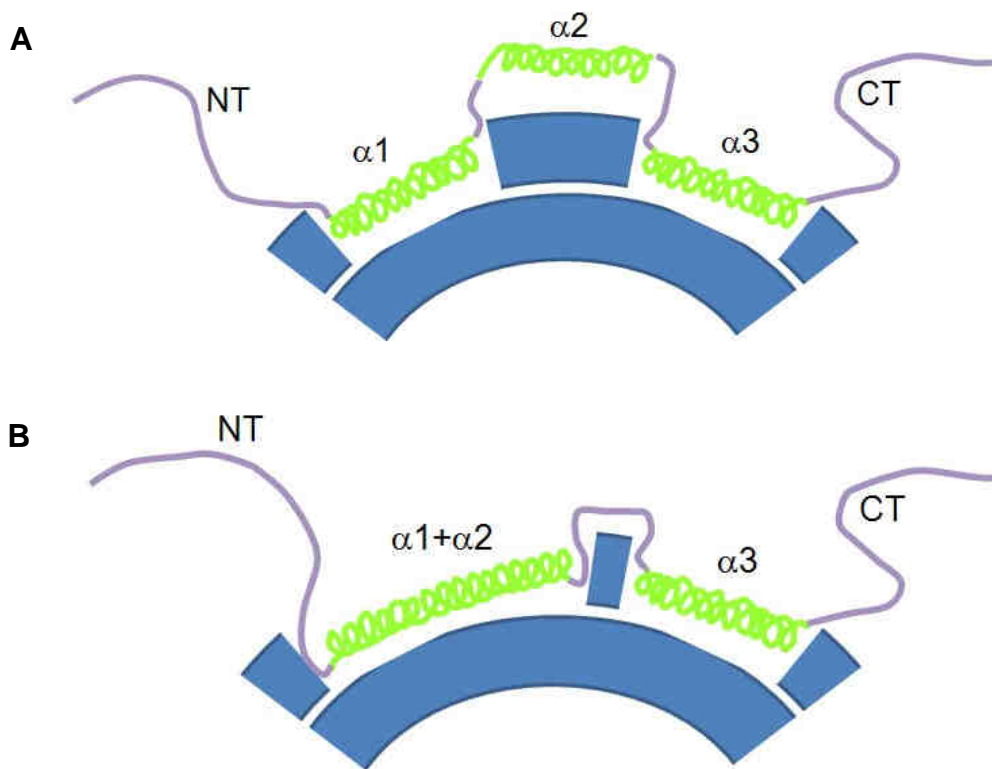


Figure 60 : Modèles d'insertion membranaire de GRA2 au niveau des vésicules du RNM. (A) Insertion des hélices alpha-amphipatiques $\alpha 1$ (70-92) et $\alpha 3$ (119-139) de GRA2 en surface de la bicouche lipidique tandis que $\alpha 2$ (95-110) reste globulaire. **(B)** Insertion des deux hélices de GRA2 « $\alpha 1+\alpha 2$ » (70-112) et $\alpha 3$ (119-139) à la surface membranaire.

3. Résultats complémentaires : identification de partenaires lipidiques spécifiques

Les modèles d'insertion membranaire de GRA2 présentés ci-dessus suggèrent que GRA2, sur le modèle de l'epsine, pourrait induire une courbure locale de la membrane *via* ses hélices alpha-amphipatiques. Ces hélices possèdent une charge nette positive (**Table I de l'article**). Il est donc envisageable que, comme celle de l'epsine, l'association membranaire de GRA2 nécessite au préalable, la reconnaissance de certains phospholipides membranaires chargés négativement tels que le PI(4,5)P₂. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de "lipid overlays" ont été menées afin d'identifier des partenaires lipidiques spécifiques des protéines GRA.

a) Interactions GRA2-lipides

Des expériences de « lipid overlays » ont été réalisées avec la protéine GRA2 i) exprimée sous forme recombinante en système bactérien, en fusion avec la GST (Gluthation S-Transférase), ii) issue d'un extrait

parasitaire soluble et iii) exprimée en fusion avec l'étiquette HA-FLAG et purifiée par chromatographie d'affinité sur résine FLAG à partir d'un extrait parasitaire. La liaison aux lipides des protéines recombinantes GRA1-GST et GST ainsi que celle de GRA1 présente dans le lysat parasitaire, a été testée afin de contrôler la spécificité des interactions (**Figure 61**).

Comme attendu, la protéine hydrophile GRA1, sous forme recombinante ou native dans le lysat, ne lie aucun lipide. De même, 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 montrent que GRA2 possède une affinité pour le PI(4,5)P₂, sous les trois formes testées (recombinante, native et parasitaire fusionnée à l'étiquette HA-FLAG). Par ailleurs, une réactivité de GRA2-HA-FLAG, purifiée à partir d'un lysat parasitaire, a été détectée vis à vis du PA.

On peut donc conclure clairement à l'existence d'un domaine de fixation pour les PIP sur la protéine GRA2, qui lie le PI(4,5)P₂ sous toutes ses formes testées.

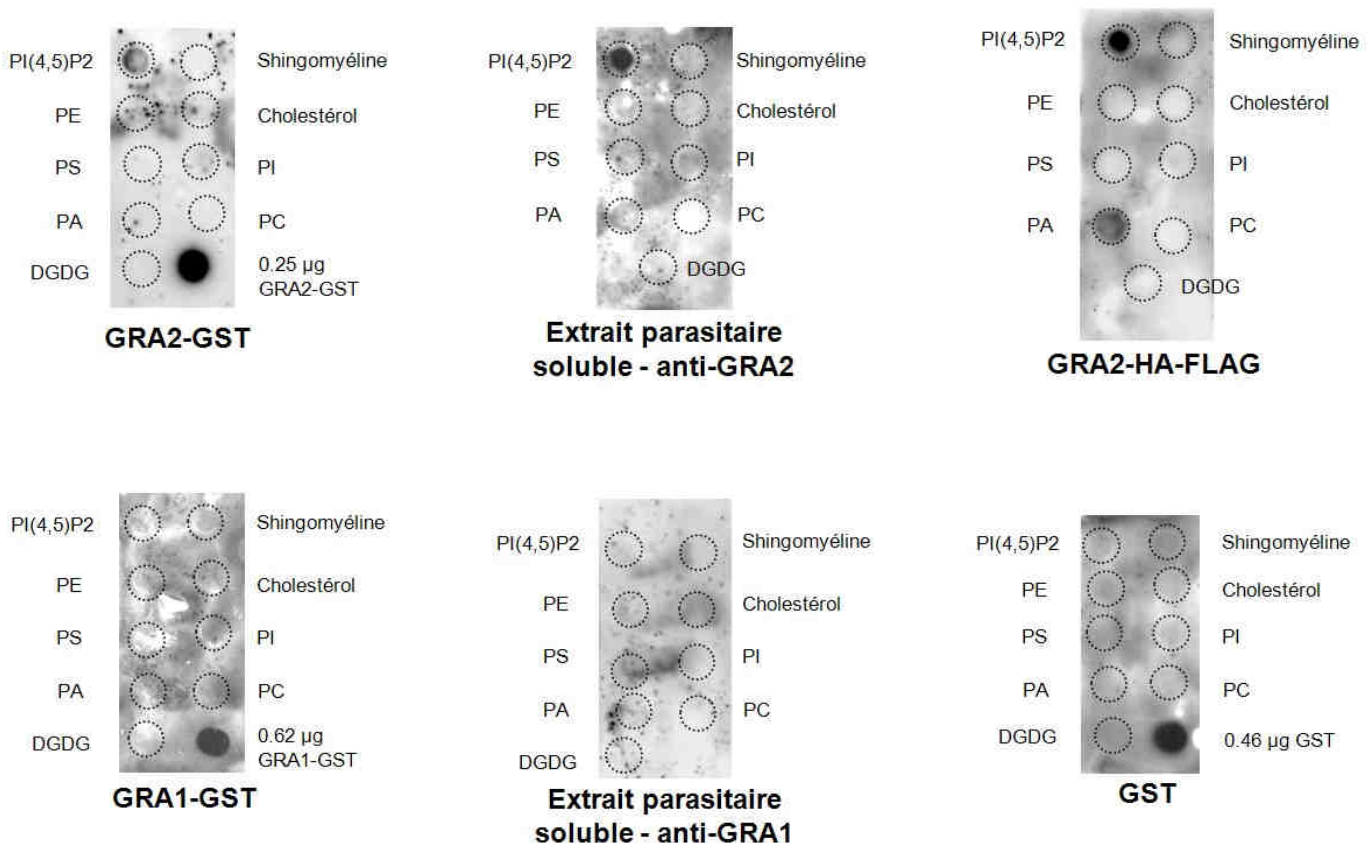


Figure 61 : Identification des lipides partenaires de GRA2. GRA2 possède une forte réactivité pour le PI(4,5)P₂ qu'elle soit exprimée sous forme recombinante en système bactérien (GRA2-GST), issue d'un lysat parasitaire soluble ou en fusion avec l'étiquette HA-FLAG et purifiée à partir d'un extrait parasitaire. GRA2-HA-FLAG lie également le PA. En contrôle, GRA1-GST et GRA1 native, comme la GST, ne lient aucun lipide. PE, phosphatidylethanolamine ; PS, phosphatidylsérine ; PA, acide phosphatidique ; GDGD, digalactosyldiacylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; PC, phosphatidylcholine.

Afin de confirmer l'interaction entre GRA2 et le PI(4,5)P₂, une nouvelle expérience de « lipid overlay » a été réalisée. GRA2-GST a été incubée sur une membrane où sont déposés de nombreux dérivés phosphatés du PI (« PIP Strip ») (**Figure 62**).

Cette expérience montre que GRA2-GST réagit avec tous les lipides chargés négativement à pH physiologique : PIP mono-, di- et tri-phosphatés [PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃], le PS et plus faiblement, le PA. Cette liaison de GRA2-GST au PA suggère que l'interaction précédemment observée entre GRA2-HA-FLAG et le PA était en fait bien spécifique. On peut envisager que le PA, utilisé pour les expériences de « lipid overlays » ci-dessus (**Figure 61**), ait été légèrement dégradé au cours de sa préparation ou de sa conservation et que seule l'incubation de GRA2-HA-FLAG, enrichie après sa purification et donc certainement plus concentrée que GRA2-GST ou GRA2 native, ait permis la mise en évidence de leur interaction.

Dans ce type d'expérience de « lipid overlays », le domaine de liaison aux PIs de GRA2 n'est pas spécifique du PI(4,5)P₂ car GRA2 lie tous les dérivés phosphatés du PI. Cette large affinité pour les PIP a également été décrite pour la protéine GRA7 (Coppens *et al.*, 2006). *In vivo*, le PIP le plus rencontré est le PI(4,5)P₂. La réactivité de GRA2 pour les PIP, et plus généralement les lipides chargés négativement, suggère que l'association membranaire de GRA2 pourrait requérir sa liaison préalable à des domaines lipidiques bien particuliers et riches en PI(4,5)P₂.

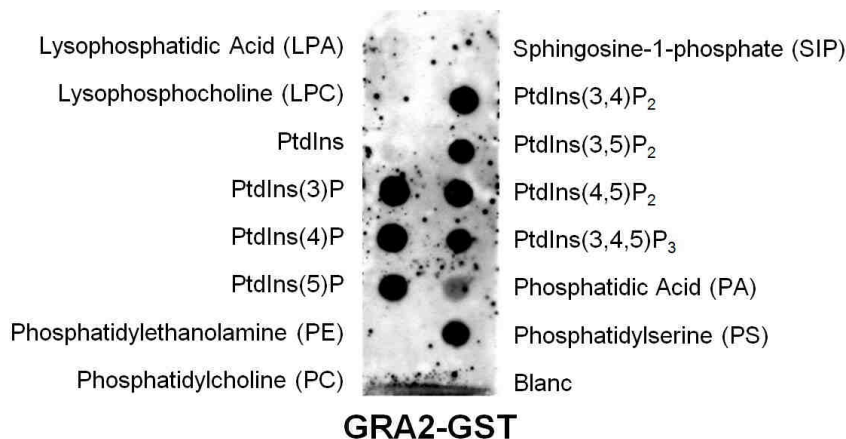


Figure 62 : Dans les expériences de « lipid overlays », GRA2 lie les PIP de manière non spécifique. GRA2-GST se lie à tous les PIP mono-, di- et tri-phosphatés ainsi qu'au PA et au PS.

b) Interactions des autres protéines GRA avec les lipides

Afin de rechercher si la réactivité des protéines GRA avec le PI(4,5)P₂, ou avec les PIP, est une caractéristique propre aux protéines GRA2 et GRA7 impliquées dans la formation des tubules membranaires de la VP, ou s'il s'agit d'une propriété générale à toutes les protéines GRA, l'interaction

potentielle des protéines GRA avec les lipides a été recherchée par « lipid overlays ». Cette expérience a été réalisée à l'aide des protéines recombinantes GRA6-GST et GRA9-HIS (don de D.K.Z. Adjogble, Heinrich Heine University, Dusseldorf) et des protéines natives GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9 issues d'un extrait parasitaire soluble.

Les résultats obtenus montrent que les protéines GRA testées sont toutes caractérisées par une forte réactivité pour le PI(4,5)P₂, sous au moins une de leur forme (recombinante ou native). De plus, GRA5 native se lie légèrement au PA (**Figure 63**).

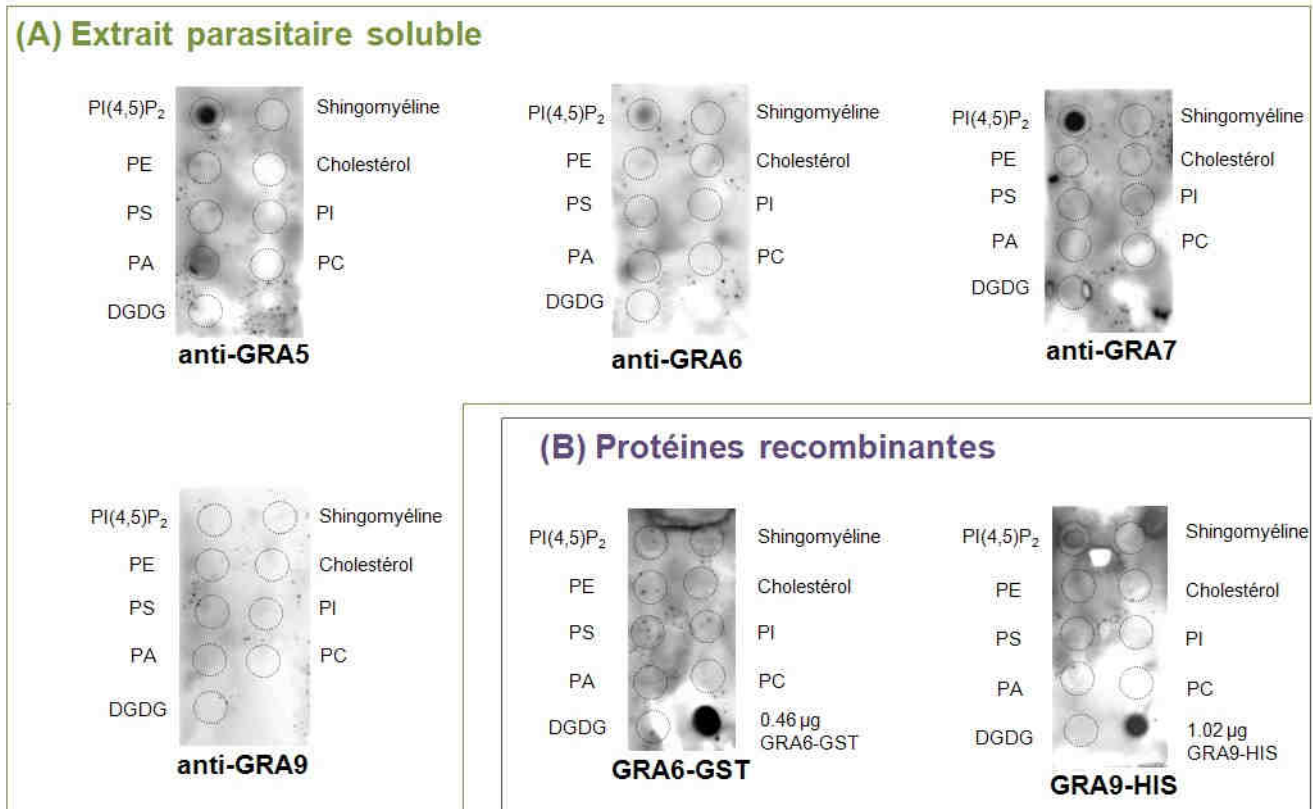


Figure 63 : Identification des lipides partenaires de GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9 natives (A) et de GRA6 et GRA9 exprimées sous forme recombinantes (B). GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9 se lient au PI(4,5)P₂ sous au moins une de leur forme (recombinante ou native). GRA5 lie également le PA.

La liaison de GRA7 native au PI(4,5)P₂ confirme les résultats obtenus par Coppens *et al.* avec la protéine GRA7 recombinante (Coppens *et al.*, 2006). La liaison de GRA6 native et recombinante avec le PI(4,5)P₂ est très faiblement détectée. La protéine GRA9, sous forme recombinante, lie faiblement 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 GD, masque le site d'interaction avec le PI(4,5)P₂. Il faudrait

cependant contrôler d'éventuelles interactions du marqueur HISx6 utilisé pour purifier GRA9 à partir d'*E. coli*.

Comme GRA2, les protéines GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9 lient le PI(4,5)P₂. Le PI(4,5)P₂ est un composant minoritaire des membranes cellulaires (\cong 1 % des lipides composants les membranes). Il s'accumule au niveau des rafts. Le PI(4,5)P₂ est particulièrement enrichi au niveau de la membrane plasmique des cellules mammifères où il constitue un substrat important de nombreuses protéines impliquées dans les voies de signalisation. Il est également impliqué dans le trafic vésiculaire et dans la stabilisation des microfilaments d'actine (Caroni, 2001).

Comme il l'a été suggéré pour GRA7 (Coppens *et al.*, 2006) et pour GRA2 dans cette étude, l'association membranaire de GRA5, GRA6 et GRA9 pourrait donc nécessiter une reconnaissance préalable de certains lipides membranaires bien particuliers, notamment le PI(4,5)P₂. Ces données suggèrent que, comme il l'a été décrit pour les protéines MIM (Missing-in-Metastasis), IRSp53 et l'amphiphysine, les protéines GRA, notamment GRA2 et GRA7, pourraient déformer les membranes riches en PI(4,5)P₂ sous forme de structures tubulaires (RNM et HOST, respectivement) (Mattila *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2002).

4. Etude *in vitro* de l'interaction de GRA2 avec des membranes modèles

Avant de conclure sur l'ensemble de ces données, il est nécessaire de rapporter ici les résultats obtenus au laboratoire par P. Ruffiot au cours de sa thèse (juillet 2007) et ceux d'A. Bittame au cours de son Master 2 (juin 2007). Leurs travaux reposent sur l'étude de l'interaction membranaire de GRA2, et d'autres protéines GRA, *via* l'utilisation de systèmes de membranes modèles : soit des GUVs (Giant Unilamellar Vesicles), soit des SUVs (Small Unilamellar Vesicles). Ces membranes modèles miment de manière simpliste les membranes naturelles et permettent de disséquer le fonctionnement des membranes biologiques.

a) Association de GRA2 aux GUVs formées de lipides complexes (thèse de P. Ruffiot)

Les GUVs sont des vésicules géantes de diamètre \cong 10 μ m (taille approximative d'une VP contenant 4 ou 8 parasites), dont la composition et les propriétés peuvent être contrôlées et adaptées pour les études de microscopie optique et des mesures de tension membranaire. Elles sont formées par électroformation (Angelova and Dimitrov, 1986).

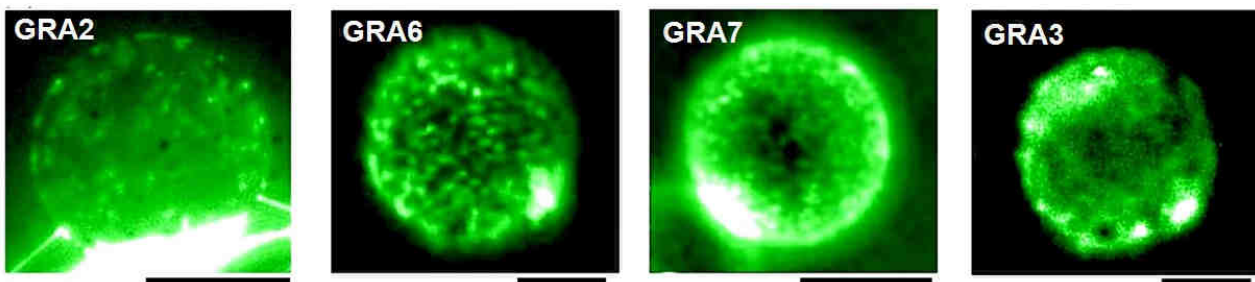
Ce système de membranes modèles formées à partir de lipides totaux extraits de cellules HeLa a été utilisé pour l'étude par immunofluorescence, de l'association membranaire des protéines GRA2, GRA3,

GRA6 et GRA7, issues des produits de sécrétion parasites et de la fraction vacuolaire soluble. Les protéines GRA2, GRA3, GRA6 et GRA7, sous leurs formes ultrasolubles sécrétées ou vacuolaires, s'associent bien aux membranes des GUVs et présentent des caractéristiques de répartition variées (Figure 64).

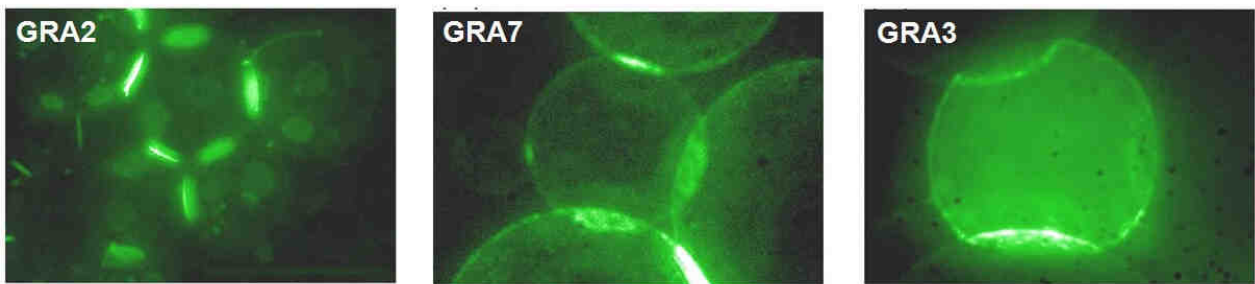
✓ *Concentration de GRA2, GRA6 et GRA7 au niveau de microenvironnements à la surface des GUVs isolées*

A la surface des GUVs isolées, GRA2, GRA6 et GRA7 se rassemblent en microdomaines protéiques, tandis que GRA3 est répartie de manière beaucoup plus diffuse, bien que non homogène (Figure 64A).

(A) GUVs isolées



(B) GUVs jointives



(C) Fils membranaires

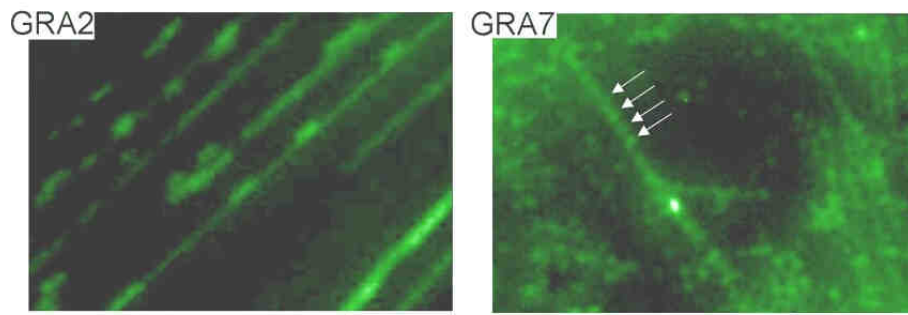


Figure 64 : Association de GRA2, GRA3, GRA6 et GRA7 à des GUVs isolées (A), à des GUVs jointives (B) ou à des fils membranaires (C). (A) Alors que GRA3 est caractérisée par une répartition diffuse à la surface des GUVs isolées, GRA2, GRA6 et GRA7 y forment un marquage piqueté. (B) Contrairement à GRA3 qui est associée sur toute la surface des GUVs, GRA2 et GRA7 sont majoritairement détectées au niveau des zones de contact entre GUVs. (C) GRA2 et GRA7 mais ni GRA3, ni GRA6, s'associent également à un réseau dense de fils membranaires présent sur le fond de la chambre d'incubation : la répartition de GRA2 y est diffuse, comparée à celle en points réguliers (flèches blanches) de GRA7. Echelle : 25 µm. D'après la thèse de P. Ruffiot, juillet 2007.

La ségrégation de GRA2, GRA6 et GRA7 dans des microenvironnements semble indiquer qu'ils se distinguent du reste de la membrane par une composition lipidique (radeaux lipidiques) et/ou une courbure particulière (bourgeons). La ségrégation de protéines dans des microenvironnements est un processus observé, entre autres, pour des protéines de rafts, comme la cavéoline (Harder and 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 (Iglıc *et al.*, 2006). Les affinités des protéines GRA2, GRA6 et GRA7 pour les PIP pourraient jouer un rôle dans le recrutement et l'accumulation de ces protéines dans ce type de 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.

Cependant, on ne peut exclure que la concentration de GRA2, GRA6 et GRA7, dans des domaines microniques à la surface des GUVs, résulte de l'agrégation non fonctionnelle des protéines qui n'ont pas pu trouver un réarrangement favorable (décalage hydrophobe, décalage de forme) dans la membrane (Lee, 2004). Toutefois, en défaveur de cette hypothèse, lorsqu'elle s'associe aux GUVs constituées uniquement de PC, la protéine GRA7 n'est plus caractérisée par un marquage piqueté sur les membranes: cette protéine ne forme donc pas d'agrégats protéiques dans des membranes homogènes formées de PC.

✓ **Répartition de GRA2 et GRA7 au niveau des zones de contact entre GUVs**

GRA2 et GRA7 présentent la particularité d'être concentrées au niveau des zones de contact entre GUVs, ce qui n'est pas le cas de GRA3 (**Figure 64B**). Ce résultat incite à envisager un rôle dans la fusion ou l'amarrage de membranes pour ces protéines.

✓ **GRA2 et GRA7 sont associées à des fils membranaires**

GRA2 et GRA7 sont également détectées associées à des fils membranaires, ce qui n'est pas le cas de GRA3 ou GRA6. La répartition de GRA2 et GRA7 sur ces structures tubulaires est différente : GRA2 est y détectée de manière assez diffuse alors que GRA7 se répartit en points réguliers (**Figure 64C**). Cette répartition de GRA7 au niveau de ce réseau de fils membranaires évoque l'assemblage en anneaux observé autour de la membrane des HOST décrit par Coppens *et al.* (Coppens *et al.*, 2006). La formation de ces fils membranaires pourrait être le résultat d'un artefact résultant du flux appliqué sur les GUVs dans la chambre d'incubation et on ne peut pas déterminer à quel stade les protéines GRA2 et GRA7 s'associent à ces structures : soit avant, soit au cours de leur formation, auquel cas elles pourraient y être impliquées ; soit *a posteriori*, en fonction des propriétés particulières de ces structures (courbure, composition lipidique). Malgré ces réserves, il est intéressant de noter que seules GRA2 et GRA7, les deux protéines tubulogéniques, ont été observées en association avec ces fils membranaires.

✓ **Interdépendance de GRA2 et GRA6 pour leur association aux membranes des GUVs**

L'absence d'une des deux protéines, GRA2 (souche Δ GRA2-HXGPRT) ou GRA6 (souche Δ GRA6-HXGPRT), semble affecter l'association de l'autre protéine puisque dans les deux cas présentés, le signal obtenu est beaucoup plus faible. En absence de GRA6, GRA2 apparaît concentrée sur de petits amas membranaires, ce qui pourrait signifier qu'elle est sous une forme agrégée. En absence de GRA2, il est plus difficile de se prononcer pour GRA6 dont le marquage est toujours inhomogène (**Figure 65**). Ces résultats font apparaître une interdépendance des protéines GRA2 et GRA6 pour leur association aux membranes des GUVs et appuient donc les résultats observés dans la VP (Mercier *et al.*, 2002).

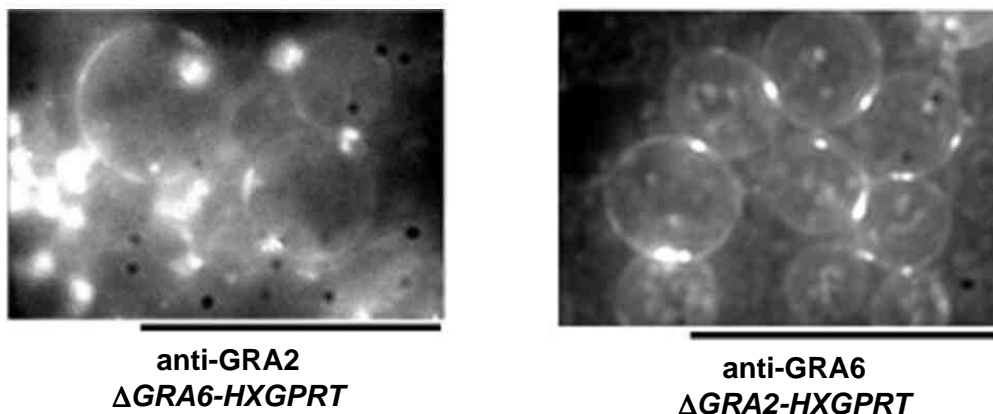


Figure 65 : Interdépendance de GRA2 et GRA6 pour leur association aux membranes des GUVs. En l'absence de GRA6 (à gauche, souche Δ GRA6-HXGPRT), le signal obtenu pour GRA2 est plus faible. GRA2 apparaît essentiellement associée à de petits amas membranaires attenants aux GUVs. Ces structures denses pourraient correspondre à des résidus membranaires issus de GUVs instables. En l'absence de GRA2 (à droite, souche Δ GRA2-HXGPRT), le signal obtenu pour GRA6 est également moins intense. Les membranes apparaissent marquées irrégulièrement, tandis que les zones de contact entre GUVs apparaissent marquées d'un point intense. Echelle : 50 μ m. Thèse de P. Ruffiot, juillet 2007.

Les travaux de Coppens *et al.* (Coppens *et al.*, 2006) ont montré la capacité à induire la tubulation membranaire *in vitro* de la fraction sécrétée ultrasoluble. En parallèle, les travaux de P. Ruffiot (thèse de P. Ruffiot, juillet 2007) montrent que la localisation des protéines GRA par immunofluorescence sur les membranes des GUVs permet d'envisager des rôles possibles pour certaines de ces protéines dans ces phénomènes de déformation membranaire. Au vu de l'indépendance des structures tubulaires observées dans la vacuole (RNM et HOST en particulier), il semble très probable que deux mécanismes distincts, permettant la formation de tubules membranaires, soient à l'œuvre dans la vacuole.

La localisation de GRA2 au niveau des zones de contact entre GUVs suggère que le mécanisme de formation du RNM passe par l'amarrage et/ou la fusion membranaire des vésicules de la VP, médiée

par GRA2. De plus, l'interdépendance de GRA2 et GRA6 pour leur association aux membranes des SUVs laisse supposer que GRA6 serait aussi directement impliquée dans la formation des tubules du RNM, ce qui conforte les résultats obtenus suite à l'observation du phénotype des parasites délétés de GRA6 (Mercier *et al.*, 2002).

GRA7 apparaît associée aux divers types de déformations membranaires observées dans la VP. De plus, elle forme un motif ponctué sur de fins tubes membranaires issus des SUVs. Ce profil d'association corrobore l'hypothèse énoncée dans les travaux de Coppens *et al.*, (Coppens *et al.*, 2006) selon laquelle GRA7 se multimériserait pour former un manteau protéique contraignant les membranes des HOST sous forme cylindrique. Un scénario de déformation de la MPV pour la formation des HOST peut être envisagé : GRA7, *via* l'insertion de son domaine transmembranaire en épingle dans le feuillet interne de la MVP pourrait induire la perturbation initiale de la membrane. La poussée exercée par les microtubules de l'hôte pourrait ensuite permettre l'invagination de la MVP dans la VP. Le tubule membranaire serait alors stabilisé par la polymérisation de GRA7, formant une charpente cylindrique autour de la membrane (thèse de P. Ruffiot, juillet 2007).

b) Association spontanée de GRA2 aux SUVs formées de lipides complexes

Le second système de membranes modèles utilisé par P. Ruffiot pour l'étude de l'interaction membranaire de GRA2 avec les membranes est le système des SUVs. Ce sont des liposomes d'un diamètre ≤ 100 nm, robustes, dont la composition lipidique peut être contrôlée et qui sont initialement formés de manière spontanée, sous forme de vésicules multilamellaires lors de la réhydratation de films lipidiques. La sonication permet de former des vésicules unilamellaires de taille adaptée (Matsuoka *et al.*, 1998). Les SUVs sont particulièrement adaptées pour l'étude biochimique des interactions protéine-membrane.

Comme GRA3, GRA7 et potentiellement GRA6, la protéine GRA2 récupérée sous forme soluble à partir d'un lysat parasitaire, des produits de sécrétion parasitaire *in vitro* ou de la VP est capable de s'associer aux membranes des SUVs composées de lipides extraits de cellules HeLa, sans apport d'énergie. Cependant, contrairement à GRA7 qui présente un comportement typique de protéine transmembranaire, GRA2, comme GRA3 et GRA6, est essentiellement liée aux SUVs par des liaisons de type hydrophobe ou hydrogène (extraction par l'urée 6M). Les interactions majeures pourraient être de type protéine-protéine, à la différence de ce qui est observé dans la vacuole où les interactions hydrophobes prédominent. Cela pourrait indiquer que les protéines GRA ne sont pas bien stabilisées dans les membranes et ont tendance à s'agréger. De plus, la composition lipidique des SUVs est un paramètre important pour l'association des protéines GRA2 et GRA6, à la différence de GRA3 et GRA7. En effet, alors que GRA3 et GRA7 sont capables de s'associer à des membranes simples formées uniquement de PC, l'association de GRA2 et GRA6 aux SUVs nécessite un mélange lipidique complexe (lipides totaux de cellules HeLa).

Les résultats de l'incubation de GRA2 (recombinante ou native) avec les SUVs, en présence d'énergie, montrent que GRA2 s'associe spontanément aux membranes *in vitro*, en partie sous forme dimérique. Néanmoins, au moins 50% de la protéine reste dans la fraction soluble d'ultracentrifugation (A. Bittame,

Master 2, juin 2007). Ce comportement reflète ce qui est observé dans la VP (Sibley *et al.*, 1995). Il pourrait aussi être expliqué par le fait que le ratio protéine/lipides utilisé (1/1 en masse) est très important. Des tests complémentaires faisant varier ce ratio devront être réalisés afin de déterminer le ratio optimal protéine/lipides.

GRA2 possède une grande affinité pour les membranes des SUVs mais comme la protéine GRA6 associée au RNM, son association requiert des lipides complexes. Une composition lipidique spécifique dans les HOST, le RNM et la MVP pourrait donc constituer un mécanisme potentiel de ségrégation des protéines GRA dans les différents compartiments membranaires de la VP.

c) Effet tubulogénique direct de GRA2 sur les membranes des SUVs

Au cours de son Master 2, A. Bittame a recherché l'effet direct de GRA2 sur les SUVs par microscopie électronique à transmission. Ainsi, les SUVs incubées, en présence de GTP, avec la protéine GRA2 native immunopurifiée à partir des produits de sécrétion parasitaires ou avec la protéine GRA2 recombinante (système bactérien en fusion avec deux étiquettes HISx6) forment de longs et fins tubules pouvant atteindre 6,25 µm de long et 83 nm de diamètre. Ces tubules présentent des ramifications (encadrées en pointillés rouges) et des bourgeons apparaissent de part et d'autre de la membrane des tubules (pointes de flèches). La densité des bourgeons observés à partir des SUVs incubées avec GRA2 native est plus importante dans les zones de ramification tubulaire. L'incubation des extraits de sécrétion parasitaires ES avec les SUVs, avec GTP, a également généré de rares tubules membranaires mais de longueur inférieure à celle observée avec les protéines GRA2 purifiées (native ou recombinante). Les bourgeons apparaissent plus denses aux électrons que dans le cas de GRA2 purifiée (native ou recombinante) (**Figure 66**).

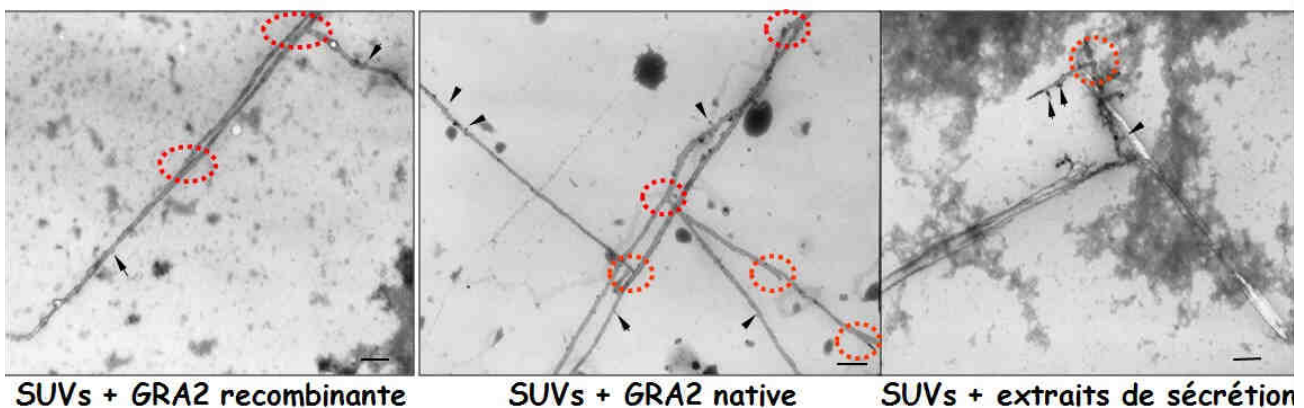


Figure 66 : Effet tubulogénique de GRA2. Observation en Microscopie Electronique à Transmission (x 10 000) des tubules formés lors de l'incubation des SUVs formées à partir de lipides de cellules Hela avec GRA2 recombinante (**A**), native (**B**) ou avec les produits de sécrétion parasitaires (**C**). Ces tubules présentent diverses ramifications (cercles en pointillés rouges) et bourgeons (pointes de flèches). Echelle : 500 nm. Master 2 d'A. Bittame, 2007.

Les longs tubules membranaires ramifiés formés *in vitro* sont semblables à ceux observés dans la vacuole mais avec un diamètre qui serait double de celui des tubules endogènes (80 nm versus 40 nm) (Magno *et al.*, 2005b). De plus, ils apparaissent particulièrement longs (au moins 4 μm) et rectilignes alors que ceux observés dans la VP sont courbes et ont une longueur estimée à 200-500 nm (Magno *et al.*, 2005). Ces différences reflètent les limites du système minimaliste employé (GRA2 en excès + SUVs + GTP en excès) et montrent que la formation des tubules du RNM *in vivo* nécessite très probablement l'action d'autres protéines de la VP telles que GRA6.

La protéine amphitropique GRA2 est capable, sous sa forme native et recombinante, comme il l'a été démontré pour GRA7 (Coppens *et al.*, 2006), d'induire la formation de tubules membranaires *in vitro*. Ces résultats valident directement la propriété tubulogénique de GRA2 vis à vis des membranes du RNM.

D. CONCLUSION GENERALE

L'insertion d'une hélice amphipatique dans le feuillet externe d'une membrane est suffisante pour générer des déformations membranaires (Peter *et al.*, 2004 ; Zimmerberg and Kozlov, 2006). GRA2 est une petite protéine originale de part ses deux ou trois hélices alpha-amphipatiques centrales, et qui ne possède aucune homologie avec des protéines possédant des domaines impliqués dans le phénomène de courbure membranaire. Toutefois, elle est l'effecteur principal de la tubulation des vésicules de la VP sous forme de RNM (Mercier *et al.*, 2002). Plus précisément, l'hélice alpha-amphipatique α_3 de GRA2, associée aux régions N- et C-Terminals de la protéine, suffit au recrutement et à l'association de GRA2 aux vésicules de la VP localisées au niveau de l'invagination postérieure du parasite. Par contre, l'association postérieure de GRA6, protéine stabilisatrice du RNM, nécessite plus d'une hélice alpha-amphipatique de GRA2 et la formation du RNM ainsi que l'organisation des parasites dans la VP sont assurées par les trois hélices associées à la région N-Terminale. GRA2, comme GRA6, possède une forte affinité pour la membrane des SUVs mais requiert pour cette association, des lipides particuliers. Au vu de la forte affinité de GRA2, et plus généralement des autres protéines GRA, pour les PIP, notamment le $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, les lipides impliqués dans l'association membranaire de GRA2 pourraient être des PIP. Ces résultats laissent fortement supposer que GRA2, sur le modèle de l'epsine, est une protéine génératrice de déformations membranaires.

Cependant, GRA2 est associée au niveau des zones de contact des GUVs. Ces résultats permettent d'envisager une hypothèse alternative, en l'impliquant dans des mécanismes d'amarrage et de fusion des membranes, sur le modèle de protéines SNARE par exemple. En effet les protéines SNARE peuvent s'associer aux vésicules par le biais de leurs hélices amphipatiques et initier ainsi la fusion des membranes

auxquelles elles sont associées (Matos *et al.*, 2003). Cette hypothèse est renforcée par le fait que GRA2 induit la formation de tubules *in vitro* à partir des SUVs (A. Bittame, Master 2, juin 2007).

L'ensemble de ces données permet l'élaboration d'un modèle de la formation de tubules membranaires *in vitro* par GRA2. Dans ce modèle, GRA2, *via* les charges positives de ses hélices alpha-amphipathiques, se lierait aux PIP chargés négativement des SUVs auxquelles elle s'associerait après un changement de conformation possible. Etant donné sa localisation préférentielle dans les zones de contact entre GUVs, GRA2 arrimerait ensuite les vésicules les unes aux autres et contribuerait à leur fusion et à la formation de tubules (Figure 67).

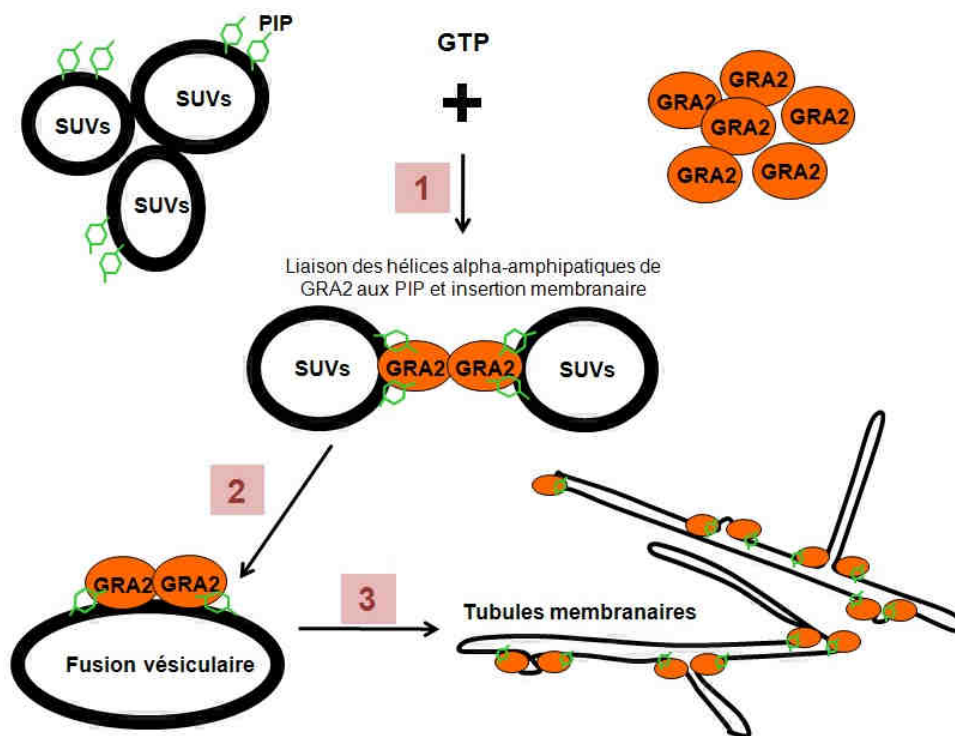


Figure 67 : Modèle de tubulation membranaire induite *in vitro* par GRA2. En se liant aux phospholipides chargés négativement (essentiellement des PIP) *via* les charges positives de ses hélices alpha-amphipathiques, GRA2 permettrait d'arrimer deux vésicules entre elles (1) puis leur fusion (2), ce qui conduirait à la formation de tubules membranaires (3) décorés de GRA2, sans doute aux zones de bourgeonnement et de ramifications, ce qui reste à être démontré par microscopie électronique et immunomarquage.

Ce modèle du rôle tubulogénique de GRA2 *in vitro* n'est cependant pas applicable au processus de formation du RNM *in vivo*. En effet, alors que la délétion de GRA2 entraîne la perte de l'architecture tubulaire du RNM au profit d'un matériel agrégé, la VP des parasites Δ GRA6-HXGPRT n'est pas constituée de RNM mais seulement de vésicules (Mercier *et al.*, 2002). *In vivo*, GRA2 semble donc impliquée dans la formation et la fusion des vésicules constitutives du RNM mais n'est pas capable d'induire, sans GRA6, la formation des tubules. Cette observation est confirmée par l'interdépendance de GRA2 et GRA6 pour leur association à la membrane des GUVs.

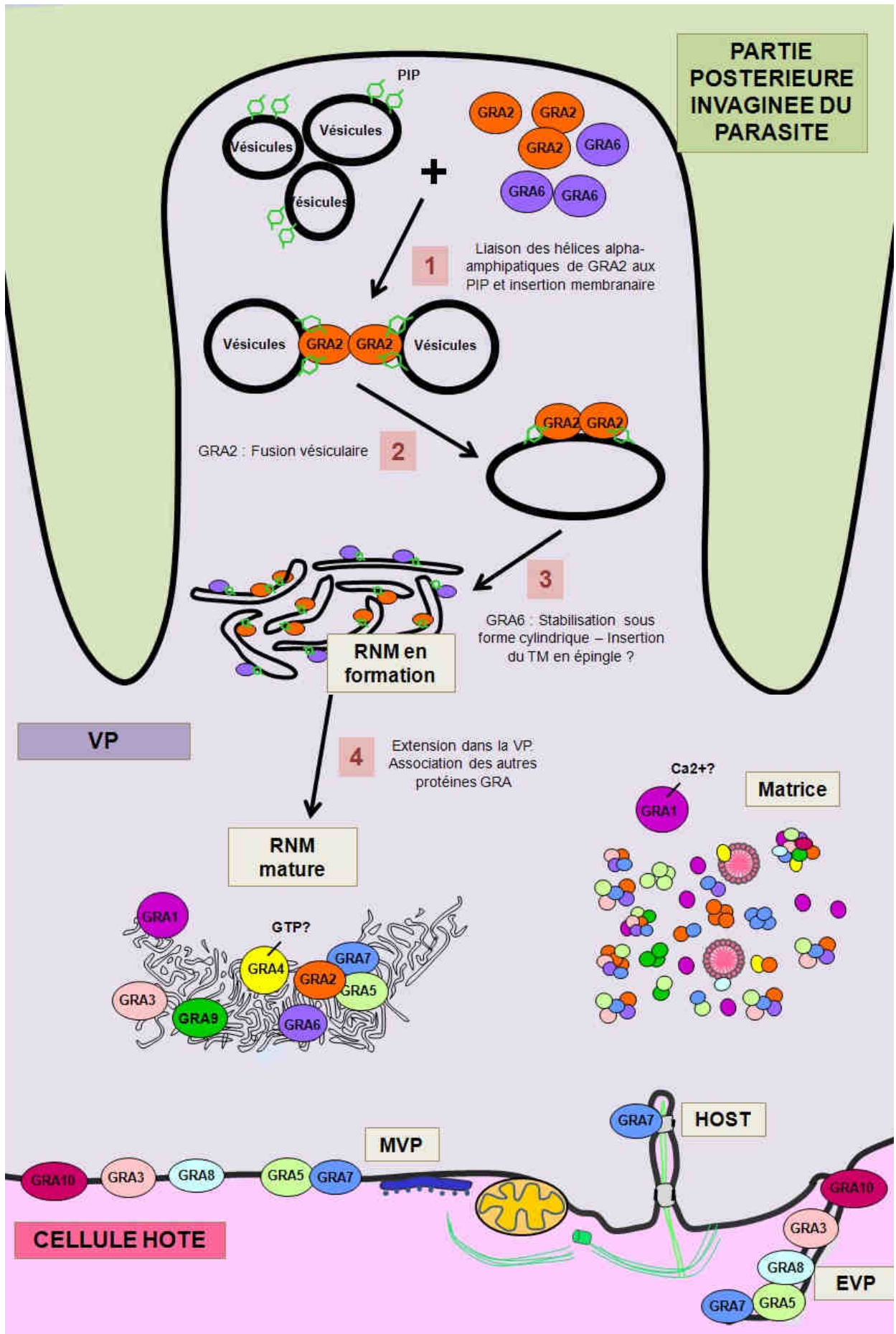


Figure 68 : Modèle de tubulation membranaire du RNM induite *in vivo* par GRA2 et GRA6 au niveau de la partie postérieure invaginée du parasite, dans la première heure qui suit l'invasion. En se liant aux phospholipides chargés négativement (essentiellement des PIP) *via* les charges positives de ses hélices alpha-amphipathiques, GRA2 permettrait d'arrimer deux vésicules entre elles **(1)** puis leur fusion **(2)**, ce qui conduirait à la formation de tubules membranaires **(3)** dont la stabilisation sous forme cylindrique serait assurée par GRA6. **(4)** Le réseau s'étend dans tout l'espace de la VP pour constituer le réseau mature auquel s'associent les protéines GRA4, GRA9 et une fraction de GRA1, GRA3, GRA5 et GRA7. Dans ces membranes, GRA2 est associée à GRA5 et GRA7 et les protéines GRA4 et GRA6 sont dans l'environnement proche de GRA2. TM, domaine transmembranaire.

Le recoupement de ces données fait émerger un nouveau modèle d'action des protéines du RNM, par analogie avec le processus de reformation du réticulum endoplasmique après mitose (Shibata *et al.*, 2006). Dans ce modèle (**Figure 68**), GRA2 serait impliquée dans l'amarrage et la fusion des vésicules libérées par le parasite, *via* sa liaison aux PIP des vésicules, et GRA6, dans leur stabilisation sous forme cylindrique. Comme GRA2, GRA6 pourrait s'associer à des domaines membranaires de composition lipidique particulière, riches en PIP. Le mécanisme d'action de GRA6 peut être envisagé par l'insertion en épingle à cheveux de son domaine transmembranaire. Rechercher la localisation de GRA6 sur les membranes des GUVs jointives pourrait permettre de préciser cette hypothèse.

Les systèmes de membranes modèles ont permis une meilleure compréhension de la nature des interactions membranaires établies par GRA2. Toutefois, le modèle de tubulation *in vitro* par GRA2 ne peut pas être complètement appliqué à la formation du RNM de la VP *in vivo*. En effet, les systèmes de membranes modèles ne tiennent pas compte des paramètres physiologiques de la VP, notamment en l'état actuel, des interactions établies entre les protéines GRA2, GRA5 et GRA7 (et GRA4, GRA6) dans les membranes de la VP.

De plus, ces modèles de tubulation *in vitro* et *in vivo* n'englobent pas l'idée selon laquelle GRA2 pourrait s'associer aux membranes sous la forme de multimères. En effet, dans le parasite, GRA2 constitue des complexes de haut poids moléculaire (jusqu'à 300 kDa environ) (cf chapitre IV C 2) l'analyse des fractions d'élution de la purification de GRA2-HA-FLAG a montré l'existence d'une forme dimérique de GRA2 (cf chapitre IV C 3 c). Cette dimérisation a également été observée pour la protéine native et recombinante en solution et associée aux SUVs (A. Bittame, Master 2, juin 2007).

Conclusions et Perspectives

CHAPITRE VI

Conclusions et perspectives

Ce chapitre final reprend les résultats importants de mes travaux de thèse et dresse le bilan des connaissances qui en résultent et qui permettent d'apporter des éléments de réponse aux questions de départ qui avaient été posées :

- comment GRA2, et plus généralement les protéines GRA, peuvent elles être stockées dans les GD et sécrétées dans la VP sous forme soluble à 100 000 g alors que ce sont des protéines membranaires ;
- quels mécanismes assurent le ciblage spécifique de GRA2 et des autres protéines du RNM vers les membranes qui le constituent ?
- quel est le mode d'association de GRA2 aux membranes du RNM et comment induit-elle leur formation ?

Ce chapitre expose également les points encore non résolus et quels pourraient être les expériences à réaliser afin d'y répondre.

A. PROBLEME DE LA SOLUBILITE DES PROTEINES GRA DANS LES GD ET LA VP

La purification des protéines GRA2, GRA3, GRA5, GRA6 et GRA7 fusionnées à l'étiquette HA-FLAG a montré que les protéines GRA forment des complexes dans les GD et dans la fraction soluble de la VP. Ce résultat répond en grande partie au problème de la solubilité des protéines GRA dans ces compartiments puisqu'il est très probable que ces interactions entre protéines GRA leur permettent de ne pas exposer leur domaine central hydrophobe. Par contre, dans les produits de sécrétion *in vitro*, seule GRA7 a été détectée associée à GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG. Il est donc possible que ces petits complexes ne suffisent pas à masquer les domaines hydrophobes des protéines GRA et à les solubiliser lors de leur sécrétion dans la VP. Toutefois, la multimérisation des protéines GRA observée pour GRA2 et GRA5 dans le parasite et pour GRA7 dans les produits de sécrétion parasitaires (Coppens *et al.*, 2006) pourrait compenser l'absence de gros complexes de protéines GRA dans les produits de sécrétion *in vitro*. Enfin,

même si aucune vésicule n'a jamais été observée dans la VP, sauf en cas de délétion partielle de GRA2 et de délétion totale de GRA6 (Travier *et al.*, en révision ; Mercier *et al.*, 2002), ni aucun lipide dans les GD, on ne peut complètement exclure le fait que la solubilité des protéines GRA lors de leur sécrétion dans la VP résulte de leur association à des microvésicules ou à des micelles lipidiques d'origine encore inconnue, ce phénomène étant accentué lors des expériences de sécrétion *in vitro* en présence de sérum.

Dans notre étude, je me suis focalisée sur la compréhension du comportement insolite des protéines GRA dans les GD, et lors de leur sécrétion dans la VP, *via* la recherche des interactions établies entre les protéines GRA. Cependant, afin d'obtenir une vue d'ensemble sur cette problématique, il serait nécessaire de l'étendre aux autres protéines stockées dans les GD. Actuellement, outre les protéines GRA, les seules protéines identifiées dans les GD comptent deux NTPases (Asai *et al.*, 1983, 1995 ; Bermudes *et al.*, 1994b), deux inhibiteurs de sérine protéase (Pszenny *et al.*, 2000, 2002 ; Morris *et al.*, 2002 ; Morris and Carruthers, 2003), deux cathepsines (Que *et al.*, 2007), une phosphatase (Metsis *et al.*, 1995) et une protéine 14.3.3 (Assossou *et al.*, 2003 ; 2004). La purification des GD n'ayant jamais été réalisée, celle des protéines GRA fusionnées à l'étiquette HA-FLAG devrait permettre l'identification par MS/MS d'autres protéines de GD partenaires encore inconnues et ainsi de réaliser une partie du protéome des GD.

Enfin, la séparation des protéines GRA par biochimie conventionnelle a montré que les protéines GRA en complexes semblent former des oligomères dans les GD, d'où le profil semi-agrégé de ces protéines dans ce compartiment. Elle a également montré que GRA2 possède un comportement singulier qui diffère de celui des autres protéines GRA membranaires. En effet, comme le montre l'exclusion de taille de la fraction 1M de la phosphocellulose (cf chapitre IV C 1 figure 1C), elle est majoritairement associée à des petites structures non comprises dans les oligomères que formeraient les autres protéines GRA. La pertinence biologique de cette originalité de GRA2 reste encore inconnue. Ce comportement particulier devra cependant être confirmé par la séparation sur exclusion de taille de la fraction 0.5 M de la phosphocellulose, fraction dans laquelle GRA2 est majoritairement détectée (cf chapitre IV C 1 figure 1A). Sur les 7000 protéines de *Toxoplasma*, seules 15% des protéines sont éluées dans la fraction 0.5 M KCl de la phosphocellulose. La purification de GRA2 native pourrait donc être réalisée à partir de cette fraction dans laquelle elle est enrichie.

B. CIBLAGE SPECIFIQUE DES PROTEINES GRA VERS LES MEMBRANES DU RNM

Les mécanismes qui régissent le tropisme des protéines GRA vers les différents systèmes membranaires de la VP restent complètement inconnus. Des machineries de translocation propres à la MVP ou au RNM et sécrétées dans la VP pourraient exister et leurs composants protéiques pourraient être identifiés par l'étude du protéome de la VP. Une analyse protéomique de la VP est d'ailleurs en cours de réalisation

(Martin *et al.*, résultats présentés lors du 9th International Congress on Toxoplasmosis, Chico Hot Springs, Montana). Toutefois, l'ensemble de mes travaux de thèse permettent de proposer deux autres mécanismes non exclusifs l'un de l'autre. Ces mécanismes pourraient impliquer :

1) la reconnaissance spécifique de lipides particuliers reconnus par les protéines GRA. L'étude des interactions GRA-lipides par « lipid overlays » montre cependant que toutes les protéines GRA testées s'associent aux PIP, notamment le PI(4,5)P₂. Ces résultats devront être validés sur SUVs et *in vivo* ;

2) des modifications post-traductionnelles portées par les protéines GRA. La sumoylation pourrait par exemple constituer une signature pour le ciblage des protéines du RNM vers ces membranes puisque parmi les protéines GRA membranaires, seules GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9 possèdent des sites prédits de sumoylation. La O-glycosylation et/ou la phosphorylation pourraient également être impliquées dans le tropisme des protéines GRA pour les différentes membranes de la VP. En effet, parmi les protéines GRA, seules les protéines du RNM GRA2 (Zinecker *et al.*, 1998) et GRA4 (Achbarou *et al.*, 1991) ou GRA2 (Mercier and Sibley, non publié), GRA6 (Labruyère *et al.*, 1999) et GRA9 (Adjogble *et al.*, communication personnelle) ont été décrites comme étant O-glycosylées et/ou phosphorylées, respectivement. Dans cette étude, j'ai montré que GRA6, autre protéine du RNM, était elle aussi O-glycosylée. L'analyse des fractions d'éluion de la purification de GRA2-HA-FLAG par électrophorèse bidimensionnelle suggère que GRA2 pourrait porter jusqu'à trois O-glycanes différents et jusqu'à cinq résidus acides ou glycanes sulfatés. Ce profil devra être comparé avec celui de GRA2-HA-FLAG purifiée à partir de la fraction vacuolaire.

L'étude de l'implication des modifications post-traductionnelles sur le ciblage des protéines GRA vers les membranes du RNM pourra être complétée par la réalisation de mutations ponctuelles ou de délétions des résidus prédits pour être phosphorylés et/ou glycosylés, dans la séquence de ces protéines.

C. ASSOCIATION MEMBRANAIRE DE GRA2 ET FORMATION DU RNM

L'analyse du rôle des hélices alpha-amphipatiques de GRA2 *via* la construction de mutants de délétion de GRA2 a montré que i) l'hélice alpha-amphipatique α 3 de GRA2 associée aux domaines N- et C-Terminaux de la protéine est, comme α 1, suffisante pour assurer le recrutement postérieur et l'association de GRA2 aux vésicules qui vont former le réseau ; ii) l'association postérieure de GRA6 nécessite la présence de plus d'une hélice alpha-amphipatique et iii) la région hélicoïdale entière de GRA2 est indispensable pour la formation du RNM et l'organisation des parasites dans la vacuole. Cette étude a permis la création d'un modèle de l'insertion de GRA2 en surface des membranes (**Figure 60**).

L'étude de l'association de GRA2 aux lipides par « lipid overlays » a montré que GRA2 possède un domaine de liaison aux PIP, notamment au PI(4,5)P₂.

Ces données, associées aux résultats de P. Ruffiot (thèse de l'Université Joseph Fourier soutenue en juillet 2007) sur l'association de GRA2 aux SUVs et aux RNVs et à ceux d'A. Bittame (Master 2, 2007) qui a démontré la propriété tubulogénique de GRA2, ont permis l'élaboration d'un modèle de la formation du RNV induit par GRA2 et GRA6 (**Figures 67 et 68**).

Ces résultats ont donc apporté de nombreux éléments de réponse quant au problème de l'association membranaire de GRA2 et de la formation du RNV. Ils ouvrent d'intéressantes perspectives de poursuite d'étude des mécanismes de tubulation membranaire induits par GRA2 et GRA6.

1. Etude de la structure tridimensionnelle de GRA2 et GRA6

Le fait que la structure tridimensionnelle des protéines GRA2 et GRA6 ne soit pas connue constitue le facteur limitant de cette étude. Connaître la structure des protéines est un défi majeur pour les protéines membranaires et en particulier, pour celles qui contiennent des hélices alpha. En effet, si la Résonance Magnétique Nucléaire des protéines en micelles de détergent donne de bons résultats pour les protéines contenant des feuillets β , elle reste difficile pour les protéines contenant des hélices alpha hydrophobes. La cristallographie aux rayons X n'est pas d'avantage une solution du fait de la présence de détergent et de conformations protéiques différentes. Il reste néanmoins la solution de la microscopie électronique sur cristaux en deux dimensions des protéines purifiées en détergent et le dichroïsme circulaire (Matthews *et al.*, 2006).

Cependant, GRA2 est une petite protéine amphitropique. L'analyse de la structure secondaire et de l'état de repliement des protéines GRA2 purifiée sous forme native ou recombinante pourra être réalisée par dichroïsme circulaire. Les résultats seront complétés par une étude *in vivo* de l'accessibilité des acides aminés de GRA2, associée aux membranes des SUVs ou du RNV, à une protéolyse (trypsine), après perméabilisation sélective des membranes de la cellule hôte et de la MVP (Papakrivos *et al.*, 2005). Cette étude pourra également être étendue à GRA2 stockée dans le compartiment granulaire. Enfin, l'obtention de protéines recombinantes solubles dont la structure secondaire serait proche de celle des protéines natives devrait permettre d'envisager l'obtention de cristaux (résolution de la structure tridimensionnelle par diffraction aux rayons X) ou à défaut, la résolution de la structure par résonance magnétique nucléaire (Roosild *et al.*, 2005).

2. Mise en évidence des lipides partenaires de GRA2

Même s'ils montrent que GRA2 possède un domaine de fixation pour les PIP, les résultats préliminaires obtenus par « lipid overlays » ne permettent pas de conclure catégoriquement quant à une affinité sélective de GRA2 et plus généralement de GRA5, GRA6, GRA7 et GRA9 pour le PI(4,5)P₂. Il faudrait, pour ce faire, utiliser par exemple des SUVs formés à partir de lipides de composition lipidique définie. Si ces données sont confirmées, l'existence de ces lipides devra être recherchée dans la VP par

immunofluorescence. Des expériences de co-localisation du(des) lipide(s) partenaire(s) identifié(s) avec GRA2 pourront également être réalisées par microscopie confocale et pourront être étendues aux autres protéines GRA. Des expériences en gel natif devraient aussi permettre de confirmer la liaison de GRA2 à un lipide spécifique. En effet, lors de la liaison d'une protéine à des micelles de lipides, l'augmentation globale de sa charge négative lui permet de migrer plus rapidement vers l'anode (Mattila *et al.*, 2007). Enfin, l'affinité de GRA2 pour les lipides sera appréhendée par Résonance Plasmonique de Surface (RPS ou BIACore) dans laquelle le lipide identifié sera greffé sur une matrice hydrophobe alors que la protéine sera dans la phase mobile.

GRA2 reconnaît tous les PI mono-, di- et tri-phosphatés mais ne reconnaît ni le PA, ni le PI. Il est donc possible que la liaison de GRA2, sans doute *via* les charges positives des acides aminés dibasiques de ses hélices alpha-amphipatiques, aux phospholipides chargés négativement de la membrane, nécessite plus qu'une simple interaction entre charges positives et négatives. La distance des charges négatives au cœur hydrophobe de la membrane pourrait être un caractère important pour permettre leur reconnaissance par les charges positives de GRA2.

3. Détermination des paramètres de liaison de GRA2 aux SUVs

L'utilisation du système de membranes modèles que constitue les SUVs devrait permettre i) de déterminer la sensibilité de GRA2 à la courbure des membranes en utilisant des SUVs de diamètre différent (Drin *et al.*, 2007) ; ii) de réaliser des tests de liaison aux membranes en présence de différents composants pouvant influencer sur l'association des protéines aux membranes : 1) Ca^{2+} , dont le taux influence sur la conformation protéique (par exemple, l'annexine B12 (Fisher *et al.*, 2007) et 2) GTP : source d'énergie afin d'accentuer les phénomènes d'association et de tubulation et de tester si l'association membranaire de GRA2 est un processus spontané ou actif et consommateur d'énergie ; iii) de déterminer la topologie de GRA2 dans les membranes des SUVs en insérant une cystéine dans les régions hydrophiles. Selon l'exposition de cette cystéine à la surface de la vésicule, elle peut réagir avec le maléimide polyéthylène glycol (molécule de 5kDa imperméable aux membranes), ce qui modifie la migration électrophorétique de la protéine initiale (Le Gall *et al.*, 2004) et iv) de rechercher si l'association de GRA2 aux membranes favorise le recrutement de GRA6 ou d'autres protéines partenaires parmi les protéines GRA identifiées à ce jour.

4. Définition des domaines de liaison aux membranes.

Pour les protéines contenant une hélice alpha-amphipatique (BAR domain), ce sont deux acides aminés basiques consécutifs qui sont essentiels à la liaison des protéines aux membranes (Farsad and De Camilli, 2003). Des mutations ponctuelles introduites sur les acides aminés basiques consécutifs présents dans les hélices alpha-amphipatiques de GRA2 (R-K dans la première hélice et K-K dans seconde) pourraient

permettre d'identifier les acides aminés indispensables à la liaison de ces protéines aux liposomes. Cette approche devra bien sûr prendre en compte les résultats de structure obtenus grâce au dichroïsme circulaire ou aux digestions protéasiques partielles ainsi que les résultats de l'incubation des extraits parasitaires exprimant une forme tronquée de GRA2 sur les liposomes.

5. Caractérisation du processus de tubulation

L'analyse fine des tubules observés lors de l'incubation des SUVs avec GRA2 (courbure positive ou négative, diamètre des tubules...) sera réalisée par microscopie électronique et immunomarquage. Des cellules COS seront transfectées avec le gène de la protéine GRA2 puis l'effet tubulogénique direct de la protéine sera analysé par vidéo microscopie avec un co-marquage de l'actine cellulaire par exemple.

L'ensemble de ces expériences envisagées devrait permettre de rechercher si GRA2 exerce un effet tubulogénique direct ou si elle est un senseur de courbure agissant en partenariat avec une autre protéine, par exemple GRA6. Les résultats récents obtenus dans le laboratoire ont validé le fait que GRA2 est capable d'induire la tubulation de membranes *in vitro*. Il faudra néanmoins déterminer le mécanisme par lequel cette protéine induit la formation des tubules membranaires *in vivo*.

Dans le cas du pathogène intracellulaire *T. gondii*, la compréhension de ce mécanisme de tubulation devrait donc permettre de mieux comprendre la formation et le fonctionnement de la VP, compartiment d'interface avec la cellule hôte et support de la pathogénicité du parasite.

Les modèles d'étude de tubulation membranaire restent peu nombreux à l'heure actuelle ; ils font l'objet de nombreuses recherches car c'est par la connaissance des mécanismes de tubulation que seront appréhendés les phénomènes de compartimentalisation dans les cellules eucaryotes.

Enfin, à terme, l'idée est de résoudre la structure tridimensionnelle de GRA2. Il n'existe à l'heure actuelle, qu'une quarantaine de protéines membranaires non redondantes pour lesquelles la structure a été résolue (contre plus de 30,000 structures de protéines solubles). Toute résolution de nouvelle structure de protéine membranaire est donc toujours une avancée majeure dans la connaissance des interactions protéines-membranes. La singularité de GRA2 (petite protéine amphitropique) qui se comporte comme une protéine membranaire mais qui peut être produite sous forme recombinante devrait permettre de relever ce défi.

Matériel et Méthodes

MATERIEL ET METHODES

A. MATERIEL

1. Vecteurs de clonage :

a) • Clonage de produits PCR :

- TOPO TA cloning (*Invitrogen*).

b) • Vecteurs utilisés dans le cadre de l'expression ectopique de protéines chez *T. gondii* :

- vecteur pBluescript® II KS (*Stratagen*) ;
- vecteur portant l'ADNc de GRA2 (KS+/ cGRA2 (5' *Pst*I 3' *Sal*I) ; Mercier *et al.*, 1998a) ;
- vecteur portant le clone génomique de GRA5 (Lecordier *et al.*, 1993)
- vecteur portant le clone génomique de GRA6 (pUC18/ G1 *Pst*I ; Lecordier *et al.*, 1995) ;
- vecteur KS+/GRA2-bleo-GRA2 (8.9) permettant la réalisation du mutant Δ GRA2 dans la souche RH Δ HXGPRT (Mercier *et al.*, 1998b) ;
- vecteur SK-/ SAG1-bleo-SAG1/ cGRA2 HA9 (185) (Mercier *et al.*, 1998a) ;
- vecteur pTUB8myccGFPPfTailTy/dhfr-HXGPRT-dhfr porteur du gène de sélection HXGPRT : don de M. Lebrun (CNRS UMR 5539 – Université Montpellier II) ;
- vecteur KS+/ SAG1-bleo-SAG1/ cGRA2 HA9 Δ 96-116 (Mercier *et al.*, 1998a) ;
- vecteur pMAH4 issu d'une matrice pBluescript® II KS dans laquelle a été ajoutée la double étiquette HA-FLAG permettant de réaliser des fusions traductionnelles (Saksouk *et al.*, 2005) ;
- vecteur pMAH14 issu du vecteur pMAH4 dans lequel ont été ajoutés le promoteur fort de *GRA1* et le terminateur de *SAG1* ;
- vecteur pmini/HXGPRT porteur du gène de sélection HXGPRT : don de D. Roos (Donald *et al.*, 1996).

2. Les amorces et plasmides recombinants :

Les amorces (*Sigma Genosys*) utilisées pour les constructions des plasmides recombinants sont répertoriées dans le tableau 1, les vecteurs recombinants réalisés dans le tableau 2.

3. Souche bactérienne :

E. coli XL1 Blue : *recA1 endA1 gyrA46 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^f ZΔM15 Tn10 (Tet^R)*] (*Invitrogen*).

4. Souches de parasites :

- RH, ATCC-50174 (Frenkel, 1953) ;
- RH Δ HXGPRT (Donald *et al.*, 1996) ;
- Δ GRA6 (RH Δ HXGPRT) (Mercier *et al.*, 2002) ;
- Δ GRA2 Δ GRA6 (RH) (Mercier *et al.*, 2002) ;
- RH/GRA2-HA9 (Mercier *et al.*, 1998a) ;
- Δ GRA5 (RH Δ HXGPRT) (Mercier *et al.*, 2001).

5. Souches recombinantes parasitaires :

Toutes les souches parasitaires recombinantes réalisées sont répertoriées dans le tableau 3.

6. Souches cellulaires :

- HFF, Human Foreskin Fibroblasts, ATCC-CRL 1634 ;
- HeLa, Human Epithelial cells (adénocarcinome du col de l'utérus), ATCC-CCL 2 ;
- Hep-2, Epidermoid carcinoma cells (larynx humain), ATCC-CCL23
- VERO, cellules épithéliales normales de rein de singe vert d'Afrique, ATCC-CCL 81.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Site(s) de restriction situé(s) sur l'amorce
GRA2F8	F 5' ATCGGGATCCCGGTTTCCCAACGTGCATCC 3'	<i>Bam</i> HI
GRA2F9	F 5' ATCGAGCTCGTTCGTGCGAAAAGG 3'	<i>Sac</i> I
GRA2F11	F 5' GACGGATCCGTTTCGTGCGAAAAGG 3'	<i>Bam</i> HI
GRA2F14	F 5' GACAAGCTTGTTCGTGCGAAAAGG 3'	<i>Hind</i> III
GRA2F18	F 5' ATCACCOCGGGTTGCGCCGTAAAACATTGTTTGCTGG 3'	<i>Sma</i> I
GRA2F20	F 5' ATCAAGCTTCTACGACGAAAAGTGATGCGCAG 3'	<i>Hind</i> III
GRA2F22	F 5' ATCGGGATCCACGGTTAGGGGTTTCAAGGTG 3'	<i>Bam</i> HI
GRA2F24	F 5' ATAGGCTAGCATGGTGACCGTTGGCAAG 3'	<i>Nhe</i> I
GRA2R9	R 5' TGATGGATCCGGAAAACCTCGGCAGCCCTC 3'	<i>Bam</i> HI
GRA2R10	R 5' AGTAAAGCTTGCTAGCCTGCGAAAAGTCTGGGACGGGCAC 3'	<i>Hind</i> III - <i>Nhe</i> I
GRA2R11	R 5' TATAGCTAGCCTTGCCAACGGTCCACCATGCCCC 3'	<i>Nhe</i> I
GRA2R14	R 5' GCAGGTACCGTGCAGTGGAACTACGGTG 3'	<i>Kpn</i> I
GRA2R16	R 5' ACGTCTAGAGTGCAGTGGAACTACGGTG 3'	<i>Xba</i> I
GRA2R17	R 5' TCGGCTAGCGTGCCTTTTTGCCGCGGTGAAG 3'	<i>Nhe</i> I
GRA2R20	R 5' TACGAATTCCTGCGAAAAGTCTGGGACG 3'	<i>Eco</i> RI
GRA2R21	R 5' CATAGCTAGCTTTTGCCGCGGTGAAGCC 3'	<i>Nhe</i> I
GRA6F18	F 5' GTCGGATCCCGTCCGACTGGTCTAGGTGAACG 3'	<i>Bam</i> HI
GRA6F19	F 5' TAGAAGCTTAAACAGGGGGTCTATGCGCC 3'	<i>Hind</i> III
GRA6F23	F 5' ATCACCOCGGGACACACGGTGGCATCCATCTGAGG 3'	<i>Sma</i> I
GRA6R13	R 5' ATCGAATTCATAATCAAACACATTACACGTTCCG 3'	<i>Eco</i> RI
GRA6R14	R 5' CAGGGTACCTGCGCGGCCAAACCCACGAAAC 3'	<i>Kpn</i> I
pcGRA7-1	F 5' CGGGATCCCTGCGGCGTCTCATTTCCAAATG 3'	<i>Bam</i> HI
pcGRA7-2	R 5' CCGGAATTCCTGGCGGGCATCCTCCCATC 3'	<i>Eco</i> RI
GRA5HF1	F 5' CGGGATCCTGGTTCTCTACAGTTGCAA 3'	<i>Bam</i> HI
GRA5HF2	R 5' TCCCCCGGGAGACGCCATTTTGTTACTTCAC 3'	<i>Sma</i> I
GRA5HF3	F 5' CCCGCTCGAGGGGGCACTGTGTTGCTCG 3'	<i>Xho</i> I
GRA5HF4	R 5' GGGGTACCGCGCCTTGTGTGCGAATCA 3'	<i>Kpn</i> I
GRA5HF5	F 5' TCCCCCGGGTAAAAGCGGTCGTTGTGG 3'	<i>Sma</i> I
GRA5HF6	R 5' CGGAATTCCTCTTCTCGGCAACTTCTT 3'	<i>Eco</i> RI
GRA3-PCR5-PstI	F 5' CTGCAGTGCTGAAACATCGC 3'	<i>Pst</i> I
GRA3-PCR3-EcoRI	R 5' GAATTCCTTCTTGGAGGCTTGTCCAC 3'	<i>Eco</i> RI

Tableau 1 : Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées pour les clonages (cf. Tableau 2) des plasmides utilisés dans le cadre des deux axes majeurs de recherche :

- Rôle des différentes hélices alpha-amphipatiques de GRA2
- Etude du comportement soluble / hydrophobe des protéines GRA

Les sites de restriction introduits dans la séquence pour faciliter les clonages sont en bleu ou en rose.
 F : Forward, Sens ;
 R : Reverse, Anti-sens.

Protéine recombinante exprimée chez <i>T. gondii</i>	Plasmide recombinant	Taille du plasmide recombinant en Kb	Vecteur initial	Fragment enlevé	Taille en pb du fragment enlevé	Enzymes de restriction utilisées pour le clonage		
-	SK-/ GRA2 HA9	5.14	SK-/ SAG1-bleo-SAG1/ cGRA2-HA9 (185)	SAG1-bleo-SAG1	1510	BamHI et HindIII + Klenow		
Protéine recombinante exprimée chez <i>T. gondii</i>	Plasmide recombinant	Taille du plasmide recombinant en Kb	Insert cloné	Taille en pb de l'insert cloné	Amorces permettant l'amplification de l'insert	Matrice utilisée pour l'amplification de l'insert/ vecteur d'origine de l'insert	Vecteur de clonage de l'insert	Enzymes de restriction utilisées pour le clonage
NT- α 1 α 2	SK-/ GRA2 (PS-NT-2H) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	6.04	5' GRA2+ GRA2 (PS-NT-2H)	923	GRA2F14 et GRA2R17	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	SK-/ GRA2 (PS-NT- α 3-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	HindIII et NheI
NT- α 1 α 2 α 3	SK-/ GRA2 (PS-NT-3H+6) HA9	4.15	5' GRA2+ GRA2 (PS-NT-3H+6)	790	GRA2F9 et GRA2R11	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	SK-/ GRA2 HA9	SacI et NheI
α 1 α 2 α 3-CT (stratégie 1)	1) KS+/ 5' GRA2/ GRA2 (PS+5)	3.14	5' GRA2+ GRA2 (PS+5)	450	GRA2F9 et GRA2R9	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	pKS	SacI et BamHI
	2) KS+/ 5' GRA2/ GRA2 (PS+5-3H-CT)	3.7	GRA2 (3H-CT)	375	GRA2F8 et GRA2R10	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	KS+/ 5' GRA2/ GRA2 (PS+5)	BamHI et HindIII
	3) SK-/ GRA2 (PS+5-3H-CT) HA9	4.18	5' GRA2+ GRA2 (PS+5-3H-CT)	825			SK-/ GRA2 HA9	SacI et NheI
α 1 α 2 α 3-CT (stratégie 2)	SK-/ GRA2 (PS+5-3H-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	6.0	5' GRA2+ GRA2 (PS+5-3H-CT)+ HA9+ 3' GRA2	1197	GRA2F14 et GRA2R16	SK-/ GRA2 (PS+5-3H-CT) HA9	pTUB8myccGFPPTail Ty/ dhfr-HXGPRT-dhfr	HindIII et XbaI
α 1 α 2	SK-/ GRA2 (PS+5- α 1 α 2) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	5.8	GRA2 (α 1 α 2)	80	GRA2F8 et GRA2R21	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	SK-/ GRA2 (PS+5-3H-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	BamHI et NheI
α 1 α 2-CT	SK-/ GRA2 (PS+5- α 1 α 2-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	6.0	GRA2 (CT)	160	GRA2F24 et GRA2R10	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	SK-/ GRA2 (PS+5- α 1 α 2) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	NheI
α 3-CT	SK-/ GRA2 (PS+5- α 3-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	5.92	GRA2 (α 3CT)	200	GRA2F22 et GRA2R10	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	SK-/ GRA2 (PS+5-3H-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	BamHI et NheI

Tableau 2 : Plasmides recombinants réalisés dans le cadre des deux axes majeurs de recherche :

 Rôle des différentes hélices alpha-amphipatiques de GRA2

 Etude du comportement soluble / hydrophobe des protéines GRA

Protéine recombinante exprimée chez <i>T. gondii</i>	Plasmide recombinant	Taille du plasmide recombinant en Kb	Insert cloné	Taille en pb de l'insert cloné	Amorces permettant l'amplification de l'insert	Matrice utilisée pour l'amplification de l'insert/ vecteur d'origine de l'insert	Vecteur de clonage de l'insert	Enzymes de restriction utilisées pour le clonage
NT- α 3-CT	SK-/ GRA2 (PS-NT- α 3-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	5.95	5'GRA2+GRA2 (PS- α 3-CT)+ HA9+ 3'GRA2	1670	GRA2F14 et GRA2R16	KS+/ SAG1-bleo-SAG1/ GRA2 HA9 Δ 96-116	pTUB8myccGFPPTail Ty/ dhfr-HXGPRT-dhfr	HindIII et XbaI
NT-CT	SK-/ GRA2 (PS-NT-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	5.9	GRA2 (CT)	160	GRA2F24 et GRA2R10	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	SK-/ GRA2 (PS-NT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	NheI
GRA2-HA-FLAG	1) KS+/5'GRA2/ GRA2 (HA-FLAG) 2) KS+/5'GRA2/ GRA2 (HA-FLAG)/ 3'GRA2	3.89	5'GRA2+CDGRA2	880	GRA2F11 et GRA2R20	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	pMAH4	BamHI et EcoRI
CDGRA2-HA-FLAG	KS+/5'GRA1/ CDGRA2-HA-FLAG/ 3'SAG1	4.25	3'GRA2	400	GRA2F20 et GRA2R14	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	KS+/ 5'GRA2/ GRA2 (HA-FLAG)	HindIII et KpnI
GRA3-HA-FLAG	1) KS+/5'GRA3/ GRA3 (HA-FLAG) 2) KS+/5'GRA3/ GRA3 (HA-FLAG)/ 3'SAG1	4.7	CDGRA2	530	GRA2F18 et GRA2R20	KS+/ cGRA2 (5' PstI 3' Sall)	pMAH14	SmaI et EcoRI
GRA5-HA-FLAG	1) KS+/5'GRA5/ GRA5 (ATG+2AA)-HA-FLAG 2) KS+/ 5'GRA5/ GRA5-HA-FLAG	5.43	5'GRA3+CDGRA3	2424	GRA3-PCR5-PstI et GRA3-PCR3-EcoRI	ADN génomique <i>T. gondii</i>	pMAH4	PstI et EcoRI
GRA6-HA-FLAG	1) KS+/5'GRA6/ GRA6 (HA-FLAG) 2) KS+/5'GRA6/ GRA6 (HA-FLAG)/ 3'GRA6	3.93	5'GRA5+ GRA5 (ATG-2AA)	900	GRA5HF1 et GRA5HF2	pMAH14	KS+/ 5'GRA3/ GRA3 (HA-FLAG)	XhoI et KpnI
GRA7-HA-FLAG	1) KS+/5'GRA7/ GRA7 (HA-FLAG) 2) KS+/5'GRA7/ GRA7 (HA-FLAG)/ 3'GRA7	4.29	CDGRA5	360	GRA5HF5 et GRA5HF6	Clone génomique GRA5	pMAH4	BamHI et SmaI
GRA8-HA-FLAG	1) KS+/5'GRA8/ GRA8 (HA-FLAG) 2) KS+/5'GRA8/ GRA8 (HA-FLAG)/ 3'GRA8	4.67	3'GRA5	375	GRA5HF3 et GRA5HF4	Clone génomique GRA5	KS+/ 5'GRA5/ GRA5(ATG+2AA)-HA-FLAG	SmaI et EcoRI
CDGRA6-HA-FLAG	KS+/5'GRA1/ CDGRA6-HA-FLAG/ 3'SAG1	4.12	5'GRA6+CDGRA6	1113	GRA6F18 et GRA6R13	Clone génomique GRA5	KS+/ 5'GRA5/ GRA5-HA-FLAG	XhoI et KpnI
GRA7-HA-FLAG	KS+/ 5'GRA1/ GRA7-HA-FLAG/ 3'SAG1	5.02	3'GRA6	770	GRA6F19 et GRA6R14	Clone génomique GRA6	pMAH4	BamHI et EcoRI
GRA7-HA-FLAG	Sequence kozak GRA7+ CDGRA7	4.9	CDGRA6	700	GRA6F23 et GRA6R13	Clone génomique GRA6	KS+/ 5'GRA6/ GRA6 (HA-FLAG)	HindIII et KpnI
GRA7-HA-FLAG		4.9		708	pcGRA7-1 et pcGRA7-2	ARN <i>T. gondii</i>	pMAH14	SmaI et EcoRI
								BamHI et EcoRI

Tableau 2 (suite) : Plasmides recombinants réalisés dans le cadre des deux axes majeurs de recherche :

■ Rôle des différentes hélices alpha-amphipatiques de GRA2

■ Etude du comportement soluble / hydrophobe des protéines GRA

Protéine annulée chez <i>T. gondii</i>	Souche recombinante de toxoplasmes	Plasmide transfecté	Souche parasitaire transfectée	Co-transfection	Sélection	Clone
GRA2	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	KS+/GRA2-bleo-GRA2 (8.9)	RH ΔHXGPRT	-	Bleo	A29
Protéine recombinante exprimée chez <i>T. gondii</i>	Souche recombinante de toxoplasmes	Plasmide transfecté	Souche parasitaire transfectée	Co-transfection	Sélection	Clone
NT-α1α2	ΔGRA2 (RH) / GRA2 (PS-NT-2H) HA9	SK-/GRA2 (PS-NT-2H) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	-	HXGPRT	T5
NT-α1α2α3	ΔGRA2 (RH) / GRA2 (PS-NT-3H+6) HA9	SK-/GRA2 (PS-NT-3H+6) HA9	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	pmini/HXGPRT	HXGPRT	E11
α1α2α3-CT	ΔGRA2 (RH) / GRA2 (PS+5-3H-CT) HA9	1) SK-/GRA2 (PS+5-3H-CT) HA9 2) SK-/GRA2 (PS+5-3H-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	pmini/HXGPRT	HXGPRT HXGPRT	G3 E3/N4
α1α2	ΔGRA2 (RH) / GRA2 (PS+5-α1α2) HA9	SK-/GRA2 (PS+5-α1α2) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	-	HXGPRT	F11
α1α2-CT	ΔGRA2 (RH) / GRA2 (PS+5-α1α2-CT) HA9	SK-/GRA2 (PS+5-α1α2-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	-	HXGPRT	D14
α3-CT	ΔGRA2 (RH) / GRA2 (PS+5-α3-CT) HA9	SK-/GRA2 (PS+5-α3-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	-	HXGPRT	C3
NT-α3-CT	ΔGRA2 (RH) / GRA2 (PS+5-NT-α3-CT) HA9	SK-/GRA2 (PS-NT-α3-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	-	HXGPRT	G8
NT-CT	ΔGRA2 (RH) / GRA2 (PS-NT-CT) HA9	SK-/GRA2 (PS-NT-CT) HA9/ dhfr-HXGPRT-dhfr	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	-	HXGPRT	A2
GRA2-HA-FLAG	ΔGRA2 (RH) / GRA2-HA-FLAG	KS+/5GRA2/GRA2 (HA-FLAG)/ 3'SAG1	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	pmini/HXGPRT	HXGPRT	R8
CDGRA2-HA-FLAG	ΔGRA2 (RH) / CDGRA2-HA-FLAG	KS+/5GRA1/CDGRA2-HA-FLAG/ 3'SAG1	ΔGRA2 (RH) ΔHXGPRT	pmini/HXGPRT	HXGPRT	I2
GRA3-HA-FLAG	RH / GRA3-HA-FLAG	KS+/5GRA3/ GRA3 (HA-FLAG)/ 3'SAG1	RH ΔHXGPRT	pmini/HXGPRT	HXGPRT	-
GRA5-HA-FLAG	ΔGRA5 (RH) / GRA5-HA-FLAG	KS+/5GRA5/ GRA5-HA-FLAG/ 3'SAG1	ΔGRA5 (RH) ΔHXGPRT	pmini/HXGPRT	HXGPRT	58
GRA6-HA-FLAG	ΔGRA6 (RH) / GRA6-HA-FLAG	KS+/5GRA6/ GRA6 (HA-FLAG)/ 3'SAG1	ΔGRA6 (RH) ΔHXGPRT	pmini/HXGPRT	HXGPRT	Q10
CDGRA5-HA-FLAG	ΔGRA6 (RH) / CDGRA6-HA-FLAG	KS+/5GRA1/CDGRA6-HA-FLAG/ 3'SAG1	ΔGRA6 (RH) ΔHXGPRT	pmini/HXGPRT	HXGPRT	-
GRA7-HA-FLAG	RH / GRA7-HA-FLAG	KS+/5GRA1/ GRA7-HA-FLAG/ 3'SAG1	RH ΔHXGPRT	pmini/HXGPRT	HXGPRT	1

Tableau 3 : Souches recombinantes parasitaires construites dans le cadre des deux axes majeurs de recherche :

-  Rôle des différents domaines de GRA2
-  Purification de GRA2 et recherche de ses partenaires protéiques

Protéine ou motif	Anticorps primaires	Poids moléculaire en kDa	Poids moléculaire apparent en kDa	Dilution IF	Dilution Immunoblot	Dilution IP	Référence et provenance
GRA1	Monoclonal de souris TG17-43	23	27	1/500	1/15000	-	Charif <i>et al.</i> , 1990 (labo)
	- Monoclonal de souris TG17-179			1/500	1/15000	1/100	Charif <i>et al.</i> , 1990 (labo)
GRA2	- Sérum de lapin anti GRA2-HIS	28	28	1/500	1/10000	1/50	L.D. Sibley : Sibley <i>et al.</i> , 1995
GRA3	- Monoclonal de souris TG2H11	30	30	1/500	1/10000	-	J.F. Dubremetz : Achbarou <i>et al.</i> , 1991
GRA4	- Sérum de lapin anti-GRA4-HIS	40/41	40	1/500	1/10000	-	L.D. Sibley : Labruyère <i>et al.</i> , 1999
GRA5	Monoclonal de souris TG17-113 - Monoclonal de souris 8B5	21	21	1/500	1/5000	-	Charif <i>et al.</i> , 1990 (labo)
GRA6	- Sérum de lapin anti-HIS-GRA6	32	32	1/500	1/10000	1/50	L.D. Sibley : Labruyère <i>et al.</i> , 1999
GRA7	Monoclonal de souris BATO 214	29	29	1/500	1/10000	-	<i>Innogenetics</i> Saavedra <i>et al.</i> , 1990
GRA9	Sérum de lapin anti-HIS-GRA9	41	41	1/500	1/2500	-	W. Daubener : Nockemann <i>et al.</i> , 1998
SAG1	- Monoclonal de souris TG054 - Monoclonal de rat Octopus	30	30	1/500 -	1/5000 1/1000	- -	Rodriguez <i>et al.</i> , 1985 (labo) Darcy <i>et al.</i> , 1992
Actine	Sérum de lapin anti-GST-Actine de <i>T. gondii</i>	45	45	1/500	1/10000	-	L.D. Sibley : Dobrowolski and Sibley, 1996
GST	Sérum de souris anti-GST DD229	28	28	-	1/100	-	(labo)
HSP90	Sérum de lapin anti-HSP90	81.9	97	1/500	1/1000	-	S.O. Angel : Rojas <i>et al.</i> , 2000
HA9	- Monoclonal de rat 3F10 - Sérum de lapin anti-HA11 - Sérum de lapin anti-HA11	-	-	1/500 1/500 1/1000	X 1/1000 1/3000	1/20 1/20 1/100	Roche Covance (labo)

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés lors d'expériences d'immunofluorescence (IF), d'immunoblot ou d'immunoprécipitation (IP) (labo), anticorps produits dans par le laboratoire.

Anticorps secondaires	Dilution IF	Dilution Immunoblot	Provenance
Bodipy® FL - sérum de chèvre anti-IgG de souris (H+L)	1/500	X	Molecular Probes
Bodipy® FL - sérum de chèvre anti-IgG de lapin (H+L)	1/500	X	Molecular Probes
Texas Red® - sérum de chèvre anti-IgG de souris (H+L)	1/500	X	Molecular Probes
Texas Red® - sérum de chèvre anti-IgG de lapin (H+L)	1/500	X	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488 - sérum de chèvre anti-IgG (H+L) de souris	1/1000	X	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488 - sérum de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin	1/1000	X	Molecular Probes
Alexa Fluor® 594 - sérum de chèvre anti-IgG (H+L) de souris	1/1000	X	Molecular Probes
Alexa Fluor® 568 - sérum de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin	1/1000	X	Molecular Probes
Sérum de chèvre anti-IgG de souris (H+L) - peroxydase	X	1/10000	Jackson Immuno Research
Sérum de chèvre anti-IgG de lapin (H+L) - peroxydase	X	1/15000	Jackson Immuno Research
Sérum d'âne anti-IgG (H+L) de chèvre - peroxydase	X	1/1500	Interchim

Tableau 4 (suite) : Liste des anticorps secondaires utilisés lors d'expériences d'immunofluorescence (IF), d'immunoblot ou d'immunoprécipitation (IP)

7. Anticorps :

Les anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence, d'immunoblot et d'immunoprécipitation sont répertoriés dans le tableau 4.

8. Protéines recombinantes produites par des bactéries *E. coli* BL21 transformées par les plasmides correspondants :

- GST issue du plasmide pGEX 3X (*Pharmacia*) ;
- GRA1-GST (AA 40-190) issue du plasmide pGEX 3X/ GRA1 (150) *Nael Pvull* (*Lecordier et al.*, 2000),
- GRA2-GST (AA 14-185) issue du plasmide pGEX 3X/ GRA2 (185) *Hpal Narl* (*Mercier et al.*, non publié) ;
- GRA6-GST (AA 50-229) issue du plasmide pGEX 3X/ GRA6 (179) Insert 13 (*Lecordier et al.*, non publiée) ;
- GRA9-HIS, don de D. K. Z. Adjogble (Heinrich Heine University, Dusseldorf, Allemagne)

B. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. Conditions de culture et de stockage des bactéries :

Les bactéries sont cultivées à 37°C en milieu liquide de Luria Broth (LB) pH 7.2 (1 % Bactotryptone, 0.5 % Extrait de Levure et 170 mM NaCl) ou solide LBA (1.5 % Agar ajouté au milieu LB), additionnés de 50 µg/ml Ampicilline et 15 µg/ml Tétracycline ou 40 µg/ml Kanamycine. Elles sont stockées dans 20 % de glycérol à -80°C.

2. Préparation de bactéries compétentes :

500 ml de culture bactérienne à DO (600 nm) 0.5/0.6 sont incubées sur glace 15 min puis centrifugées 15 min à 4°C à 1 000 g (3 000 rpm). Le culot est dispersé dans 50 ml de solution RF1 pH 5.8 stérile (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Acétate de Potassium, 10 mM CaCl₂ et 15 % Glycérol) puis laissé 15 min sur glace avant d'être centrifugé comme précédemment. Le culot bactérien est ensuite dispersé dans 20 ml de

solution RF2 pH 6.8 stérile (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ et 15 % Glycérol). Les fractions aliquotes sont directement congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

3. PCR (Polymerase Chain Reaction) et RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) :

Les vecteurs plasmidiques utilisés comme matrices lors des réactions de PCR sont amplifiés et purifiés à l'aide des kits Nucleobond® PC500 ou PC100 (*Macherey-Nagel*). L'ADN génomique de tachyzoïtes est extrait à l'aide du kit NucleoSpin® Tissue kit (*Macherey-Nagel*). Les ARN totaux de tachyzoïtes sont extraits après lyse d'un culot parasite dans 20 mM Tris pH 8, 500 mM KCl et 0.5 % NP40, extraction au phénol/chloroforme et élimination de l'ADN à l'aide du kit ARN Free™ (*Ambion*).

La réaction de RT-PCR permettant l'amplification de CGDRA7 est réalisée à partir d'une réaction de transcription réverse des ARN totaux de tachyzoïtes en ADNc suivie d'une PCR classique. La transcription reverse a lieu à 42°C pendant 50 min et nécessite 1 µg d'ARN totaux de tachyzoïtes et 0.5 µM d'amorce pcGRA7-2, dénaturés au préalable 10 min à 70°C, ainsi que 500 µM d'un mélange de désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dCTP et GDTP, 100 mM *Fermentas*), 10 mM de DTT, 1 unité d'enzyme reverse transcriptase SuperScript™ RNase H- et 4 µl de son tampon 5X (*Invitrogen*), dans un volume final de 20 µl. Le mélange est ensuite incubé 15 min à 70°C afin de dénaturer l'enzyme, puis 30 min à 37°C avec 250 µg/ml de RNase. Les ADNc issus de cette transcription réverse sont ensuite amplifiés par PCR.

Les réactions de PCR sont réalisées sur le thermocycleur T3 (*Biometra*), à partir de 25 ng d'ADN matrice, 1 µM d'amorces oligonucléotidiques (*Sigma Genosys*), 400 µM d'un mélange de désoxyribonucléotides (*Fermentas*), 1 unité d'enzyme TAQ DNA polymérase DyNAzyme EXT™ et 10 µl de son tampon 10X (*Finnzyme*), en présence de 1.5 mM de MgCl₂ dans un volume final de 100 µl. Après une dénaturation de 5 min à 94°C, 30 cycles d'amplification sont réalisés. Ces cycles comportent successivement une étape de dénaturation (30 s à 94°C), une étape d'appariement (1 min à une température inférieure de 5°C au T_m le plus bas des deux amorces), puis une étape d'élongation (1 min 15 s à 72°C) avant une élongation finale de 5 min à 72°C.

Les fragments amplifiés sont isolés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en tampon TBE (Tris-HCl 89 mM pH 7.9, H₃BO₃ 89 mM, EDTA 0.2 mM) (tampon de charge 4X de l'ADN : 25 % de xylène cyanol, 5 mM Tris pH 7.6, 6 % glycérol) à l'aide du marqueur de poids moléculaire 1 Kb DNA Ladder™ (*Invitrogen*).

Les fragments amplifiés sont extraits du gel d'agarose à l'aide du kit NucleoSpin® Extract II (*Macherey-Nagel*) et élués dans 30 µl de TE (50 mM Tris pH 8, 0.5 mM EDTA).

4. Clonages dans le vecteur TOPO® :

Les produits PCR sont clonés dans le vecteur TOPO® du kit TA cloning (*Invitrogen*) (0.4 µl de produit PCR avec 1 µl de solution salée et 1 µl de vecteur TOPO®). Les produits issus du clonage dans le vecteur TOPO® sont transformés par choc thermique (45 s à 43°C) dans les bactéries *E. coli* XL1Blue compétentes.

Les clones bactériens apparus après une nuit de culture sur LB-ampicilline (100 µg/ml) ou LB-Kanamycine (40 µg/ml), X-Gal 5 % et IPTG 4 mM sont sélectionnés selon la méthode blanc-bleu : les bactéries contenant les plasmides ayant intégré le produit PCR sont blanches alors que les bactéries contenant le vecteur TOPO® sauvage sont bleues. En effet, le site de clonage du vecteur se situe dans le gène *LacZ* qui code pour la β-Galactosidase (enzyme qui génère un produit bleu à partir du substrat X-Gal et de l'inducteur IPTG). L'insertion d'un fragment au niveau du site perturbe l'expression du gène *LacZ* et par conséquent, l'expression de la β-Galactosidase : les colonies restent blanches.

5. Mini préparation plasmidique par lyse alcaline :

Les vecteurs TOPO® ayant intégré le produit PCR et issus des différentes colonies blanches sélectionnées sont isolés par mini préparation plasmidique par lyse alcaline après amplification.

Le culot bactérien de 1.5 ml de culture est dispersé dans 200 µl de solution I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 10µg/µl RNaseA). Les bactéries sont lysées par l'ajout de 200 µl de solution II (0.2 N NaOH, 1 % SDS). La solution est neutralisée et les protéines et l'ADN génomique bactérien précipités par l'ajout de 175 µl de solution III (3 M Acétate de potassium KOAc, 11% Acide Acétique glacial). Les précipités sont séparés du surnageant contenant les plasmides par centrifugation 10 min à 17 000 g (13 000 rpm) à 4°C. Les ADN plasmidiques sont précipités par l'ajout de 2 volumes d'éthanol pur froid et isolés après centrifugation avant d'être dispersés dans 30 µl d'eau.

6. Digestion totale de l'ADN plasmidique :

Les vecteurs TOPO® ayant intégré le produit PCR ainsi que le vecteur dans lequel sera cloné le produit PCR sont digérés par les enzymes de restriction (*Fermentas, Biolabs*) qui permettent la libération du produit PCR et l'ouverture du vecteur. La digestion par la première enzyme de restriction est réalisée à l'aide d'une unité d'enzyme ajoutée toutes les heures pendant 2 à 3 heures, dans un volume réactionnel final de 40 µl. L'ADN plasmidique est ensuite précipité par l'ajout de 300 mM d'acétate de sodium pH 5.2 et de 2 volumes d'éthanol pur froid, isolé par centrifugation et suspendu dans de l'eau avant d'être digéré par la seconde enzyme de restriction.

Afin de réaliser le vecteur SK-/ GRA2-HA9, la digestion du vecteur SK-/ SAG1-bleo-SAG1/ cGRA2-HA9 (185) par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Hind*III a été suivie d'un traitement par l'enzyme de modification Klenow Fragment (*Fermentas*) 30 min à 37 °C.

Les différents fragments d'ADN (inserts PCR et vecteur digérés) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (de 0.6 à 2 % selon la taille du fragment) en tampon TBE puis extraits du gel à l'aide du kit NucleoSpin® Extract II (*Macherey-Nagel*) et dispersés dans 35 µl de TE.

7. Ligation du vecteur et de l'insert PCR digérés et purifiés :

50-400 ng de vecteur digéré purifié (1 µl) sont mis en présence d'un excès d'insert digéré purifié (0.1-1 µg ou 16 µl), avec 2 µl du tampon de ligation 10X (300 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) et 1 unité de T4-DNA ligase (*Fermentas*) dans un volume final de 20 µl. Le mélange est incubé à 16°C pendant une nuit avant d'être transformé par choc thermique dans des bactéries *E. coli* XL1Blue compétentes.

Les bactéries possédant le plasmide recombinant sont sélectionnées par l'ajout d'antibiotique (Ampicilline 100 µg/µl ou Kanamycine 40 µg/µl). Le clonage est vérifié par PCR sur colonies. Après amplification et purification à l'aide du kit Nucleobond® PC500 ou PC100 (*Macherey-Nagel*), l'insert cloné est enfin séquencé (*Genome Express*) pour vérifier que la Taq polymérase n'a pas introduit de mutations dans la séquence clonée.

C. METHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

1. Culture et stockage des tapis cellulaires et des parasites :

Les parasites sont amplifiés par infections de cellules humaines adhérentes HFF, VERO, HeLa et Hep2 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 (DMEM) (*Gibco*), additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (*Bio West*), 2 mM de Glutamine (*Euromedex*), 50 U/ml de Pénicilline et de 50 µg/µl de Streptomycine (*Dutscher*).

En vue de sa congélation, le tapis cellulaire infecté ou non est décollé par 20 % de trypsine dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) (*Gibco*). Les cellules sont congelées en D10, 20 % SVF et 10 % de DMSO, à -80°C puis dans l'azote liquide.

2. Marquage métabolique de parasites sauvages par la Glucosamine H³ :

Des cellules VERO infectées par des parasites sauvages de la souche RH sont lavées en PBS avant d'être incubées 2 h à 37°C dans du DMEM sans glucose additionné de 22 mM de Pyruvate de Sodium et 2 mM de Glutamine. Les cellules infectées sont ensuite incubées sur la nuit à 37°C dans du DMEM sans glucose additionné de 22 mM de Pyruvate de Sodium, 2 mM de Glutamine et 40 µCi/ml de [H³]-Glucosamine ([6-³H] Glucosamine Hydrochloride, 26 Ci/mmol, *Amersham*). Les cellules infectées et radiomarquées sont décollées mécaniquement à l'aide d'un grattoir. Après 10 min centrifugation à 700 g (2400 rpm) à 4°C, les cellules infectées sont cassées par seringage à travers des aiguilles d'un diamètre de 20 g, 23 g puis de 26 g. Les débris cellulaires sont filtrés sur laine de verre et les parasites sont récupérés avant d'être lysés.

3. Transfection de toxoplasmes, sélection et clonage des parasites recombinants :

La transfection est réalisée dans les parasites extracellulaires lavés et repris à 6.25×10^7 parasites/ml dans du cytomix pH 7.6 (10 mM KPO₄ pH 7.6, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 25 mM Hepes, 2 mM EDTA). 5×10^7 tachyzoïtes sont mis en présence de 75 µg d'ADN plasmidique recombinant contenant le gène à exprimer et éventuellement 2 à 3 µg de vecteur contenant le gène de résistance *HXGPRT* ou *Bleo*. Les parasites sont électroporés à 2 000 V, 24 ohms, 50 µF, à l'aide de l'électroporateur ECM 630 (*BTX*) puis mis en culture pendant deux jours sur un tapis de HFF.

Les parasites ayant intégré le plasmide d'intérêt sont sélectionnés à l'aide du marqueur de sélection transfecté :

- Marqueur de sélection positive *HXGPRT*, apporté par co-transfection du vecteur pmini/*HXGPRT* ou par transfection des plasmides recombinants issus du clonage des formes tronquées de GRA2 dans le vecteur pTUB8myccGFPPTailTy/dhfr-*HXGPRT*-dhfr. La sélection a lieu par l'ajout de 25 µg/ml d'Acide Mycophénolique et 50 µg/ml de Xanthine dans les cultures, à chaque passage, pendant environ 15 jours. L'Acide Mycophénolique ajouté dans le milieu de culture bloque la seule voie de synthèse disponible des purines chez les toxoplasmes Δ *HXGPRT*. Par contre, les parasites intégrant le gène *HXGPRT* survivent à l'Acide Mycophénolique en synthétisant leurs purines à partir de Xanthine ajoutée au milieu de culture (Donald *et al.*, 1996).

- Marqueur de sélection positive *Bleo*, apporté par la transfection du plasmide recombinant KS+/GRA2-bleo-GRA2 (8.9). La sélection est réalisée lors du traitement des parasites extracellulaires repris à 10^7 toxoplasmes/ml dans 5 µg/ml de Phléomycine. Cette sélection nécessite trois traitements (le premier de 4 h, les deux autres de 2 h) appliqués lors de trois passages successifs qui s'échelonnent sur 2 à 3 semaines environ. Le gène *Bleo*, issu du transposon 5 bactérien, apporte une résistance contre la Phléomycine qui est un intercalant létal de l'ADN (Messina *et al.*, 1995).

Après la sélection, les parasites sont clonés par dilution limite (un parasite par puits, dans des plaques de 96 puits contenant des cellules HFF confluentes). Les plaques sont incubées pendant 5 jours puis observées au faible grossissement (x2.5) de façon à sélectionner les puits où une seule plage de lyse s'est développée. Les clones sont transférés en plaques de 24 puits après 7 jours de prolifération et testés par immunofluorescence.

4. Immunofluorescence indirecte (IF) :

Les IF sont réalisées sur cellules HFF infectées, cultivées jusqu'à confluence sur des lamelles de verre, en plaques de 24 puits. Après fixation des cellules par le Formaldéhyde 4 %, les cellules sont perméabilisées à l'aide d'une solution de Triton X-100 0.1 % (perméabilisation totale de la cellule infectée) ou de saponine 0.002 % (perméabilisation de la membrane de la cellule hôte et de la membrane vacuolaire). L'effet de la saponine étant réversible, elle doit être maintenue à chaque étape de l'IF. Les lamelles sont incubées dans une solution de saturation contenant 5 % de SVF et 5 % de Sérum de chèvre (*Abcys*). La protéine recherchée est détectée par incubation des lamelles avec un anticorps primaire spécifique puis avec un anticorps secondaire (cf Tableau 3), tous deux dilués dans 1 % de SVF. Les lamelles sont montées sur lame à l'aide du kit Prolong® Antifade Kit (*Molecular Probes*), observées en épifluorescence au grossissement x60 ou x100 à l'aide d'un microscope Axioplan 2 (*Zeiss*) muni d'un contraste de phase et photographiées à l'aide d'une caméra noir et blanc (Axiocam MRm, *Zeiss*) et du logiciel Axiovision 3.1 (*Zeiss*).

5. Invasion cellulaire synchronisée :

L'invasion cellulaire synchronisée permet l'observation de la localisation transitoire de GRA2 et GRA6 à la partie postérieure du toxoplasme (Sibley *et al.*, 1995). 1.5×10^7 parasites sont déposés sur des lamelles de HFF. Après 20 min de sédimentation des parasites sur les HFF sur la glace, les plaques de culture sont incubées au bain-marie à 37°C pendant 5 min. Le tapis cellulaire est ensuite lavé 5 fois avec du PBS afin d'éliminer les parasites restés extracellulaires. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 7 min en D10 puis traitées pour l'IF comme indiqué ci-dessus.

6. Microscopie Electronique à Transmission (TEM)

(Réalisée par J.F. Dubremetz, CNRS UMR 5539 – Université Montpellier II).

Les tapis cellulaires de HFF sur lamelles Permaxox (*Lux Scientific, Newbury, CA*) sont infectés de manière synchronisée par des parasites extracellulaires et fixées après 20 à 24 h d'infection avec 2.5% de glutaraldéhyde dans 0.1 M de tampon cacodylate contenant 3% de sucrose. Après rinçage en tampon

cacodylate, les cellules sont fixées de nouveau à l'aide de 1% de tétroxyde d'osmium, déshydratées en éthanol et encastrées dans la résine LR white (*PolySciences, Inc*). Des sections fines ou ultrafines sont coupées transversalement au tapis cellulaire, colorées grâce à du citrate et de l'acétate d'uranyl et observées au microscope électronique à transmission Zeiss EM902 ou JOEL 100CX.

7. Microscopie Electronique à Balayage (SEM)

(Réalisée par R. Mondragon, Département de Biochimie CINVESTAV, Mexico).

Les cellules Hep-2 cultivées sur lamelles de verre à confluence sont mises en présence de parasites extracellulaires pendant 2 h à 37°C. Après élimination des parasites restés extracellulaires, les cellules infectées sont mises en culture pendant 12 h. Les cellules sont fixées avec 2.5% de glutaraldéhyde dilué en PBS à température ambiante et 1% d'OsO₄ en PBS pendant 1 h à 4°C. Les cellules fixées sont ensuite déshydratées à l'aide de concentrations croissantes d'éthanol, puis séchées dans une atmosphère contenant du CO₂ à l'intérieur de l'appareil Samdry-780A (*Tousimis Research, USA*) et incubées avec de l'or dans le Denton Vacuum Desk II (*INXS Inc, Florida*). Après l'attachement des lamelles par un système de maintien en aluminium, la membrane apicale des cellules hôte est enlevée à l'aide d'un bras métallique recouvert d'adhésif double face à une de ses extrémités. Les lamelles traitées ainsi que les faces adhésives liées au bras métallique sont incubées avec de l'or et l'organisation des parasites dans la VP est analysée grâce au microscope électronique à balayage JEOL JSM-35C (*JEOL, LTD, Japan*).

8. 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 fraîchement lysés (concentration : 1.2 x 10⁸ toxoplasmes/ml) pendant 3 h, à 37°C, sous agitation rotative douce, en D10. Les parasites (LSP pour « Low Speed Pellet ») sont séparés des produits de sécrétion (LSS pour « Low Speed Supernatant ») par centrifugation de 12 min à 1 000 g (3 000 rpm) et 10 min à 17 000 g (13 000 rpm), puis la fraction LSS est ultracentrifugée 1 h à 100 000 g (HSP pour « High Speed Pellet » et HSS pour « High Speed Supernatant »). Les fractions sont analysées par SDS-PAGE puis immunoblot après précipitation par deux volumes d'Acétone. Les protéines GRA1 et SAG1 servent de contrôles à cette expérience de sécrétion parasitaire *in vitro*.

La purification de GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG sécrétées *in vitro*, par chromatographie d'affinité sur résine FLAG (cf paragraphe D 4), est réalisée directement à partir de la fraction LSS.

9. Partition parasitaire par le Triton X-114 :

Afin d'analyser le comportement hydrophile ou hydrophobe des protéines dans les parasites, les toxoplasmes extracellulaires lavés en PBS sont lysés à froid dans 2.9 % de Triton X-114 et 3.5 mM EGTA pH 8, pendant 1 h. Après 10 min de centrifugation à 17 000 g (13 000 rpm), le culot qui représente la fraction insoluble « I » est lavé en PBS. Les phases détergent « D » et aqueuse « A » sont séparées par incubation de 10 min à 37°C suivie d'une centrifugation de 10 min à 17 000 g (13 000 rpm). Les phases « D » et « A » sont extraites deux fois en retour par du PBS ou du Triton X-114 10 % respectivement. La fraction « D » est précipitée par deux volumes d'Acétone, la fraction « A » par 1 % d'Acide Trichloracétique avant d'être analysées par SDS-PAGE puis immunoblot.

10. Fractionnement des produits vacuolaires :

Le comportement soluble ou membranaire des protéines après leur sécrétion dans la vacuole parasitophore est analysé par fractionnement subcellulaire de cellules infectées. Les cellules lavées en PBS, afin d'éliminer les parasites extracellulaires, sont décollées mécaniquement à l'aide d'un grattoir. 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 25 g puis 27 g, dans un volume minimal de 0.5 à 2 ml de PBS additionné de 5 mM d'EGTA pH 8. Après élimination des déchets parasitaires et cellulaires par 10 min de centrifugation à 750 g (2 600 rpm) puis 10 min à 17 000 g (13 000 rpm) à 4°C, la fraction protéique soluble est ultracentrifugée 1 h à 100 000 g. Le HSP correspond aux membranes des vacuoles et des cellules hôtes et le HSS contient la phase protéique ultra-soluble de la vacuole et des cellules hôtes (HSP pour « High Speed Pellet » et HSS pour « High Speed Supernatant »).

La stabilité des protéines GRA associées aux membranes vacuolaires est testée par traitement du HSP par 0.5 M de KCl, 0.1 M de Carbonate pH 11, 1% de NP-40 ou 6 M d'Urée, 30 min sur glace. Après ultracentrifugation de 1 h à 100 000 g. Les fractions traitées par le Carbonate et l'Urée sont précipitées par 1 % d'Acide Trichloracétique, les fractions traitées par le KCl et le NP40 sont précipitées par deux volumes d'Acétone. Elles sont ensuite analysées par SDS-PAGE puis immunoblot. Les protéines GRA1 et SAG1 servent de contrôles à cette expérience de fractionnement des produits vacuolaires.

La purification de GRA2-HA-FLAG et GRA5-HA-FLAG vacuolaires par chromatographie d'affinité sur résine FLAG (cf paragraphe D 4) est réalisée à partir de la fraction HSS et de la fraction soluble issue de la fraction HSP solubilisée 40 min à 4°C, sous agitation douce (5 rpm), par 0.5 % NP40 puis ultracentrifugée 1 h à 100 000 g.

D. METHODES DE BIOCHIMIE

1. SDS-PAGE et détection des protéines par coloration au Bleu de Coomassie, à l'argent ou par immunoblot:

a) Séparation des protéines par SDS-PAGE :

Les protéines précipitées issues d'expériences de sécrétion *in vitro*, de partition parasitaire par le Triton X-114 ou de fractionnement des produits vacuolaires et les protéines issues de culots parasitaires sont reprises dans du tampon d'échantillon 2X (20 % Glycérol, 4 % SDS, 13 % Tampon gel supérieur 4 X (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4 % SDS) et 0.0004 % Bleu de Bromophénol). Les extraits protéiques issus des fractions d'élution des chromatographies d'affinité sur résine ou FLAG ainsi que les fractions protéiques issues des chromatographies sur phosphocellulose et exclusion de taille sont repris dans du tampon d'échantillon 1X en condition dénaturante (10 % β -mercaptoéthanol). Les extraits protéiques sont dénaturés 5 min à 95°C avant d'être séparés sur gel de polyacrylamide (16 % - 5 %) en présence de SDS (SDS-PAGE), 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, chaque migration est réalisée en présence de marqueurs de poids moléculaires précolorés (*Fermentas*). Les protéines du gel sont ensuite soit colorées par une solution de Bleu de Coomassie brillant R250 (*Merck*), soit révélées par une coloration à l'argent, soit révélées par immunoblot après transfert sur membrane de nitrocellulose.

b) Détection des protéines contenues dans le SDS-PAGE par coloration à l'argent :

Après séparation des protéines sur SDS-PAGE, les protéines sont fixées 1 h dans 30 % d'Ethanol et 10 % d'Acide Acétique, puis une nuit sous agitation dans 30 % d'Ethanol et 5 % d'Acide Acétique. Le gel est lavé par bains de 10 min dans 20 % d'Ethanol, 10 % d'Ethanol puis 2 fois dans de l'eau, sous agitation. La réaction colorée est ensuite activée 1 min dans 0.02 % de Sodium Thiosulfate Pentahydrate et après deux lavages d'une minute dans de l'eau, le gel est incubé 30 min dans 12.5 mM d'AgNO₃, à l'abri de la lumière. Après un lavage de 15 s dans de l'eau, les protéines sont révélées dans 250 mM de Carbonate de Potassium, 0.00125 % de Sodium Thiosulfate Pentahydrate et 0.01 % de Formaldéhyde. La réaction est stoppée dans 330 mM de Tris et 2 % d'Acide Acétique pendant 30 min.

c) Détection des protéines par immunoblot :

Après séparation des protéines sur gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond™ ECL™, *Amersham*) selon la technique développée par Laemmli (Laemmli, 1970). La membrane est saturée 1 h 15 dans une solution de saturation (PBS, 5 % lait écrémé, 5 % Sérum de chèvre, 0.05 % Tween-20, 0.05 % Triton X-114), sous agitation. La membrane est incubée 2 h en présence de l'anticorps primaire dilué en solution de saturation avant d'être lavée 4 fois (15 s, 10 min, 2 x 5 min), sous agitation, avec une solution de lavage (PBS, 2 % solution de saturation, 0.0225 % Tween-20, 0.0225 % Triton X-114). 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 5 fois (15 s, 15 min, 3x 10 min) avec la solution de lavage, puis 10 min en PBS. Les protéines sont révélées par chimioluminescence (SuperSignal™ Chemiluminescent Substrate, *Pearce*). Le signal est mis en évidence par exposition d'un film (Hyperfilm™ ECL™, *Amersham*) sur la membrane.

Les membranes peuvent être réutilisées pour un second immunoblot. Pour cela, les anticorps sont déshybridés à l'aide d'une solution de déshybridation à pH 2.2 (100 mM Glycine, 1 % SDS et 0.1 % NP40), sous agitation pendant 30 min. La membrane est ensuite lavée trois fois 10 min en PBS.

2. Electrophorèse bidimensionnelle :

Les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique avant d'être séparées en fonction de leur poids moléculaire.

a) Préparation des échantillons protéiques :

Les 3 fractions protéiques les plus concentrées, issues de la purification de GRA2-HA-FLAG par chromatographie d'affinité sur résine FLAG, sont regroupées et dialysées 24 h à 4°C dans 50 mM Tris pH 8 et 6M d'Urée, afin d'éliminer la majorité des sels. L'extrait protéique dialysé est ensuite dosé par la méthode de Bradford.

Le réactif de Bradford contient du bleu de Coomassie se complexant aux protéines. Il permet, à l'aide d'une gamme étalon de concentration connue en Albumine bovine, de doser les protéines selon la méthode colorimétrique développée par Bradford (Bradford, 1976). Le dosage est effectué par lecture de l'absorbance à 595 nm à l'aide du kit Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate (*Bio-Rad*).

b) 1^{ère} dimension :

Des immobilines™ DryStrip de gradient de pH 3-10 (*Amersham*) sont réhydratées avec 13.5 µg de protéines dialysées après purification de GRA2-HA-FLAG sur résine FLAG, dans 2 M de Thiourée, 7 M d'Urée, 4 % CHAPS, 1 % d'Ampholite Pharmalyte™ pH 3-10 (*Amersham*) et 10 mM de DTT, pendant 16 h à température ambiante, couvertes d'huile minérale. Les protéines sont ensuite séparées en fonction de

leur point isoélectrique sous un gradient de courant s'élevant jusqu'à 3 450 V, pendant environ 26 h. Les immobilines™ sont ensuite équilibrées 15 min dans la solution A (125 mM Tris, 100 mM HCl, 2.5 % SDS, 30 % Glycérol, 6 M Urée et 50 mM DTT) puis 15 min dans la solution B (125 mM Tris, 100 mM HCl, 2.5 % SDS, 30 % Glycérol, 6 M Urée et 215 mM Iodoacétamide).

c) 2^{ème} dimension :

Les protéines contenues dans les immobilines™ rééquilibrées sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par SDS-PAGE 10 % pendant 6 h environ (25 V pendant 1 h puis 50 mA par gel pendant 5 h). Cette migration a lieu dans un tampon Taurine (50 mM Tris, 200 mM Taurine et 0.1 % SDS) placé au niveau des électrodes, en haut du gel, et un tampon Glycine (50 mM Tris, 375 mM Glycine et 0.1 % SDS) placé dans le fond de la cuve de migration. Les protéines contenues dans le SDS-PAGE sont ensuite révélées par coloration au nitrate d'argent ou par immunoblot après transfert sur membrane de nitrocellulose (Hybond™ ECL™, Amersham).

3. Superposition protéines/lipides :

200 pmol de lipides dissouts en butanol sont déposés sur membrane de nitrocellulose (Hybond™ ECL™, Amersham). La membrane est séchée à température ambiante pendant 1 h, puis saturée 1 h avec 3 % d'Albumine bovine sans acide 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 protéine recombinante (GST, GRA1-GST, GRA2-GST, GRA6-GST ou GRA9-HIS), 5 µg/ml de fraction protéique issue de la purification de GRA2-HA-FLAG par chromatographie d'affinité sur résine FLAG ou 1.5 mg/ml d'extrait protéique soluble issu de parasites sauvages, dans du TBST additionné de 3 % d'Albumine sans acide gras. La membrane est lavée 6 fois 5 min en TBST avant d'être mise en présence des anticorps anti-GRA dilués en TBST, pendant 1 h. La membrane est lavée 6 fois 5 min en TBST, incubée avec les anticorps secondaires – peroxydase dilués en TBST puis lavée 12 fois 5 min en TBST avant d'être révélée par chimioluminescence (SuperSignal™ Chemiluminescent Substrate, *Pearce*). Le signal est mis en évidence par exposition de la membrane contre un film (Hyperfilm™ ECL™, Amersham).

4. Chromatographie d'affinité sur résine FLAG :

5 x 10⁸ parasites extracellulaires exprimant GRA2, GRA3, GRA5, GRA6 ou GRA7 fusionnées à la double étiquette HA-FLAG sont lysés dans un tampon de lyse (20% Glycérol, 20 mM Tris HCl pH 8, 500 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA pH 8, 0.5 mM DTT, 0.5 % NP40 et 0.2 mM PMSF). L'extrait parasitaire est centrifugé 2 h à 4°C à 17 000 g (13 000 rpm) afin d'éliminer tous les débris cellulaires. L'extrait protéique soluble résultant ou les produits de sécrétion *in vitro* parasitaires ou les produits vacuolaires solubles et

solubilisés sont incubés pendant 2 h à 4°C sous agitation douce (5 rpm) avec 120 µl de résine HA-FLAG. La résine est ensuite lavée avec 50 volumes de BC500 (10 % Glycérol, 20 mM Tris HCl pH 8, 500 mM KCl et 0.2 mM EDTA pH 8). Les protéines fixées à la résine sont éluées deux fois par compétition avec un volume de peptide FLAG (contacts de 15 min entre résine et peptide FLAG), puis trois fois avec un volume de BC500 et enfin deux fois avec un volume de 100 mM Glycine pH 2.5. Les fractions éluées sont analysées par SDS-PAGE et immunoblot, séparées par électrophorèse bidimensionnelle ou analysées par MS/MS.

5. Chromatographie d'absorption sur phosphocellulose :

Des parasites sauvages extracellulaires sont lysés avec du tampon de lyse (20% Glycérol, 20 mM Tris HCl pH 8, 500 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA pH 8, 0.5 mM DTT, 0.5 % NP40 et 0.2 mM PMSF) puis le lysat parasitaire est centrifugé. L'extrait protéique soluble est déposé sur une colonne Phosphocellulose P11 de 250 ml (*Whatman*). La colonne est lavée avec 10 volumes de tampon A (10 % Glycérol, 20 mM Tris HCl pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoéthanol et 0.2 mM PMSF) et les protéines sont éluées par des concentrations croissantes en KCl (0.1, 0.3, 0.5 et 1 M) diluées dans le tampon A. Les fractions éluées sont analysées par SDS-PAGE et immunoblot.

6. Chromatographie par exclusion de taille :

Les fractions protéiques éluées de la colonne de Phosphocellulose par 0.1 M et 1 M de KCl sont déposées sur une colonne Superose 6 HR 10/30 de 20 ml dont le domaine de fractionnement est 5 000 et 5 kDa (*Amersham*). La colonne est calibrée à l'aide de marqueurs de poids moléculaires (*Amersham*). Le volume mort est déterminé selon les indications du guide *Amersham* (un tiers de la colonne, soit 7 ml). Les protéines sont entraînées et séparées en fonction de leur poids globulaire à l'aide de BC500. Les fractions éluées sont analysées par SDS-PAGE et immunoblot.

7. Recherche de N- et O-Glycanes dans les protéines GRA2 et GRA6

(Collaboration N. Azzouz et R. Schwarz, Institute for Virology, Medical Center for Hygiene and Medical Microbiology, Philipps University, Marburg, Germany).

Les protéines GRA2 et GRA6 sont immunopurifiées à partir de parasites sauvages marqués par la [³H]-Glucosamine (cf paragraphe C 2) puis déposées sur colonne de Jacaline qui fixe les O-Glycanes et possède une importante affinité pour le N-acétylgalactosamine-β1,3-galactose ou sur colonne de

Concanavaline A qui fixe les N-Glycanes et plus particulièrement, les résidus mannoses. Afin de rechercher quels sont ses domaines protéiques O-glycosylés, la protéine GRA2 est au préalable traitée par différentes protéases.

a) Immunoprécipitation des protéines GRA2 et GRA6 :

Les parasites sauvages marqués par la [H^3]-Glucosamine et purifiés sont lysés dans 1 ml de PBS, 2 mM EDTA pH 8, 0.5 % NP40 et 0.01 mg/ml Leupeptine, 2 h sur glace, puis centrifugés 10 min à 17 000 g (13 000 rpm) à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. L'extrait protéique soluble est incubé 2 h à 4°C sous agitation avec 12 μ l d'anticorps monoclonal de souris TG17-179 anti-GRA2 ou 12 μ l de sérum de lapin anti-HIS-GRA6 incubés au préalable avec 30 μ l de protéine G-Sépharose (*Sigma*). Les protéines GRA2 ou GRA6 liées à la protéine G-Sépharose par l'intermédiaire des anticorps sont lavées 5 fois en PBS et 0.5 % NP40 puis décrochées après incubation pendant 7 min à 90°C et centrifugation de 10 min à 17 000 g (13 000 rpm) à 4°C. Les protéines GRA2 et GRA6 immunopurifiées sont éventuellement traitées par différentes protéases et sont déposées sur colonne de Jacaline ou de Concanavaline A.

b) Digestion protéasique de GRA2 :

La protéine GRA2 marquée par la [H^3]-Glucosamine et immunopurifiée est traitée sélectivement pendant 2 h à 25°C par 0.1 mg de Chymotrypsine (*Sigma*) dans 38 mM Tris pH 7.8, 30 % Méthanol, 53 mM $CaCl_2$, 0.03 mM HCl. La protéase est ensuite dénaturée 5 min à 90°C. Les fragments protéiques de GRA2 sont déposés sur colonne de Jacaline.

c) Chromatographie d'affinité sur colonne de Jacaline :

Les protéines GRA2 et GRA6 immunopurifiées ainsi que les fragments protéiques de GRA2, tous marqués par la [H^3]-Glucosamine sont dilués dans le tampon d'équilibration de la colonne de Jacaline (*Pierce*) (100 mM Tris HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1 % BSA et 0.02 % Azide de Sodium) puis déposés sur la colonne de 2 ml. Celle-ci est lavée avec 4 volumes de tampon d'équilibration. Les protéines et fragments protéiques liés sont élués par 4 volumes de 100 mM de Lactose dans du tampon d'équilibration puis 7 volumes de 100 mM Mélébiose dans du tampon d'équilibration. La radioactivité des fractions collectées est ensuite comptée à l'aide d'un compteur à scintillation.

d) Chromatographie d'affinité sur colonne de Concanavaline A :

Les protéines GRA2 et GRA6 immunopurifiées ainsi que les fragments protéiques de GRA2, tous marqués par la [H^3]-Glucosamine sont dilués en TBS (100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$ et 1 mM $MgCl_2$) puis déposés sur la colonne de 1 ml. Les protéines et fragments protéiques liés sont élués par

10 volumes de 10 mM d' α -Méthylglucoside en TBS puis par 10 volumes de 10 mM d' α -Méthylmannoside en TBS. La radioactivité des fractions collectées est ensuite comptée à l'aide d'un compteur à scintillation.

8. Analyse protéique par MS/MS

(Réalisé par S. Kieffer et J. Garin, Département de Biologie Moléculaire et Structurale iRSTV/EDyP, CEA, Grenoble).

Les bandes protéiques à identifier sont excisées du gel SDS-PAGE coloré au bleu colloïdal (*Invitrogen*), oxydées par 7% d' H_2O_2 , puis soumises à une digestion tryptique en gel. Les peptides sont extraits par 5% (vol/vol) d'une solution d'acide formique et d'acétonitrile et injectés dans le CapLC (*Waters*) (Ferro *et al.*, 2003). Les données de spectrométrie de masse en tandem sont acquises et analysées automatiquement par le logiciel MassLynx 3.5 (*Waters*). Les spectres de masse en tandem sont recherchés dans une banque de données spécifiques de *T. gondii* en utilisant le programme MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A. and Dubremetz, J. F. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. **103**, 321-329.
- Adamian, L. and Liang, J. (2002). Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins : polar clamps and serine zippers. *Proteins*. **47**, 209-218.
- Aderem, A. and Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593-623.
- Adjogble, K. Z., Mercier, C., Dubremetz, J. F., Hucke, C., MacKenzie, C. R., Cesbron-Delauw, M. F., Däubener, W. (2004). GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int. J. Parasitol.* **34**, 1255-1264.
- Adoutte, A., de Loubresse, N. G. and Beisson, J. (1984). Proteolytic cleavage and maturation of the crystalline secretion products of *Paramecium*. *J. Mol. Biol.* **180**, 1065-1081.
- Afssa (2005). Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation rapport du groupe de travail « *T. gondii* » de l'AFSSA.
- Ahn, H. J., Kim, S. and Nam, H. W. (2003). Molecular cloning of the 82-kDa heat shock protein (HSP90) of *Toxoplasma gondii* associated with the entry into and growth in host cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 654-659.
- Ahn, H. J., Kim, S. and Nam, H. W. (2005). Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **331**, 614-620.
- Ajioka, J. W., Boothroyd, J. C., Brunk, B. P., Hehl, A., Hillier, L., Manger, I. D., Marra, M., Overton, G. C., Roos, D. S., Wan, K. L., Waterson, R. and Sibley, L. D. (1998). Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res.* **8**, 18-28.
- Ajioka, J. W. (1998). *Toxoplasma gondii* : Ests and gene discovery. *Int. J. Parasitol.* **28**, 1025–1031.
- Ajzenberg, D., Banuls, A. L., Su, C., Dumetre, A., Demar, M., Carne, B. and Darde, M. L. (2004). Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **34**, 1185-1196.
- Alder, N. N. and Johnson, A. E. (2004). Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**, 22787–22790.
- Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P. J. and Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii* : a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* **1**, e17.
- Aliberti, J. and Sher, A. (2002). Positive and negative regulation of pathogen induced dendritic cell function by G-protein coupled receptors. *Mol. Immunol.* **38**, 891-893.
- Aliberti, J., Valenzuela, J. G., Carruthers, V. B., Hieny, S., Andersen, J., Charest, H., Reis e Sousa C., Fairlamb, A., Ribeiro, J. M., and Sher, A. (2003). Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol.* **4**, 485-490.

- Aliberti, J. (2005). Host persistence : exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature Rev. Immunol.* **5**, 162-165.
- Allen, M. L., Dobrowolski, J. M., Muller, H., Sibley, L. D. and Mansour, T. E. (1997). Cloning and characterization of actin depolymerizing factor from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **88**, 43-52.
- Almers, W. (1990). Exocytosis. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 607-624.
- Andrade, E. F., Stumbo, A. C., Monteiro-Leal, L. H., Carvalho, L. and Barbosa, H. S. (2001). Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells from a barrier for the phagolysosomal fusion? *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **33**, 337-341.
- Andrews, N. W. (2000). Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell. Biol.* **10**, 316-321.
- Angelova, M. and Dimitrov, D. (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 303.
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T. and Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.* **6**, 392-401.
- Araujo, F. G., Williams, D. M., Grumet, F. C. and Remington, J. S. (1976). Strain-dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* **13**, 1528-1530.
- Archibald, J. M. and Keeling, P. J. (2002). Recycled plastids : a "green movement" in eukaryotic evolution. *Trends Genet.* **18**, 577-584.
- Arnautova, I., Smith, A. M., Coates, L. C., Sharpe, J. C., Dhanvantari, S., Snell, C. R., Birch, N. P. and Loh, Y. P. (2003). The prohormone processing enzyme PC3 is a lipid raft-associated transmembrane protein. *Biochemistry.* **42**, 10445-10455.
- Arrizabalaga, G. and Boothroyd, J. C. (2004). Role of calcium during *Toxoplasma gondii* invasion and egress. *Int. J. Parasitol.* **34**, 361-368.
- Arvan, P., Kuliawat, R., Prabakaran, D., Zavacki, A. M., Elahi, D., Wang, S. and Pilkey, D. (1991). Protein discharge from immature secretory granules displays both regulated and constitutive characteristics. *J. Biol. Chem.* **266**, 14171-14174.
- Arvan, P. and Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis : looking backward and looking forward. *Biochem. J.* **332**, 593-610.
- Arvan, P., Zhang, B. Y., Feng, L., Liu, M. and Kuliawat, R. (2002). Luminal protein multimerization in the distal secretory pathway/secretory granules. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**, 48-453.
- Asai, T., O'Sullivan, W. J. and Tatibana, M. (1983). A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Purification, some properties, and activation by thiol compounds. *J. Biol. Chem.* **258**, 6816-6822.
- Asai, T., Miura, S., Sibley, L. D., Okabayashi, H. and Takeuchi, T. (1995). Biochemical and molecular characterization of nucleotide triphosphate hydrolase isoenzymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **270**, 11391-11397.
- Assadi, M., Sharpe, C., Snell, C. and Loh, Y. P. (2004). The C-terminus of prohormone convertase 2 is sufficient and necessary for raft association and sorting to the regulated secretory pathway. *Biochemistry.* **43**, 7798-7807.
- 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 *Toxoplasma gondii* tachyzoites and evidence for a lipid raft-associated form. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**, 161-168.

- 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 *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 19-25.
- Aubert, D., Maine, G. T., Villena, I., Hunt, J. C., Howard, L., Sheu, M., Brojanac, S., Chovan, L. E., Nowlan, S. F., and Pinon, J. M. (2000). Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1144-1150.
- Azzouz, N., Shams-Eldin, H., Niehus, S., Debierre-Grockiego, F., Bieker, U., Schmidt, J., Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F., Dubremetz, J. F., Smith, T. K. and Schwarz, R. T. (2006). *Toxoplasma* grown in human cells use GalNAC-containing GPI precursors to anchor plasma membrane proteins while the immunogenic glycosylated GPI precursors remain free at the parasite cell surface. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **38**, 1914-1925.
- Barragan, A. and Sibley, L. D. (2003). Migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.* **195**, 1625-1633.
- Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P. and Cowman, A. F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nature Reviews Microb.* **4**, 621-628.
- Beghetto, E., Buffolano, W., Spadoni, A., Del Pezzo, M., Di Cristina, M., Minenkova, O., Petersen, E., Felici, F., and Gargano, N. (2003). Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J Clin. Microbiol.* **41**, 5414-5418.
- Bell-Parikh, L. C., Eipper, B. A. and Mains, R. E. (2001). Response of an integral granule membrane protein to changes in pH. *J. Biol. Chem.* **276**, 29854-29863.
- Bermudes, D., Dubremetz, J. F., Achabarou, A., Joiner, K. A. (1994a). Cloning of a cDNA encoding the dense granule protein GRA3 from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**, 247-257.
- Bermudes, D., Peck, K. R., Afifi, M. A., Beckers, C. J. and Joiner, K. A. (1994b). Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **269**, 29252-29260.
- Beuret, N., Stettler, H., Renold, A., Rutishauser, J. and Spiess, M. (2004). Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 20242-20249.
- Bisanz, C., Bastien, O., Grando, D., Jouhet, J., Marechal, E. and Cesbron-Delauw, M. F. (2006). *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: *de novo* synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem. J.* **394**, 197-205.
- Bisanz, C., Botte, C., Saïdani, N., Bastien, O., Cesbron-Delauw, M. F. and Marechal, E. (2007). Structure, function and biogenesis of the secondary plastid of apicomplexan parasites. *Curr. Res. In Plant Cell. Compartments*. In press.
- Blumenschein, T. M. A., Friedrich, N., Childs, R. A., Saouros, S., Carpenter, E. P., Campanero-Rhodes, M. A., Simpson, P., Chai, W., Koutroukides, T., Blackman, M. J., Feizi, T., Soldati-Favre, D. and Matthews, S. (2007). Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* **26**, 2808-2820.
- Bohne, W., Heesemann, J. and Gross, U. (1993). Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in IFN-gamma-treated-mouse macrophages. *Infect. Immun.* **61**, 1141-1145.
- Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D.J. and Heesemann, J. (1995). Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol. Microbiol.* **16**, 1221-1230.
- Bohne, W., Holpert, M. and Gross, U. (1999). Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology.* **201**, 248-254.

- Bonhomme, A., Maine, G. T., Beorchia, A., Burlet, H., Aubert, D., Villena, I., Hunt, J., Chovan, L., Howard, L., Brojanac, D., Sheu, M., Tyner, J., Pluot, M., And Pinon, J. M. (1998). Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 1411-1421.
- Borst, P., Overdule, J. P., Weijers, P. J., Fase-Fowler, F. and van den Berg, M. (1984). DNA circles with cruciforms from *Isospora (Toxoplasma) gondii*. *Biochem. Biophys. Acta.* **781**, 100-111.
- Botté, C., Saïdani, N., Mondragon, R., Mondragón, M., Isaac, G., Mui, E., McLeod, R., Dubremetz, J. F., Vial, H., Welti, R., Cesbron-Delauw, M. F., Mercier, C. and Maréchal, E. (2007). Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like lipid along the life cycle of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Submitted.
- Boulatnikov, I. and De Lisle, R. C. (2004). Binding of the Golgi sorting receptor muclin to pancreatic zymogens through sulphated O-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **279**, 40918-40926.
- Bout, D. T., Mevelec, M. N., Velge-Roussel, F., Dimier-Poisson, I. and Lebrun, M. (2002). Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **2**, 227-234.
- Bowman, G. R., Elde, N. C., Morgan, G., Winey, M. and Turkewitz, A. P. (2005). Core formation and the acquisition of fusion competence are linked during secretory granule maturation in *Tetrahymena*. *Traffic.* **6**, 303-323.
- Boyle, J. P., Rajasekar, B., Saeij, J. P. J., Ajioka, J. W., Berriman, M., Paulsen, I., Roos, D. S., Sibley, L. D., White, M. W. and Boothroyd, J. C. (2006). Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *T. gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 10514-10519.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bradley, P. J. and Boothroyd, J. C. (2001). The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rho-trypanin targeting signal. *Int. J. Parasitol.* **31**, 1177-1186.
- Bradley, P. J., Ward, C., Cheng, S. J., Alexander, D. L., Collier, S., Coombs, G. H., Dunn, J. D., Ferguson, D. J., Sanderson, S. J., Wastling, J. M. and Boothroyd, J. C. (2005). Proteomic analysis of rho-trypanin organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **280**, 34245-34258.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Soffientini, P., Stefanovic, S., Makarow, M., Hegde, R. S. and Borgese, N. (2005). Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *EMBO J.* **24**, 2533-2542.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Makarow, M. and Borgese, N. (2006). Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *J. Cell. Biol.* **175**, 767-777.
- Brechler, V., Chu, W. N., Baxter, J. D., Thibault, G. and Reudelhuber, T. L. (1996). A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 20636-20640.
- Brinkmann, V., Remington J. S., and Sharma, S. D. (1993). Vaccination of mice with the protective F3G3 antigen of *Toxoplasma gondii* activates CD4+ but not CD8+ T cells and induces *Toxoplasma* specific IgG antibody. *Mol. Immunol.* **30**, 353-358.
- Brossier, F. and Sibley, L. D. (2005). *Toxoplasma gondii* : microneme protein 2. *Int. J. Parasitol.* **37**, 2266-2272.
- Brydges, S. D., Zhou, X. W., Huynh, M. H., Harper, J. M., Mital, J., Adjogble, K. D. Z., Daubener, W., Ward, G. E. and Carruthers, V. B. (2006). Targeted deletion of MIC5 enhances trimming proteolysis of *Toxoplasma* invasion proteins. *Eukaryot. Cell.* **5**, 2174-2183.
- Bukau, B. and Horwich, A. L. (1998). The hsp70 and hsp60 chaperone machines. *Cell.* **92**, 351-366.
- Buss, F., Luzio, J. P. and Kendrick-Jones, J. (2002). Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic.* **3**, 851-858.

- Butcher, B. A. and Denkers, E. Y. (2002). Mechanism of entry determines ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. *Infect. Immun.* **70**, 5216-5224.
- Buxton, D. and Innes, E.A. (1995). A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*. 110 SupplS11-S16.
- Capron, A. and Dessaint, J. P. (1988). Vaccination against parasitic diseases : some alternative concepts for the definition of protective antigens. *Ann. Inst. Past./Immunol.* **139**, 109-117.
- Carey, K. L., Donahue, C. G., Ward, G. E. (2000). Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **105**, 25-37.
- Carey, K. L., Jongco, A. M., Kim, K. and Ward, G. E. (2004). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot. Cell.* **3**, 1320-1330.
- Caroni, P. (2001). Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P₂ rafts. *EMBO J.* **20**, 4332-4336.
- Carruthers, V. B. and Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell. Biol.* **73**, 114-123.
- Carruthers, V. B. and Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* **31**, 421-428.
- Carruthers, V. B., Giddings, O. K. and Sibley, L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell. Microbiol.* **1**, 225-235.
- Carruthers, V. B. and Boothroyd, J. C. (2007). Pulling together : an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 1-7.
- Cavaillès, P., Sergent, V., Bisanz, C., Papapietro, O., Colacios, C., Mas, M., Subra, J. F., Lagrange, D., Calise, M., Appolinaire, S., Faraut, T., Druet, P., Saoudi, A., Bessieres, M. H., Pipy, B., Cesbron-Delauw, M. F. and Fournié, G. J. (2006). The rat *Toxo1* locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms. *PNAS.* **103**, 744-749.
- Cérède, O., Dubremetz, J. F., Bout, D. and Lebrun, M. (2002). The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *Embo. J.* **21**, 2526-2536.
- Cérède, O., Dubremetz, J. F., Soete, M., Deslée, D., Vial, H., Bout, D. and Lebrun, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J. Exp. Med.* **201**, 453-63.
- 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. and Capron, A. (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 7537-41.
- Cesbron-Delauw, M. F., Boutillon, C., Mercier, C., Fourmaux, M. P., Murray, A., Miquey, F., Tartar, A. and Capron, A. (1992). Amino acid sequence requirements for the epitope recognized by a monoclonal antibody reacting with the secreted antigen GP28.5 of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Immunol.* **29**, 1375-1382.
- Cesbron-Delauw, M. F., Lecordier, L., and Mercier, C. (1996). Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **219**, 59-65.
- Chanat, E., Pimplikar, S. W., Stinchcombe, J. C., Huttner, W. B. (1991). What the granins tell us about the formation of secretory granules in neuroendocrine cells. *Cell. Biophys.* **19**, 85-91.
- Chanat, E. and Huttner, W. B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulatory secreted proteins in the trans-Golgi network. *J. Cell. Biol.* **115**, 1505-1519.
- Chardes, T., Velge-Roussel, F., Mevelec, P., Mevelec, M. N., Buzoni-Gatel, D. and Bout, D. (1993). Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. *Immunology.* **78**, 421-429.

- Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M. F. and Capron, A. (1990). *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* **71**, 114-124.
- Charron, A. J. and Sibley, L. D. (2002). Host cells : mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* **115**, 3049-3059.
- Charron, A. J. and Sibley, L. D. (2004). Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic.* **5**, 855-867.
- Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P. I., Striepen, B., Roos, D. S. and Joiner, K. A. (1999). Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J. Biol. Chem.* **274**, 2424-2431.
- Chini, E. N., Nagamune, K., Wetzel, D. M. and Sibley, L. D. (2005). Evidence that the cADPR signalling pathway controls calcium-mediated microneme secretion in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. J.* **389**, 269-277.
- Chupin, V., Killian, J. A., Breg, J., de Jongh, H. H., Boelens, R., Kaptein, R. and de Kruijff, B. (1995). PhoE signal peptide inserts into micelles as a dynamic helix-break-helix structure, which is modulated by the environment. A two-dimensional 1H NMR study. *Biochemistry.* **34**, 11617-11624
- Cintra, W. M. and De Souza, W. (1985). Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy of detergent extracted tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Submicrosc. Cytol.* **17**, 503-508.
- Cleary, M. D., Singh, U., Blader, I. J., Brewer, J. L., and Boothroyd, J. C. (2002). *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Euk. Cell.* **1**, 329-340.
- Cole, N. B. and Lippincott-Schwartz, J. (1995). Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 55-64.
- Cooke, B. M., Lingelbach, K., Bannister, L. H. and Tilley, L. (2004). Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. *Trends Parasitol.* **20**, 581-589.
- Coppens, I., Andries, M., Liu, J. L. and 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**, 463-472.
- Coppens, I., Sinai, A. P. and Joiner, K. A. (2000). *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J. Cell. Biol.* **149**, 167-180.
- Coppens, I. and Joiner, K. A. (2003). Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 3804-3820.
- Coppens, I. and Vielemeyer, O. (2005). Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa : from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. *Int. J. Parasitol.* **35**, 597-615.
- Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C. and Joiner, K. A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell.* **125**, 261-274.
- Coppens, I. (2006). Contribution of host lipids to *Toxoplasma gondii* pathogenesis. *Cell Microb.* **8**, 1-9.
- Coppin, A., Dzierszinski, F., Legrand, S., Mortuaire, M., Ferguson, D. and Tomavo, S. (2003). Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie.* **85**, 353-361.
- Cornell, R. B. and Taneva, S. G. (2006). Amphipathic helices as mediators of the membrane interaction of amphitropic proteins, and as modulators of bilayer physical properties. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, 539-552.
- Cowan, A. T., Bowman, G. R., Edwards, K. F., Emerson, J. J. and Turkewitz, A. P. (2005). Genetic, genomic, and functional analysis of the granule lattice proteins in *Tetrahymena* secretory granules. *Mol. Biol. Cell.* **16**, 4046-4060.

- Craver, M. P. J. and 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.* In press.
- Crawford, M. J., Thomsen-Zieger, N., Ray, M., Schachtner, J., Roos, D. S. and Seeber, F. (2006). *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its *de novo* synthesis in the apicoplast. *EMBO J.* **25**, 3214-3222.
- Dannies, P. S. (2001). Concentrating hormones into secretory granules : layers of control. *Mol. Cell. Endocrinol.* **177**, 87-93.
- Darcy, F., Deslee, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V. and 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**, 553-567.
- Darcy, F., Maes, P., Gras-Masse, H., Auriault, C., Bossus, M., Deslée, D., Godard, I., Cesbron-Delauw, M. F., Tartar, A. and Capron, A. (1992). Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J. Immunol.* **149**, 3636-3641.
- Dardé, M. L. (2004). Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super Sanita.* **40**, 57-63.
- Dawson, J. C, Legg, J. A and Machesky, L. M. (2006). Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell. Biol.* **16**, 493-498.
- Deaton, J., Sun, J., Holzenburg, A., Struck, D. K., Berry, J. and Young, R. (2004). Functional bacteriorhodopsin is efficiently solubilized and delivered to membranes by the chaperonin groel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 2281-2286.
- Debierre-Grockiego, F., Campos, M. A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M. G., Mansur, D. S., Weingart, R., Schmidt, R. R., Golenbock, D. T., Gazzinelli, R. T. and Schwarz, R. T. (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **179**, 1129-1137.
- De Carvalho, L. and De Souza, W. (1989). Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J. Protozool.* **36**, 164-170.
- Deckert-Schluter, M., Schluter, D., Schmidt, D., Schwendemann, G., Wiestler, O. D. and Hof, H. (1994). *Toxoplasma* encephalitis in congenic B10 and BALB mice : impact of genetic factors on the immune response. *Infect. Immun.* **62**, 221-228.
- Decoster, A., Darcy, F., Caron, M. and Capron, A. (1988). IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet.* **12**, 1104-1107.
- Delbac, F., Sanger, A., Neuhaus, E. M., Stratmann, R., Ajioka, J. W., Toursel, C., Herm-Gotz, A., Tomavo, S., Soldati, T. and Soldati, D. (2001). *Toxoplasma gondii* myosins B/C : one gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. *J. Cell. Biol.* **155**, 613-23.
- Delorme, V., Cayla, X., Faure, G., Garcia, A. and Tardieux, I. (2003). Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on *Toxoplasma gondii* Toxofilin. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 1900-1912.
- De Melo, E. J., De Carvalho, T. U. and De Souza, W. (1992). Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell. Struct. Funct.* **17**, 311-317.
- De Melo, E. J. and Souza, W. (1997). Relationship between the host cell endoplasmic reticulum and the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii*. *Cell. Struct. Funct.* **22**, 317-323.
- Denkers, E. Y., Kim, L. and Butcher, B. A. (2003). In the belly of the beast : subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection. *Cell. Microb.* **5**, 75-83.

- Denkers, E. Y. (2003). From cells to signalling cascades : manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol. Med. Microb.* **39**, 193-203.
- Denkers, E. Y., Butcher, B. A., Del Rio, L. and Bennouna, S. (2004). Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int. J. Parasitol.* **34**, 411-421.
- Denkers, E. Y. and Butcher, B. A. (2005). Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.* **21**, 35-41.
- Desolme, B., Mevelec, M. N., Buzoni-Gatel, D., and Bout, D. (2000). Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine.* **18**, 2512-2521.
- De Souza, W. (2006). Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An Acad. Braz. Cienc.* **78**, 271-291.
- Dhanvantari, S., Arnaoutova, I., Snell, C. R., Steinbach, P. J., Hammond, K., Caputo, G. A., London, E. and Loh, Y. P. (2002). Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granules via a C-terminal transmembrane insertion. *Biochemistry.* **41**, 52-60.
- Diana, J., Vincent, C., Peyron, F., Picot, S., Schmitt, D., and Persat, F. (2005). *Toxoplasma gondii* regulates recruitment and migration of human dendritic cells via different soluble secreted factors. *Clin. Exp. Immunol.* **141**, 475-484.
- Di Cristina, M., Spaccapelo, R., Soldati, D., Bistoni, F. and Crisanti, A. (2000). Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7332-7341.
- Dikeakos, J. D., Lacombe, M. J., Mercure, C., Mireuta, M. and Reudelhuber, T. L. (2007). A hydrophobic patch in a charged alpha-helix is sufficient to target proteins to dense core secretory granules. *J. Biol. Chem.* **282**, 1136-1143.
- Dikeakos, J. D. and Reudelhuber, T. L. (2007). Sending proteins to dense core secretory granules : still a lot to sort out. *J. Cell. Biol.* **177**, 191-196.
- Dobrowolski, J. M. and Sibley, L.D. (1996). *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* **84**, 933-939.
- Dominguez, R. (2004). Actin-binding proteins – a unifying hypothesis. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 572-578.
- Donald, R. G., Carter, D., Ullman, B. and Roos, D. S. (1996). Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J. Biol. Chem.* **271**, 14010-14019.
- Dowse, T. and Soldati, D. (2004). Host cell invasion by the apicomplexans : the significance of microneme protein proteolysis. *Cur. Opin. Microb.* **7**, 388-396.
- Dowse, T. J., Pascall, J. C., Brown, K. D. and Soldati, D. (2005). Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. *Int. J. Parasitol.* **35**, 747-756.
- Drin, G., Casella, J. F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T. U. and Antonny, B. (2007). A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 138-146.
- Dubey, J. P., Miller, N. L. and Frenkel, J. K. (1970). Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **56**, 447-456.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S. and Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microb. Reviews.* **11**, 267-299.

- Dubey, J. P. and Lindsay, D. S. (2006). Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **22**, 645–671.
- Dubremetz, J. F. and Dissous, C. (1980). Characteristic proteins of micronemes and dense granules from *Sarcocystis tenella* zoites (Protozoa, Coccidia). *Mol. Biochem. Parasitol.* **1**, 279-289.
- Dubremetz, J. F., Ferreira, E. and Dissous, C. (1989). Isolation and partial characterization of rhoptries and mironemes from *Eimeria nieschulzi* zoites (Sporozoa, Coccidia). *Parasitol. Res.* **1989**, 449-454.
- Dubremetz, J. F., Achabarou, A., Bermudes, D. and Joiner, K. A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol. Res.* **79**, 402-408.
- Dubremetz, J. F. (2007). Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell. Microb.* **9**, 841-848.
- Duquesne, V., Auriault, C., Darcy, F., Decavel, J. P., and Capron, A. (1990). Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen-specific helper T cells. *Infect. Immun.* **58**, 2120-2126.
- Dziadek, B., Dziadek, J. and Dlugonska, H. (2007). Identification of *Toxoplasma gondii* proteins binding human lactoferrin : a new aspect of rhoptry proteins function. *Exp. Parasitol.* **115**, 277-282.
- Dzierszynski, F., Nishi, M., Ouko, L. and Roos, D. S. (2004). Dynamics of *Toxoplasma* differentiation. *Euk. Cell.* **3**, 992-1003.
- Echeverria, P. C., Matrajt, M., Harb, O. S., Zappia, M. P., Costas, M. A., Roos, D. S., Dubremetz, J. F. and Angel, S. O. (2005). *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated. *J. Mol. Biol.* **350**, 723-734.
- Eisenberg, D., Weiss, R. M. and Terwilliger, T. C. (1982). The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature.* **299**, 371-374
- Elde, N. C., Long, M. and Turkewitz, A. P. (2007). A role for convergent evolution in the secretory life of cells. *Trends. Cell. Biol.* **17**, 157-164.
- El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galéotti, N., Fourmeaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G. and Dubremetz, J. F. (2006). The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins : proteomic and genomic characterization and molecular modelling. *Proteomics.* **6**, 5773-5784.
- El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S. T., Vial, H., Labesse, G. and Dubremetz, J. F. (2007). ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* **3**, e14.
- Embley, T. M. and Martin, W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature.* **440**, 623-631.
- Endo, T., Yagita, K., Yasuda, T. and Nakamura, T. (1988). Detection and localization of actin in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* **75**, 102-106.
- Erxleben, C., Klauke, N., Flotenmeyer, M., Blanchard, M. P., Braun, C. and Plattner, H. (1997). Microdomain Ca²⁺ activation during exocytosis in *Paramecium* cells. Superposition of local subplasmalemmal calcium store activation by local Ca²⁺ influx. *J. Cell. Biol.* **136**, 597-607.
- Facey, S. J. and Kuhn, A. (2004). Membrane integration of *E. coli* model membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1694**, 55–66.
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K. and de Camilli, P. D. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell. Biol.* **155**, 193–200.
- Farsad, K. and de Camilli, P. (2003). Mechanisms of membrane deformation. *Cur. Op. Cell Biol.* **15**, 372-381.

- Fatoohi, A. F., Cozon, G. J., Greenland, T., Ferrandiz, J., Bienvenu, J., Picot, S., and Peyron, F. (2002). Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 704-707.
- Fatoohi, A. F., Cozon, G. J., Gonzalo, P., Mayencon, M., Greenland, T., Picot, S., and Peyron, F. (2004). Heterogeneity in cellular and humoral immune responses against *Toxoplasma gondii* antigen in humans. *Clin. Exp. Immunol.* **136**, 535-541.
- Fazaeli, A., Carter, P. E., Darde, M. L., and Pennington, T. H. (2000). Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by *GRA6* gene sequence analysis. *Int. J. Parasitol.* **30**, 637-642.
- Ferguson, D. J. and Hutchison, W. M. (1987). An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* **73**, 483-91.
- Ferguson, D. J. P., Cesbron-Delauw, M. F., Dubremetz, J. F., Sibley, L. D., Joiner, K. A. and Wright, S. (1999a). The expression and distribution of dense granule proteins in the enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Exp. Parasitol.* **91**, 203-211.
- Ferguson, D. J. P., Jacobs, D., Saman, E., Dubremetz, J. F., and Wright, S. E. (1999b). *In vivo* expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the exoenteric (tachyzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* **119**, 259-265.
- Ferguson, D. J. P. (2004). Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J. Parasitol.* **34**, 347-360.
- Ferrandiz, J., Mercier, C., Wallon, M., Picot, S., Cesbron-Delauw, M. F., and Peyron, F. (2004). Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 1016-1021.
- Ferro, M., Salvi, D., Brugiére, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J. and Rolland, N. (2003). Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* **2**, 325-345.
- Fichera, M. E. and Roos, D. S. (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature.* **390**, 407-409.
- Finlay, B. B. and Cossart, P. (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* **276**, 718-725.
- Fischer, H. G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H. E., Reichmann, G. (1998). GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**, 251-262.
- Fischer, T., Lu, L., Haigler, H. T. and Langen, R. (2007). Annexin b12 is a sensor of membrane curvature and undergoes major curvature-dependent structural changes. *J. Biol. Chem.* **282**, 9996–10004.
- Ford, M. G. J., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J. K., Evans, P. R. and McMahon, H. T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature.* **419**, 361–366.
- Fortier, B and Dubremetz, J. F. (1993). Structure et biologie de *Toxoplasma gondii*. *Med. Mal. Infect.* **23 special**, 148-153.
- Foussard, F., Leriche, M. A. and Dubremetz, J. F. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology.* **102**, 367-370.
- Fowler, R. E., Margos, G. and Mitchell, G. (2003). The cytoskeleton and motility in Apicomplexan invasion. *Adv. Parasitol.* **56**, 213-263.

- Frenkel, J. K. (1953). Host, strain and treatment variation as factors in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2**, 390-415.
- Frenkel, J. K., Dubey, J. P. and Miller, N. L. (1969). *Toxoplasma gondii* : fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. *Science*. **164**, 432-433.
- Froissard, M., Kissmehl, R., Dedieu, J. C., Gulik-Krzywicki, T., Plattner, H. and Cohen, J. (2002). N-ethylmaleimide-sensitive factor is required to organize functional exocytotic microdomains in *Paramecium*. *Genetics*. **161**, 643-650.
- Furtado, G. C., Cao, Y. and Joiner, K. A. (1992). Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the $\beta 1$ integrin receptor $\alpha 6\beta 1$ on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* **60**, 4925-4931.
- Galat, A. (2003). Peptidylprolyl cis/transisomerases (immunophilins): biological diversity - targets –functions. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 1315-1347.
- Gallop, J. L., Jao, C. C., Kent, H. M., Butler, P. J. G., Evans, P. R., Langen, R. and McMahon, H. T. (2006). Mechanism of endophilin n-bar domain-mediated membrane curvature. *EMBO J.* **25**, 2898–2910.
- Gallusser, A. and Kuhn, A. (1990). Initial steps in protein membrane insertion: bacteriophage m13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction. *EMBO J.* **9**, 2723–2729.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. J. and Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120.
- Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G. and Beckers, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Biol.* **165**, 383-393.
- Gatkowska, J., Hiszczynska-Sawicka, E., Kur, J., Holec, L. and Dlugonska, H. (2006). *Toxoplasma gondii* : an evaluation of diagnostic value of recombinant antigens in a murine model. *Exp. Parasitol.* **114**, 220-227.
- Gilbert, L. A., Ravindran, S., Turetzky, J. M., Boothroyd, J. C. and Bradley, P. J. (2007). *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nucleus of infected host cells. *Eukaryot Cell.* **6**, 73-83.
- Golkar, M., Rafati, S., Abdel-Latif, M. S., Brenier-Pinchart, M. P., Fricker-Hidalgo, H., Sima, B. K., Babaie, J., Pelloux, H., Cesbron-Delauw, M. F. and Mercier, C. (2007a). The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection : comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* In press.
- Golkar, M., Shokrgozar, M. A., Rafati, S., Musset, K., Assmar, M., Sadaie, R., Cesbron-Delauw, M. F. and Mercier, C. (2007b). Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MLP) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine.* **25**, 4301-11.
- Gordon, J.L. and Sibley, L.D. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics.* **6**, 179.
- Gouaux, E. (1997). Channel-forming toxins: tales of transformation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 566-573.
- Gowda, D. C. and Davidson, E. A. (1999). Protein glycosylation in the malaria parasite. *Parasitol. Today.* **15**, 147-152.
- Grimwood, J. and Smith, J. E. (1996). *Toxoplasma gondii* : The role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int. J. Parasitol.* **26**, 169-173.
- Gruner, S. M. (1985). Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition : a role for nonbilayer lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**, 3665–3669.

- Gubbels, M. J., Wieffer, M. and Striepen, B. (2004). Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii* : identification of a novel inner membrane complex component conserved among *Apicomplexa*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **137**, 99-110.
- Gubbels, M. J., Striepen, B., Shastri, N., Turkoz, M., Robey, E. A. (2005). Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **73**, 703-711.
- Gupta, N., Zahn, M. M., Coppens, I., Joiner, K. A. and Voelker, D. R. (2005). Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J. Biol. Chem.* **280**, 16345-16353.
- Hager, K. M., Striepen, B., Tilney, L. G. and Roos, D. S. (1999). The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* **112**, 2631-2638.
- Hakansson, S., Morisaki, H., Heuser, J. E. and Sibley, L. D. (1999). Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 3539-3547.
- Hakansson, S., Charron, A. J., Sibley, L. D. (2001). *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* **20**, 3132-3144.
- Hakim, F. T., Gazzinelli, R. T., Denkers, E., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. (1991). CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J. Immunol.* **147**, 2310-2316.
- Haldar, K., Hiller, N. L., Van Ooij, C. and Bhattacharjee, S. (2005). *Plasmodium* parasite proteins and the infected erythrocyte. *Trends Parasitol.* **21**, 402-403.
- Haldar, K., Kamoun, S., Hiller, N. L., Bhattacharje, S. and van Ooij, C. (2006). Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nat. Rev. Microb.* **4**, 922-932.
- Halonen, S. K. and Weidner, E. (1994). Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuole with host cell vimentin type intermediate filaments. *J. Eukaryot. Microbiol.* **41**, 65-71.
- Halonen, S. K., Weiss, L.M. and Chiu, F. C. (1998). Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* **28**, 815-823.
- Harder, T. and Simons, K. (1997). Caveolae, digs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 534-542.
- Harumoto, T. and Miyake, A. (1991). Defensive function of trichocysts in *Paramecium*. *J. Exp. Zool.* **260**, 84-92.
- Heintzelman, M. B. (2006). Cellular and molecular mechanics of gliding locomotion in eukaryotes. *Int. Rev. Cyt.* **251**, 79-129.
- Hendy, G. N., Li, T., Girard, M., Feldstein, R. C., Mulay, S., Desjardins, R., Day, R., Karaplis, A. C., Tremblay, M. L. and Canaff, L. (2006). Targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene : normal neuroendocrine dense-core secretory granules and increased expression of other granins. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1935-1947.
- Henriquez, F. L., Nickdel, M. B., McLeod, R., Lyons, R. E., Lyons, K., Dubremetz, J. F., Grigg, M. E., Samuel, B. U. and Roberts, C. W. (2005). *Toxoplasma gondii* dense granule protein 3 (GRA3) is a type I transmembrane protein that possesses a cytoplasmic dilysine (KKXX) endoplasmic reticulum (ER) retrieval motif. *Parasitol.* **131**, 1-11.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S. H. and von Heijne, G. (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature.* **433**, 377-381.
- High, K. P., Joiner, K. A. and Handschumacher, R. E. (1994). Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **269**, 9105-9112.

- Hill, D. and Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii* : transmission, diagnostic and prevention. *Clin. Microb. Infect.* **8**, 634-640.
- Hinshaw, J. E. and Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature.* **374**, 190–192.
- Hoppe, H. C., Ngo, H. M., Yang, M. and Joiner, K. A. (2000). Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 449-456.
- Horvath, C. A. J., Broeck, D. V., Boulet, G. A. V., Bogers, J. and Wolf, M. J. S. D. (2007). Epsin : Inducing membrane curvature. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* In press.
- Hosaka, M., Suda, M., Sakai, Y., Izumi, T., Watanabe, T. and Takeuchi, T. (2004). Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **279**, 3627-3634.
- Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Kato, T. and Takeuchi, T. (2005). Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. *J. Cell. Sci.* **118**, 4785-4795.
- Howe, D. K., and Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* **172**, 1561-1566.
- Howe, D. K., Summers, B. C., Sibley, L. D. (1996). Acute virulence in mice associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **64**, 5193-5198.
- Hu, K., Roos, D. S. and Murray, J. M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Biol.* **156**, 1039-1050.
- Hutchison, W. M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *J. Eukar. Microbiol.* **40**, 24-48.
- Iglic, A., Hägerstrand, H., Veranic, P., Plemenitas, A. and Kralj-Iglic, V. (2006). Curvature-induced accumulation of anisotropic membrane components and raft formation in cylindrical membrane protrusions. *J. Theor. Biol.* **240**, 368–373.
- Itoh, T. and De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta.* **1761**, 897-912.
- Jacobs, D., Dubremetz, J. F., Loyens, A., Bosman, F., Saman, E. (1998). Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**, 237-249.
- Jacobs, D., Vercammen, M., and Saman, E. (1999). Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 24-29.
- Jain, R. K., Chang, W. T., Geetha, C., Joyce, P. B. and Gorr, S. U. (2002). *In vitro* aggregation of the regulated secretory protein chromogranin A. *Biochem. J.* **368**, 605-610.
- Jewett, T. J. and Sibley, L. D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol. Cell.* **11**, 885-894.
- Johnson, A. M., Dubey, J. P. and Dame, J. B. (1986). Purification and characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **64**, 351-355.
- Johnson, T. M., Rajfur, Z., Jacobson, K. and Beckers, C. J. (2007). Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell.* In press.
- Joiner, K. A. and Roos, D. R. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii* : less is more. *J. Biol. Chem.* **157**, 557-563.

- Jones, T. C. and Hirsch, J. G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* **136**, 1173-1194.
- Jutras, I., Seidah, N. G. and Reudelhuber, T. L. (2000). A predicted alpha-helix mediates targeting of the proprotein convertase PC1 to the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 40337-40343.
- Karasov, A. O., Boothroyd, J. C. and Arrizabalaga, G. (2005). Identification and disruption of a rhoptry-localized homologue of sodium hydrogen exchangers in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **35**, 285-291.
- Karsten, V., Qi, H., Beckers, C. J., Reddy, A., Dubremetz, J. F., Webster, P. and Joiner, K. A. (1998). The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J. Cell Biol.* **141**, 1323-1333.
- Karsten, V., Hegde, R. S., Sinai, A. P., Yang, M. and Joiner, K. A. (2004). Transmembrane domain modulates sorting of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **279**, 26052-26057.
- Kasper, L. H. and Buzoni-Gatel, D. (1998). Some opportunistic parasitic infection in AIDS : Candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis and toxoplasmosis. *Parasitol. Today.* **14**, 150-156.
- Keeley, A. and Soldati, D. (2004). The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell. Biol.* **14**, 528-532.
- Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A. J., Boyle, J., Cole, R., Glover, D., Tanq, K., Paulsen, I. T., Berriman, M., Boothroyd, J. C., Pfefferkorn, E. R., Dubey, J. P., Ajioka, J. W., Roos, D. S., Wootton, J. C. and Sibley, L. D. (2005). Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2980-2992.
- Kiefer, D. and Kuhn, A. (1999). Hydrophobic forces drive spontaneous membrane insertion of the bacteriophage pf3 coat protein without topological control. *EMBO J.* **18**, 6299-6306.
- Killian, J. A. and Nyholm, T. K. M. (2006). Peptides in lipid bilayers : the power of simple models. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 473-479.
- Kim, T., Tao-Cheng, J. H., Eiden, L. E. and Loh, Y. P. (2001). Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell.* **106**, 499-509.
- Kim, T. and Loh, Y. P. (2006). Protease nexin-1 promotes secretory granule biogenesis by preventing granule protein degradation. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 789-798.
- Kissinger, J. C., Gajria, B., Li, L., Paulsen, I. T., Roos, D. S. (2003). Toxo DB : accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucl. Acid Res.* **31**, 234-236.
- Knoch, K. P., Bergert, H., Borgonovo, B., Saeger, H. D., Altkruger, A., Verkade, P. and Solimena, M. (2004). Polypyrimidine tract-binding protein promotes insulin secretory granule biogenesis. *Nat. Cell. Biol.* **6**, 207-214.
- Knoll, G. *et al.* (1991). Local trichocyst exocytosis provides an efficient escape mechanism for *Paramecium* cells. *Eur. J. Protistol.* **27**, 381-385.
- Knoll, L. J. and Boothroyd, J. C. (1998). Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 807-814.
- Kobayashi, S., Chikushi, A., Tougu, S., Imura, Y., Nishida, M., Yano, Y. and Matsuzaki, K. (2004). Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry.* **43**, 15610-15616.
- Köhler, S. (2006). Multi-membrane-bound structures of *Apicomplexa* : II. The ovoid mitochondrial cytoplasmic (OMC) complex of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Parasitol. Res.* **98**, 355-369.

- Kopečna, J., Jirku, M., Obornik, M., Tokarev, Y. S., Lukes, J. and Modry, D. (2006). Phylogenetic analysis of coccidian parasites from invertebrates : search for missing links. *Protist.* **157**, 173-183.
- Koster, G., VanDuijn, M., Hofs, B. and Dogterom, M. (2003). Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 15583–15588.
- Kong, J. T., Grigg, M. E., Uyetake, L., Parmley, S., and Boothroyd, J. C. (2003). Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J. Infect. Dis.* **187**, 1484-1495.
- Kuliawat, R., Prabakaran, D. and Arvan, P. (2000). Proinsulin endoproteolysis confers enhanced targeting of processed insulin to the regulated secretory pathway. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 1959-1972.
- Kwok, L. Y., Lutjen, S., Soltek, S., Soldati, D., Busch, D., Deckert, M., and Schluter, D. (2003). The induction and kinetics of antigen-specific CD8 T cells are defined by the stage specificity and compartmentalization of the antigen in murine toxoplasmosis. *J. Immunol.* **170**, 1949-1957.
- Labruyère, E., Lingnau, M., Mercier, C. and Sibley, L. D. (1999). Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **102**, 311-324.
- Ladokhin, A. S., Isas, J. M., Haigler, H. T. and White, S. H. (2002). Determining the membrane topology of proteins : insertion pathway of a transmembrane helix of annexin 12. *Biochemistry.* **41**, 13617–13626.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- Lakey, J. H., González-Mañas, J. M., van der Goot, F. G. and Pattus, F. (1992). The membrane insertion of colicins. *FEBS Lett.* **307**, 26–29.
- Lambert, H., Hitziger, N., Dellacasa, I., Svensson, M. and Barragan, A. (2006). Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell. Microb.* **8**, 1611-1623.
- Lane, A., Soete, M., Dubremetz, J. F. and Smith, J. E. (1996). *Toxoplasma gondii* : Appearance of specific markers during the development of tissue cysts *in vitro*. *Parasitol. Res.* **82**, 340-346.
- Lanzer, M., Wickert, H., Krohne, G., Vincensini, L. and Braun-Breton, C. (2006). Maurer's clefts : a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int. J. Parasitol.* **36**, 23-36.
- Lauer, S., Rathod, P. K., Ghori, N. and Haldar, K. (1997). A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malarial parasite. *Science.* **276**, 1122-1125.
- Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B. U., Hiller, N. L., Mohandas, N. and Haldar, K. (2000). Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* **19**, 3556-3564.
- Lavine, M. D. and Arrizabalaga, G. (2007). Invasion and egress by the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* : potential targets for the development of new antiparasitic drugs. *Cur. Pharm. Des.* **13**, 641-651.
- Leander, B. S., Lloyd, S. A. J., Marshall, W. and Landers, S. C. (2006). Phylogeny of marine gregarines (*Apicomplexa*) – *Pterospira*, *Lithocystis* and *Lankesteria* – and the origins of coelomic parasitism. *Protist.* **157**, 45-60.
- Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P. J., Vial, H. and Dubremetz, J. F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 relocates at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell. Microbiol.* **7**, 1823-1833.
- Lebrun, M., Carruthers, V. B. and Cesbron-Delauw, M. F. (2007). *Toxoplasma* secretory proteins and their roles in cell invasion and intracellular survival. *Toxoplasma gondii: the model Apicomplexan: perspectives and methods.* Ed. L. Weiss and K. Kim. 265-307.

- Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J., Maes, P., Tartar, A., Capron, A., Cesbron-Delauw, M. F. (1993). Toxoplasma gondii : molecular structure of a dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 143-153.
- 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 *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* **70**, 85-94.
- Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L. D. and Cesbron-Delauw, M. F. (1999). Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 1277-1287.
- Lecordier, L., Fourmaux, M. P., Mercier, C., Dehecq, E., Masy, E., and Cesbron-Delauw, M. F. (2000). Enzyme-linked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**, 607-611.
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O. A., Ochoa, G. C., Farsad, K., Wenk, M. R. and de Camilli, P. D. (2002). Amphiphysin 2 (bin1) and t-tubule biogenesis in muscle. *Science.* **297**, 1193–1196.
- Lee, A. G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1666**, 62–87.
- Lee, M. C. S., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M. and Schekman, R. (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell.* **122**, 605–617.
- Le Gall, S., Neuhof, A. and Rapoport, T. (2004). The endoplasmic reticulum membrane is permeable to small molecules. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 447-455.
- Lekutis, C., Ferguson, D. J. P., Grigg, M. E., Camps, M. and Boothroyd, J. C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii* : variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* **31**, 1285-1292.
- Lemgruber, L., De Souza, W. and Vommaro, R. C. (2007). Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. *Micron*. In press.
- Leon, G., Fiori, C., Das, P., Moreno, M., Tovar, R., Sanchez-Salas, J. L. and Munoz, M. L. (1997). Electron probe analysis and biochemical characterization of electron-dense granules secreted by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **85**, 233-242.
- Liendo, A., Stedman, T. T., Ngô, H. M., Chaturvedi, S., Hoppe, H. C. and Joiner, K. A. (2001). *Toxoplasma gondii* ADP-ribosylation factor 1 mediates enhanced release of constitutively secreted dense granule proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 18272-18281.
- Ling, Y. M., Shaw, M. H., Ayala, C., Coppens, I., Taylor, G. A., Ferguson, D. J. and Yap, G. S. (2006). Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J. Exp. Med.* **203**, 2063-2071.
- Loh, Y. P., Maldonado, A., Zhang, C., Tam, W. H. and Cawley, N. (2002). Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **971**, 416-425.
- Lomize, M., Lomize, A., Pogozheva, I. and Mosberg, H. (2006). Opm : Orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics.* **22**, 623–625. <http://opm.phar.umich.edu/>.
- Lou, H., Kim, S. K., Zaitsev, E., Snell, C. R., Lu, B. and Loh, Y. P. (2005). Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase E. *Neuron.* **45**, 245-255.
- Luo, S., Ruiz, F. A. and Moreno, S. N. (2005). The acidocalcisome Ca²⁺-ATPase (TgA1) of *Toxoplasma gondii* is required for polyphosphate storage, intracellular calcium homeostasis and virulence. *Mol. Microb.* **55**, 1034-1045.
- MacLaren, A., Attias, M. and De Souza, W. (2004). Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with neutrophils. *Vet. Parasitol.* **125**, 301-312.

- Madeddu, L., Gautier, M. C., Vayssie, L., Houari, A. and Sperling, L. (1995). A large multigene family codes for the polypeptides of the crystalline trichocyst matrix in *Paramecium*. *Mol. Biol. Cell.* **6**, 649-659.
- Magno, C. R., Straker, L. C., De Souza, W. and Attias, M. (2005a). Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc. Microanal.* **11**, 166-174.
- Magno, C. R., Lemgruber, L., Vommaro, R. C., De Souza, W. and Attias, M. (2005b). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Tech.* **67**, 45-52.
- Mant, A., Woolhead, C. A., Moore, M., Henry, R. and 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**, 36200–36206.
- Marioka, A. and Ohtomo, H. (1995). An increased DNA polymerase activity associated with virulence of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **81**, 1021-1022.
- Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G. and Howard, J. C. (2005). Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog.* **1**, e24.
- Martin, V., Supanitsky, A., Echeverria, P. C., Litwin, S., Tanos, T., De Roodt, A. R., Guarnera, E. A., and Angel, S. O. (2004). Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the *GRA4* gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 704-710.
- Martin, A. M., Liu, T., Lynn, B. C. and Sinai, A. P. (2007). The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane : transactions across the border. *J. Eukaryot. Microb.* **54**, 25-38.
- Matos, M. F., Mukherjee, K., Chen, X., Rizo, J. and Südhof, T. C. (2003). Evidence for SNARE zippering during Ca²⁺-triggered exocytosis in PC12 cells. *Neuropharmacology.* **45**, 777–786.
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R. G., Vilbois, F. and Gruenberg, J. (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science.* **303**, 531-534
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R. and Yeung, T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell.* **93**, 263–275.
- Matthews, E. E., Zoonens, M. and Engelman, D. M. (2006). Dynamic helix interactions in transmembrane signaling. *Cell.* **127**, 447-450.
- Mattila, P. K., Pykäläinen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V. O., Vihinen, H., Jokitalo, E. and Lappalainen, P. (2007). Missing-in-metastasis and IRS P53 deform PI(4,5)P₂-rich membranes by an inverse bar domain-like mechanism. *J. Cell. Biol.* **176**, 953–964.
- Mazumdar, J., Wilson, H., Masek, E., K, Hunter, C.A., and Striepen, B. (2006). Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 13192-13197.
- McLaughlin, S. and Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature.* **438**, 605-611
- McLeod, R., Mack, D. and Brown, C. (1991). *Toxoplasma gondii*-new advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol.* **72**, 109-121.
- McMahon, H. T. and Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling. *Nature.* **438**, 590–596.

- Meisel, R., Stachelhaus, S., Mevelec, M. N., Reichmann, G., Dubremetz, J. F., and Fischer, H. G. (1996). Identification of two alleles in the *GRA4* locus of *Toxoplasma gondii* determining a differential epitope which allows discrimination of type I versus type II and III strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* **81**, 259-263.
- Meissner, M., Schluter, D. and Soldati, D. (2002). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science.* **298**, 837-840.
- Meissner, M. and Soldati, D. (2005). The transcription machinery and the molecular toolbox to control gene expression in *Toxoplasma gondii* and other protozoan parasites. *Microbes Infect.* **7**, 1376-1384.
- Meldolesi, J., Chieragatti, E. and Luisa, M. M. (2004). Requirements for the identification of dense-core granules. *Trends Cell. Biol.* **14**, 13-19.
- Melo, E. J. L., Attias, M. and De Souza, W. (2000). The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Struct. Biol.* **130**, 27-33.
- Mercier, C., Lecordier, L., Darcy, F., Deslee, D., Murray, A., Tourvieille, B., Maes, P., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M.F. (1993). Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**, 71-82.
- Mercier, C., Lefebvre-Van Hende, S., Garber, G. E., Lecordier, L., Capron, A., Cesbron-Delauw, M. F. (1996). Common cis-acting elements critical for the expression of several dense granule genes of *Toxoplasma gondii*. *Molec. Microb.* **21**, 421-428.
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F. and Sibley, L. D. (1998a). The amphipatic alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J. Cell Sci.* **111**, 2171-2180.
- Mercier, C., Howe, D. K., Mordue, D. G., Lingnau, M. and Sibley, L. D. (1998b). Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect. Immun.* **66**, 4176-4182.
- 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**, 247-251.
- Mercier, C., Dubremetz, J. F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D. and Cesbron-Delauw, M. F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 2397-2409.
- Mercier, C., Adjogble, K. D. Z., Däubener, W. and Cesbron-Delauw, M. F. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all Apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* **35**, 1611-1620.
- Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F. and Ferguson, D. J. P. (2007). "Dense granules of the infectious stages of *Toxoplasma gondii* : Their central role in the host/parasite relationship" in "*Toxoplasma* : Molecular and Cellular Biology". (D. Soldati and J. Ajioka, eds) Horizon Bioscience p 475-492.
- Messina, M., Niesman, I., Mercier, C. and Sibley, L. D. (1995). Stable DNA transformation of *Toxoplasma gondii* using phleomycin selection. *Gene.* **165**, 213-217.
- Metsis, A., Pettersen, E. and Petersen, E. (1995). *Toxoplasma gondii* : characterization of a Monoclonal Antibody recognizing antigens of 36 and 38 kDa with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. *Exp. Parasitol.* **81**, 472-479.
- Mevelec, M. N., Chardès, T., Mercereau-Puijalon, O, Bourguin, I., Achabarou, A., Dubremetz, J. F., Bout, D. (1992). Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**, 227-238.

- Mevelec, M. N., Mercereau-Pujalon, O., Buzoni-Gatel, D., Bourguin, I., Chardes, T., Dubremetz, J. F., and Bout, D. (1998). Mapping of B epitopes in GRA4, a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* and protection studies using recombinant proteins administered by the oral route. *Parasite Immunol.* **20**, 183-195.
- Mevelec, M. N., Bout, D., Desolme, B., Marchand, H., Magne, R., Bruneel, O., and Buzoni-Gatel, D. (2005). Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine.* **23**, 4489-4499.
- Millard, T. H., Dawson, J. and Machesky, L. M. (2007). Characterisation of irtk, a novel irsp53/mim family actin regulator with distinct filament bundling properties. *J. Cell. Sci.* **120**, 1663–1672.
- Miller, S. A., Thathy, V., Ajioka, J. W., Blackman, M. J. and Kim, K. (2003). TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase. *Mol. Microb.* **49**, 883-894.
- Mineo, J. R. and Kasper, L. H. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol.* **79**, 11-20.
- Mital, J., Meissner, M., Soldati, D. and Ward, G. E. (2005). Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol. Biol. Cell.* **16**, 4341-4349.
- Molestina, R. E. and Sinai, A. P. (2005). Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host I κ B α . *Cell. Microbiol.* **7**, 351-362.
- Mondragon, R. and Frixione, E. (1996). Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**, 120-127.
- Monteiro, V. G., de Melo, E. J. T., Attias, M. and de Souza, W. (2001). Morphological changes during conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites treated with calcium ionophore. *J. Struct. Biol.* **136**, 181-189.
- Montoya, J. G. and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet.* **363**, 1965-1976.
- Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M. and Sibley, L. D. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* **190**, 1783-1792.
- Moreno, S. N. and Zhong, L. (1996). Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochem. J.* **313**, 655-659.
- Moreno, S. N. and Docampo, R. (2003). Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 359-364.
- Morisaki, J. H., Heuser, J. E. and Sibley, L. D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell. Sci.* **108**, 2457-2464.
- Morris, M. T., Coppin, A., Tomavo, S. and Carruthers, V. B. (2002). Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 45259-45266.
- Morris, M. T. and Carruthers, V. B. (2003). Identification and partial characterization of a second Kazal inhibitor in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **6**, 359-364.
- Morrisette, N. S. and Sibley, L. D. (2002a). Cytoskeleton of Apicomplexan parasites. *Microb. Mol. Biol. Reviews.* **66**, 21-38.
- Morrisette, N. S. and Sibley, L. D. (2002b). Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* **115**, 1017-1025.
- Moudy, R., Mannings, T. J. and Beckers, C. J. (2001). The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **276**, 41492-41501.

- Naguleswaran, A., Muller, N. and Hemphill, A. (2003). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* : a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite – host cell interactions. *Exp. Parasitol.* **104**, 149-158.
- Nakaar, V., Bermudes, D., Peck, K. R., and Joiner, K. A. (1998). Upstream elements required for expression of nucleoside triphosphate hydrolase genes of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**, 229-239.
- Nakaar, V., Samuel, B. U., Ngô, E. O., Joiner, K. A. (1999). Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. *J. Biol. Chem.* **274**, 5083-5087.
- Nakaar, V., Ngo, H. M., Aaronson, E. P., Coppens, I., Stedman, T. T. and Joiner, K. A. (2003). Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* **116**, 2311-2320.
- Neudeck, A., Stachelhaus, S., Nischik, N., Striepen, B., Reichmann, G. Fischer, H. G. (2002). Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes Infect.* **4**, 581-590.
- Ngô, H. M., Yang, M., Paprotka, K., Pypaert, M., Hoppe, H. and Joiner, K. A. (2003). AP-1 in *Toxoplasma gondii* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **278**, 5343-5352.
- Ngô H. M., Yang, M. and Joiner, K. A. (2004). Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? *Mol. Microb.* **52**, 1531-1541.
- Nichols, B. A. and Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* **38**, 52S-55S.
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L. and Pavesio, C. E. N. (1994). Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* **80**, 91-98.
- Nicolle, C. and Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi (*Toxoplasma gondii* N. Gen.). *Arch. Inst. Past. Tunis.* **1**, 97-103.
- Nischik, N., Schade, B., Dytnerka, K., Dlugonska, H., Reichmann, G., and Fischer, H. G. (2001). Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes Infect.* **3**, 689-699.
- Nishikawa, Y., Quittnat, F., Stedman, T. T., Voelker, D. R., Choi, J. Y., Zahn, M., Yang, M., Pypaert, M., Joiner, K. A. and Coppens, I. (2005). Host cell lipids control cholesteryl esters synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell. Microbiol.* **7**, 849-867.
- Nockemann, S., Dlugonska, H., Henrich, B., Kitzerow, A., Daübener, W. (1998). Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted-secreted antigen (ESA) from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **97**, 109-121.
- Odenthal-Schnittler, M., Tomavo, S., Becker, D., Dubremetz, J. F., Schwarz, R. T. (1993). Evidence for N-linked glycosylation in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. J.* **291**, 713-721.
- 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**, 15350-15357.
- Ozawa, H. and Tanaka, K. (1995). The granin family – its role in sorting and secretory granule formation. *Cell Struct. Funct.* **20**, 415-420.

- Papakrivov, J., Newbold, C. I. and Lingelbach, K. (2005). A potential novel mechanism for the insertion of a membrane protein revealed by a biochemical analysis of the *Plasmodium falciparum* cytoadherence molecule PfEMP-1. *Mol. Microb.* **55**, 1272-1284.
- Parker, M. W. and Pattus, F. (1993). Rendering a membrane protein soluble in water : a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem Sci.* **18**, 391–395.
- Parmley, S. F., Sgarlato, G. D. and Remington, J. S. (1993). Genomic and corrected sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **57**, 161-166.
- Paschen, S. A. and Neupert, W. (2001). Protein import into mitochondria. *IUBMB Life.* **52**, 101–112.
- Patron, S.A., Mondragon, M., Gonzalez, S., Ambrosio, J.R., Guerrero, B.A.L. and Mondragon, R. (2005). Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* **35**, 883-894.
- Pelletier, L., Stern, C. A., Pypaert, M., Sheff, D., Ngo, H. M., Roper, N., He, C. Y., Hu, K., Toomre, D., Coppens, I., Roos, D. S., Joiner, K. A. and Warren, G. (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature.* **418**, 548-552.
- Pepper, M., Dzierszynski, F., Crawford, A., Hunter, C. A., and Roos D. S. (2004). Development of a system to study CD4+T-cell responses to transgenic ovalbumin-expressing *Toxoplasma gondii* during toxoplasmosis. *Infect. Immun.* **72**, 7240-7246.
- Perkins, M. E. (1992). Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitol. Today.* **8**, 28-32.
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R. and McMahon, H. T. (2004). Bar domains as sensors of membrane curvature : the amphiphysin bar structure. *Science.* **303**, 495–499.
- Pfreppe, K. I., Enders, G., Gohl, M., Krczal, D., Hlobil, H., Wassenberg, D., and Soutschek, E. (2005). Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 977-982.
- Pietkiewicz, H., Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Petersen, E., Nielsen, H. V., Stankiewicz, M., Andrzejewska, I., and Myjak, P. (2004). Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1779-1781.
- Pietkiewicz, H., Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., Petersen, E., Nielsen, H. V., Paul, M. and Myjak, P. (2007). Usefulness of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, GRA7 and SAG1) in a immunoglobulin G avidity test for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Parasitol. Res.* **100**, 333-337.
- Phoenix, D. A., Harris, F., Daman, O. A. and Wallace, J. (2002). The prediction of amphiphilic alpha-helices. *Curr. Protein Pept. Sci.* **3**, 201-221.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* **112**, 453–465.
- Popot, J. L. and Engelman, D. M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization : the two-stage model. *Biochemistry.* **29**, 4031–4037.
- Poupel, O., Boleti, H., Axisa, S., Couture-Tosi, E. and Tardieux, I. (2000). Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 355-368.
- Praefcke, G. J. K. and McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily : universal membrane tubulation and fission molecules ? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 133–147.
- Prigione, I., Facchetti, P., Lecordier, L., Deslee, D., Chiesa, S., Cesbron-Delauw, M. F., and Pistoia, V. (2000). T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma 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**, 3741-3748.

- Przyborski, J. M., Wickert, H., Krohne, G. and Lanzer, M. (2003). Maurer's clefts – a novel secretory organelle? *Mol. Biochem. Parasitol.* **132**, 17-26.
- Pszenny, V., Angel, S. O., Duschak, V. G., Paulino, M., Ledesma, B., Yabo, M. I., Guarnera, E., Ruiz, A. M. and Bontempi, E. J. (2000). Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **107**, 241-249.
- Pszenny, V., Ledesma, B., Matrajt, M., Duschak, V. G., Bontempi, E. J., Dubremetz, J. F. and Angel, S. O., (2002). Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine protease inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **121**, 283-286.
- Que, X., Ngo, H., Lawton, J., Gray, M., Liu, Q., Engel, J., Brinen, L., Ghosh, P., Joiner, K. A., and Reed, S. L. (2002). The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. *J. Biol. Chem.* **277**, 25791-25797.
- Que, X., Engel, J. C., Ferguson, D., Wunderlich, A., Tomavo, S. and Reed, S. L. (2007). Cathepsin Cs are key for the intracellular survival of the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **282**, 4994-5003.
- Quittnat, F., Nishikawa, Y., Stedman, T. T., Voelker, D. R., Choi, J. Y., Zahn, M. M., Murphy, R. C., Barkley, R. M., Pypaert, M., Joiner, K. A. and Coppens, I. (2004). On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes : synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* GDAT1-related enzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.* **138**, 107-122.
- Rayapuram, N. and Subramani, S. (2006). The importomer—a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**, 1613–1619.
- Redlich, A., and Muller, W. A. (1998). Serodiagnosis of acute toxoplasmosis using a recombinant form of the dense granule antigen GRA6 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol. Res.* **84**, 700-706.
- Reichmann, G., Stachelhaus, S., Meisel, R., Mevelec, M. N., Dubremetz, J. F., Dlugonska, H. and Fischer, H. G. (1997). Detection of a novel 40,000 MW excretory *Toxoplasma* antigen by murine Th1 clone which induces toxoplasmaicidal activity when exposed to infected macrophages. *Immunology.* **92**, 284-289.
- Reiner, D. S., McCaffery, J. M. and Gillin, F. D. (2001). Reversible interruption of *Giardia lamblia* cyst wall protein transport in a novel regulated secretory pathway. *Cell. Microb.* **3**, 459-472.
- Remington, J. S. and Krahenbuhl, J. L. (1982). Immunology of *Toxoplasma gondii*. Comprehensive immunology, R.J.O.R.A.J. Nahmias, ed., Plenum Publishing Company, New York, London, 327-371.
- Ren, G., Vajjhala, P., Lee, J. S., Winsor, B. and Munn, A. L. (2006). The bar domain proteins : molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 37–120.
- Risco-Castillo, V., Fernandez-Garcia, A. and Ortega-Mora, L.M. (2004). Comparative analysis of stress agents in a simplified *in vitro* system of *Neospora caninum* bradyzoite production. *J. Parasitol.* **90**, 466-470.
- 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**, 747-749.
- Roos, D. S. (1993) Primary structure of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **268**, 6269-6280.
- Roos, D. S., Donald, R. G., Morissette, N. S., Moulton, A. L. (1994). Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Meth. Cell. Biol.* **45**, 27-63.
- Roosild, T. P., Greenwald, J., Vega, M., Castronovo, S., Riek, R. and Choe, S. (2005). NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression. *Science.* **300**, 1317-1321.
- Rorman, E., Zamir, C. S., Rilakis, L. and Ben-David, H. (2006). Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reprod. Toxicol.* **21**, 458-472.

- Rosati, G. and Modeo, L. (2003). Extrusomes in ciliates : diversification, distribution, and phylogenetic implications. *J. Eukaryot. Microbiol.* **50**, 383-402.
- Roux, A., Cappello, G., Cartaud, J., Prost, J., Goud, B. and Bassereau, P. (2002). A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 5394–5399.
- Ruffiot, P. (2007). Développement de systèmes membranaires modèles pour la vacuole parasitophore de *Toxoplasma gondii* : Interactions des protéines de granules denses (protéines GRA) avec des vésicules unilamellaires. Thèse de l'Université Joseph Fourier soutenue publiquement le 11 juillet 2007.
- Saavedra, R., De Meuter, F. and Herion, P. (1990). Monoclonal antibodies identify new *Toxoplasma gondii* soluble antigens. *Hybridoma.* **9**, 453-463.
- Sabin, A. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* **116**, 801–807.
- Saksouk, N., Bhatti, M. M., Kieffer, S., Smith, A. T., Musset, K., Garin, J., Sullovan, W. J., Cesbron-Delauw, M. F. and Hakimi, M. A. (2005). Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10301-10314.
- Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J. and Dalbey, R. E. (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature.* **406**, 637–641.
- Santos de Macedo, C., Shams-Eldin, H., Smith, T. K., Schwarz, R. T. and Azzouz, N. (2003). Inhibitors of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Biochimie.* **85**, 465-472.
- Saouros, S., Edwards-Jones, B., Reiss, M., Sawmynaden, K., Cota, E., Simpson, P., Dowse, T. J., Jakle, U., Ramboarina, S., Shivarattan, T., Matthews, S. and Soldati-Favre, D. (2005). A novel galectin-like domain from *Toxoplasma gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly and transport of a cell-adhesion complex. *J. Biol. Chem.* **280**, 38583-38591.
- Sapay, N., Guermeur, Y. and Deléage, G. (2006). Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. *BMC Bioinformatics.* **7**, 255-266.
- Schatten, H., Sibley, L. D. and Ris, H. (2003). Structural evidence for actin-like filaments in *Toxoplasma gondii* using high-resolution low-voltage field emission scanning electron microscopy. *Microsc. Microanal.* **9**, 330-335.
- Schatten, H. and Ris, H. (2004). Three-dimensional imaging of *Toxoplasma gondii*-host cell interactions within the parasitophorous vacuole. *Microsc. Microanal.* **10**, 580-585.
- Schiffer, M. and Edmundson, A. B. (1967). Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* **7**, 121-135.
- Schneider, R. and Toulmay, A. (2007). The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1224–1232.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J. and 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**, 509-513.
- Schwarz, R. T. and Tomavo, S. (1993). The current status of the glycobiology of *Toxoplasma gondii* : glycosylphosphatidylinositol, N- and O-linked glycans. *Res. Immunol.* **144**, 24-31.
- Scorza, T., De Souza, S., Laloup, M., Dewit, J., De Braekeleer, J., Verschueren, H., Vercammen, M., Huygen, K., and Jongert, E. (2003). A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8(+) T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* **71**, 309-316.
- Seeber, F. (1997). Consensus sequence of translational initiation sites from *Toxoplasma gondii* genes. *Parasitol Res.* **83**, 309-311.

- Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H., Brouillette, C.G., Venkatachalapathi, Y. V. and Anantharamaiah, G. M. (1992). The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins : a review of secondary structure and function. *J. Lipid. Res.* **33**, 141-166.
- Sehgal, A., Bettiol, S., Pypaert, M., Wenk, M. R., Kaasch, A., Blader, I. J., Joiner, K. A. and Coppens, I. (2005). Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. *Traffic*. **6**, 1125-1141.
- Sergent, V., Cautain, B., Khalife, J., Deslée, D., Bastien, P., Dao, A., Dubremetz, J. F., Fournié, G. J., Saoudi, A. and Cesbron-Delauw, M. F. (2005). Innate refractoriness of the Lewis rat to toxoplasmosis is a dominant trait that is intrinsic to bone marrow-derived cells. *Infect. Immun.* **73**, 6990-6997.
- 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**, 55–70.
- Sharadadevi, A., Sivakamasundari, C. and Nagaraj, R. (2005). Amphipathic alpha-helices in proteins: results from analysis of protein structures. *Proteins.* **59**, 791-801.
- Sharma, S. D., Araujo, F. G., and Remington, J. S. (1984). *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **133**, 2818-2220.
- Shaw, M. K. and Tilney, L. G. (1999). Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 9095-9099.
- Shibata, Y., Voeltz, G. K. and Rapoport, T. A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell.* **126**, 435–439.
- Sibley, L. D., Krahenbuhl, J. L., Adams, G. M. and Weidner, E. (1986). *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell. Biol.* **103**, 867-874.
- Sibley, L. D., Pfefferkorn, E. R. and Boothroyd, J. C. (1991). Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today.* **7**, 327-328.
- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Asai, T. and Takeuchi, T. (1994). *Toxoplasma gondii* : secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* **79**, 301-311.
- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F. and 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 *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* **108**, 1669-1677.
- Sibley, L. D. and Andrews, N. W. (2000). Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic.* **1**, 100-106.
- Sibley, L. D. (2003). *Toxoplasma gondii* : perfecting an intracellular life style. *Traffic.* **4**, 581-586.
- Silverman, J. A., Qi, H., Riehl, A., Beckers, C., Nakaar, V. and Joiner, K. A. (1998). Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 12352-12359.
- Sims, T. A., Hay, J. and Talbot, I. C. (1988). Host-parasite relationship in the brains of mice with congenital toxoplasmosis. *J. Pathol.* **156**, 255-261.
- Sinai, A. P., Webster, P. and Joiner, K. A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane : a high affinity interaction. *J. Cell. Sci.* **110**, 2117-2128.
- Sinai, A. P. and Joiner, K. A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell. Biol.* **154**, 95-108.
- Sinai, A. P., Payne, T. M., Carmen, J. C., Hardi, L., Watson, S. J. and Molestina, R. E. (2004). Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **34**, 381-391.

- Soete, M., Fortier, B., Camus, D. and Dubremetz, J.F. (1993a). *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **76**, 259-264.
- Soete, M., Fortier, B., Camus, D. and Dubremetz, J. F. (1993b). *Toxoplasma gondii* : patterns of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Toxoplasmosis. Series H : Cell Biology*, J. E. Smith, ed., 93-98.
- Soete, M., Camus, D. and Dubremetz, J. F. (1994). Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii in vitro*. *Exp. Parasitol.* **78**, 361-370.
- Soldati, D. and Boothroyd, J. C. (1993). Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science.* **260**, 349-352.
- Soldati, D., Dubremetz, J. F. and Lebrun, M. (2001). Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **31**, 1293-1302.
- Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V., Prinetti, A. (2007). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology.* **17**, 1R-13R.
- Splendore, A. (1909). Sur un nouveau parasite du lapin. Deuxième note préliminaire. *Bull. Soc. Path. Exot.* **2**, 462-465.
- Srinivasan, S., Alexander, H. and Alexander, S. (2000). Crossing the finish line of development : regulated secretion of *Dictyostelium* proteins. *Trends Cell. Biol.* **10**, 215-219.
- Stedman, T. T. and Joiner, K. A. (1999). En route to the vacuole. Tracing the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. In *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles*. Vol. 6. pp 23-261. JAI Press Inc.
- Stedman, T. T., Sussmann, A. R. and Joiner, K. A. (2003). *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 5433-43.
- Steiner, D. F. (1998). The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 31-39.
- Stommel, E. W., Ely, K. H., Schwartzman, J. D. and Kasper, L. H. (1997). *Toxoplasma gondii* : dithiol-induced Ca²⁺ flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* **87**, 88-97.
- Stoud, R. M., Walter, P. (1999). Signal sequence recognition and protein targeting. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 754-759.
- Striepen, B., Soldati, D., Garcia-Reguet, N., Dubremetz, J. F. and Roos, D. S. (2001). Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **113**, 45-53.
- Su, C., Howe, D. K., Dubey, J. P., Ajioka, J. W., Sibley, L. D. (2002). Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Acad. Sci. USA.* **99**, 10753-10758.
- Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T. and Yokoyama, S. (2006). The rac binding domain/irsp53-mim homology domain of irsp53 induces rac-dependent membrane deformation. *J. Biol. Chem.* **281**, 35347-35358.
- Supply, P., Sutton, P., Coughlan, S. N., Bilo, K., Saman, E., Trees, A. J., Cesbron Delauw, M. F., and Loch, C. (1999). Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* **17**, 705-714.
- Sweitzer, S. M. and Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell.* **93**, 1021-1029.
- Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L. and de Camilli, P. D. (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature.* **374**, 186-190.
- Tarleton, R. L. (2005). New approaches in vaccine development for parasitic infections. *Cell Microbiol.* **7**, 1379-1386.
- Taupenot, L., Harper, K. L., Mahapatra, N. R., Parmer, R. J., Mahata, S. K. and O'Connor, D. T. (2002). Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A. *J. Cell. Sci.* **115**, 4827-4841.

- Taupenot, L., Harper, K. L. and O'Connor, D. T. (2005). Role of H⁺-ATPase-mediated acidification in sorting and release of the regulated secretory protein chromogranin A : evidence for a vesiculogenic function. *J. Biol. Chem.* **280**, 3885-3897.
- Tenant-Flowers, M., Boyle, M. J., Carey, D., Marriott, D. J., Harkness, J. L., Penny, R. and Cooper, D. A. (1991). Sulphadiazine desensitisation in patients with AIDS and cerebral toxoplasmosis. *AIDS*, **5**, 311-315.
- Tenter, A. M., Heckerroth, A. R. and Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii* : from animals to human. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1217-1258.
- Teo, C. F., Zhou, X. W., Bogyo, M. and Carruthers, V. B. (2007). Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 679-688.
- Tomavo, S. and Boothroyd, J. C. (1995). Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **25**, 1293-1299.
- Tooze, S. A. (1998). Biogenesis of secretory granules in the *trans*-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1404**, 231-244.
- Torii, S., Saito, N., Kawano, A., Zhao, S., Izumi, T. and Takeuchi, T. (2005). Cytoplasmic transport signal is involved in phogrin targeting and localization to secretory granules. *Traffic*, **6**, 1213-1224.
- Turkewitz, A. P. (2004). Out with a bang! *Tetrahymena* as a model system to study secretory granule biogenesis. *Traffic*, **5**, 63-68.
- Van, T. T., Kim, S. K., Camps, M., Boothroyd, J. C. and Knoll, L. J. (2007). The BSR4 protein is up-regulated in *Toxoplasma gondii* bradyzoites, however the dominant surface antigen recognised by the P36 monoclonal antibody is SRS9. *Int. J. Parasitol.* In press.
- Van der Goot, F. G., Gonzalez-Manas, J. M., Lakey, J. H. and Pattus, F. (1991). A "molten-globule" membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* **354**, 408-410.
- van Klompenburg, W. and de Kruijff, B. (1998). The role of anionic lipids in protein insertion and translocation in bacterial membranes. *J. Membr. Biol.* **162**, 1-7.
- Van Ooij, C. and Haldar, K. (2007). Protein export from *Plasmodium* parasites. *Cell. Microb.* **9**, 573-582.
- Vayssie, L., Skouri, F., Sperling, L. and Cohen, J. (2000). Molecular genetics of regulated secretion in *Paramecium*. *Biochimie.* **82**, 269-288.
- Veenhuis, M., Van Wijk, C., Wyss, U., Nordbring-Hertz, B. and Harder, W. (1989). Significance of electron dense microbodies in trap cells of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **56**, 251-261.
- Verbsky, J. W. and Turkewitz, A. P. (1998). Proteolytic processing and Ca²⁺-binding activity of dense-core vesicle polypeptides in *Tetrahymena*. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 497-511.
- Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., De Braekeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E., and Verschueren, H. (2000). DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.* **68**, 38-45.
- Vivier, E. and Petitprez, A. (1969). Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Biol.* **43**, 329-342.
- Vivier, E. and Petitprez, A. (1972). Données ultrastructurales complémentaires morphologiques et cytochimiques sur *Toxoplasma gondii*. *Protist.* **8**, 199-221.
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M. and Rapoport, T. A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell.* **124**, 573-586.

- von Heijne, G. (1997). Getting greasy : how transmembrane polypeptide segments integrate into the lipid bilayer. *Mol. Microbiol.* **24**, 249–253.
- Vonlaufen, N., Guetg, N., Naguleswaran, A., Muller, N., Bjorkman, C., Schares, G., Blumroeder, D. V., Ellis, J. and Hemphill, A. (2004). *In vitro* induction of *Neospora caninum* bradyzoites in Vero cells reveals differential antigen expression, localization, and host-cell recognition of tachyzoites and bradyzoites. *Infect. Immun.* **72**, 576-583.
- Vyas, A., Kim, S. K., Giacomini, N., Boothroyd, J. C. and Sapolsky, R. M. (2007). Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 6442-6447.
- Waller, R. F. and McFadden, G. I. (2005). The apicoplast : a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr. Issues Mol. Biol.* **7**, 57-79.
- Wasmeier, C., Bright, N. A. and Hutton, J. C. (2002). The luminal domain of the integral membrane protein phogrin mediates targeting to secretory granules. *Traffic.* **3**, 654-665.
- Wasmeier, C., Burgos, P. V., Trudeau, T., Davidson, H. W. and Hutton, J. C. (2005). An extended tyrosine-targeting motif for endocytosis and recycling of the dense-core vesicle membrane protein phogrin. *Traffic.* **6**, 474-487.
- Waterman-Storer, C. M., Gregory, J., Parsons, S. F. and 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**, 1161–1169.
- Waterman-Storer, C. M. and Salmon, E. D. (1998). Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr. Biol.* **8**, 798–806.
- Watts, F. Z. (2004). SUMO modification of proteins other than transcription factors. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **15**, 211-220.
- Webster, J. P. (2001). Rats, cats, people and parasites : the impact of latent toxoplasmosis on behaviour. *Microbes Infect.* **3**, 1037–1045.
- 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, moodstabilizer and anti-parasite medication on *T. gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proc Biol Sci.* **273**, 1023–1030.
- Weiss, L. M., Laplace, D., Takvorian, P. M., Tanowitz, H. B., Cali, A. and Wittner, M. (1995). A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**, 150-157.
- Weiss, L. M. and Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers Biosci.* **5**, 391-405.
- White, S. H., Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S. and Hristova, K. (2001). How membranes shape protein structure. *J. Biol. Chem.* **276**, 32395–32398.
- Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E. and Neckers, L. M. (1994). Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 8324-8328.
- Wichroski, M. J. and Ward, G. E. (2003). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol is essential to the survival of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell.* **2**, 1132-1136.
- Wickert, H., Wissing, F., Andrews, K. T., Stich, A., Krohne, G. and Lanzer, M. (2003). Evidence for trafficking of PfEMP1 to the surface of *P. falciparum*-infected erythrocytes via a complex membrane network. *Eur. J. Cell. Biol.* **82**, 271-284.
- Winkler, H. (1993). The adrenal chromaffin granule : a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *J. Anat.* **183**, 237-252.

- Yap, G. S. and Sher, A. (1999). Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* : initiation, regulation and effector function. *Immunobiology*. **201**, 240–247.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S. and Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. **308**, 1626-1629.
- Yarovinsky, F. and Sher, A. (2006). Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **36**, 255-259.
- Zakharov, S. D., Lindeberg, M., Griko, Y., Salamon, Z., Tollin, G., Prendergast, F. G. and 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**, 4282–4287.
- Zenner, L., Estaquier, J., Darcy, F., Maes, P., Capron, A., and 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**, 261-272.
- Zhang, Y. W., Halonen, S. K., Ma, Y. F., Wittner, M. and Weiss, L. M. (2001). Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect. Immun.* **69**, 501-507.
- Zhou, X. W., Kafsack, B. F., Cole, R. N., Beckett, P., Shen, R. F. and Carruthers, V. B. (2005). The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. *J. Biol. Chem.* **280**, 34233-34244.
- Zimmerberg, J. and Kozlov, M. M. (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 9–19.
- Zinecker, C.F., Striepen, B., Tomavo, S., Dubremetz, J.F. and Schwarz, R.T. (1998). The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. *Mol. Biochem. Parasitol.* **97**, 241-246.

RESUME

A l'interface avec la cellule hôte, la vacuole parasitophore du parasite intracellulaire *Toxoplasma gondii* comprend plusieurs systèmes membranaires, dont un réseau de nanotubes formé suite à la sécrétion de la protéine de granules denses GRA2. Mes travaux ont montré, par des approches biochimiques, que les protéines GRA membranaires forment des complexes oligomériques qui pourraient expliquer leur solubilité dans les granules denses et lors de leur sécrétion dans la vacuole. Par des approches moléculaires et cellulaires, j'ai analysé l'importance relative des trois hélices alpha-amphipatiques de GRA2 dans son association post-sécrétoire au réseau de nanotubes, via la liaison potentielle de la protéine à des phosphoinositides, et dans la tubulation du réseau induite par GRA2. Ces travaux ont permis de proposer un modèle d'interaction de GRA2 avec les membranes et de formation des tubules membranaires du réseau de nanotubes.

Mots clés : granules de sécrétion ; hélice alpha-amphipathique ; interactions protéine-protéine ; interactions protéine-lipide ; protozoaire ; tubules membranaires.

At the interface with the host cell compartment, the parasitophorous vacuole of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* comprises several membranous systems, including the membranous nanotubular network formed upon secretion of the dense granule protein GRA2. Using biochemical approaches, I have shown that the GRA proteins form oligomeric complexes, which could explain the solubility of these membrane proteins within the dense granules and after secretion into the vacuolar soluble fraction. Using molecular and cellular approaches, I have investigated the involvement of each of the three GRA2 amphipathic alpha-helices in post-secretory membrane association of the protein, likely *via* association to phosphatidylinositol phosphates, and in the GRA2 induced-formation of the membranous nanotubular network. These studies led us to propose models for the interaction of GRA2 with membranes and for the tubulation of the membranous nanotubular network.

Key words: amphipathic alpha-helix; membranous tubules; protein-protein interactions; protein-lipid interactions; protozoa; secretion granule.