



HAL
open science

Etude de l'adressage des protéines GRAs transmembranaires de *Toxoplasma gondii* aux granules denses et de leur insertion membranaire post-sécrétoire.

Claire Gendrin

► To cite this version:

Claire Gendrin. Etude de l'adressage des protéines GRAs transmembranaires de *Toxoplasma gondii* aux granules denses et de leur insertion membranaire post-sécrétoire.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00212284

HAL Id: tel-00212284

<https://theses.hal.science/tel-00212284>

Submitted on 22 Jan 2008

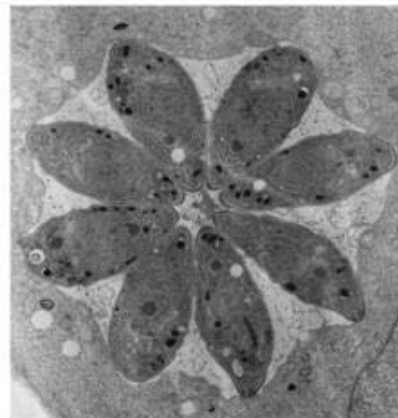
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

Thèse pour l'obtention du titre de
docteur de l'université Joseph Fourier

Discipline: sciences de la vie
6 décembre 2007

**Etude de l'adressage des protéines GRAs transmembranaires de
Toxoplasma gondii aux granules denses et de leur insertion
membranaire post-sécrétoire.**



Thèse présentée par

Claire Gendrin

Sous la direction du Dr M-F Cesbron-Delauw
Laboratoire d'Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes
UJF-CNRS 5163
Grenoble- FRANCE

Composition du jury:

Dr Andrea Dessen
Dr Stéphane Méresse
Pr Catherine Braun-Breton
Dr Marie-France Cesbron-Delauw
Dr Markus Meissner

Présidente du jury, IBS, UMR 5075, Grenoble
Rapporteur, CIML, UMR 6102, Marseille
Rapporteur, DIMNP, UMR 5235, Montpellier
Directrice de thèse, UMR 5163, Grenoble
Examineur, Hygieneinstitut Heidelberg, Allemagne

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de thèse Marie-France Cesbron-Delauw pour l'encadrement de qualité qu'elle a assuré au long de ma thèse. La pertinence de ses idées scientifiques m'ont permis de contourner de nombreux obstacles expérimentaux, et ainsi de surmonter les moments de découragement.

Merci à tous les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail, et spécialement aux rapporteurs, le Dr S. Méresse et le Pr C. Braun-Breton. Merci au Dr A. Dessen pour avoir accepté d'assurer la présidence du jury. Je remercie aussi le Dr M. Meissner qui a accepté de venir de loin pour éclairer mes résultats à la lumière de ses travaux sur les protéines de micronèmes.

Merci à tous les membres de l'équipe toxo du LAPM pour leurs conseils scientifiques et leur aide technique. Un merci spécial à Karine Musset sans qui tous ces travaux n'auraient pas été possibles... Merci aussi à l'ensemble du LAPM pour les bons moments partagés autour des pots d'anniversaire et autres...

Enfin, merci beaucoup à ma famille et à tous les amis qui m'ont soutenue au cours de ces trois ans. Une mention spéciale pour les amis informaticiens qui m'ont aidée à faire la mise-en-page de ce manuscrit jusque tard dans la nuit...

SOMMAIRE

Remerciements.....	2
SOMMAIRE	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION.....	9
I- <i>Toxoplasma gondii</i> : l'agent responsable de la toxoplasmose.....	9
I- 1- Cycle biologique	9
I- 2- Pathogénicité	11
I- 2- 1- Chez les sujets immunocompétents	11
I- 2- 2- Toxoplasmose de l'immunodéprimé.....	11
I- 2- 3- Toxoplasmose congénitale.....	12
I- 3- Etat actuel de la recherche anti-toxoplasmique.....	12
I- 3-1- Traitements existants	12
I- 3- 2 Vaccination.....	13
II- <i>Toxoplasma gondii</i> : une cellule infectieuse très compartimentalisée	14
II-1- Organisation subcellulaire du zoïte.....	15
II- 1- 1- La pellicule	16
II- 1- 2- L'apicoplaste	17
II- 1- 3- Le complexe apical	17
II- 1- 3- 1- Le conoïde et les anneaux	18
II- 1- 3- 2- Les micronèmes.....	18
II- 1- 3- 2- 1- Caractérisation moléculaire des protéines de micronèmes	19
II- 1- 3- 2- 2- Importance fonctionnelle des protéines de micronèmes	21
II- 1- 3- 3- Les rhoptries.....	22
II- 1- 3- 3- 1- Les protéines de rhoptries	22
II- 1- 3- 3- 2- Lipides contenus dans les rhoptries	23
II- 1- 4- Les granules denses, un organe caractéristique de <i>T. gondii</i>	24
II- 1- 4- 1- Les protéines de granules denses	24
II- 1- 4- 2- Fonctions des protéines de granules denses	26
II- 2- L'invasion et la formation de la vacuole parasitophore.....	28

II- 2- 1- Description morphologique de l'invasion	28
II- 2- 2- Mécanismes moléculaires de l'invasion	29
II- 2- 2- 1- Reconnaissance de la cellule-hôte	29
II- 2- 2- 2- Formation de la VP	30
II- 2- 2- 3- Maturation de la VP	31
III- Trafic subcellulaire des protéines de <i>Toxoplasma gondii</i> :	34
III- 1- Trafic dans le système sécrétoire précoce	34
III- 1- 1- Entrée dans le réticulum endoplasmique	34
III- 1- 2- Trafic entre le RE et l'appareil de Golgi	35
III- 2- Tri des protéines	38
III- 2- 1- Tri des protéines chez les eucaryotes supérieurs	38
III- 2- 2- Tri des protéines chez <i>T. gondii</i>	39
III- 2- 2- 1- Adressage aux granules denses	39
III- 2- 2- 1- 1- La voie par défaut pour les protéines solubles	39
III- 2- 2- 1- 2- Cas des GRAs transmembranaires	40
III- 2- 2- 2- Formation des micronèmes	40
III- 2- 2- 2- 1- protéines de micronèmes transmembranaires	40
III- 2- 2- 2- 2- protéines de micronèmes solubles	41
III- 2- 2- 3- Biogénèse des rhoptries	42
III- 3- Sécrétion des micronèmes, rhoptries et granules denses	45
III- 3- 1- Sécrétion des micronèmes	45
III- 3- 2- Exocytose des rhoptries	46
III- 3- 3- Sécrétion des granules denses : phénomène constitutif ou régulé ?	46
III- 4- Trafic post-sécrétoire chez <i>T. gondii</i>	48
III- 4- 1- Cas des protéines de micronèmes transmembranaires : insertion dans la MPP	48
III- 4- 2- Trafic post-sécrétoire des protéines de rhoptries	49
III- 4- 2- 1- Fusion de vésicules avec la MVP	49
III- 4- 2- 2- Adressage au noyau de la cellule-hôte	50
III- 4- 3- Association membranaire post-sécrétoire des protéines de granules denses	50
III- 4- 3- 1- Association aux membranes de la vacuole par des liaisons de type hydrogène	53
III- 4- 3- 2- Insertion dans les membranes du réseau	53
III- 4- 3- 3- Insertion dans la MVP	53

PROBLEMATIQUE et STRATEGIE	55
RESULTATS	59
I- Comparaison du trafic de GRA5 et de CD46 dans les deux systèmes d'expression	
Toxoplasme versus cellule de mammifère	59
I- 1- Expression de GRA5 en cellules de mammifères	59
I- 2- Expression de protéines de surface dans les parasites.....	62
I- 2- Expression de protéines de surface dans les parasites.....	63
I- 2- 1- Expression de CD46-TM CD46-CD46-HF dans les parasites	63
I- 2- 2- Expression de SAG1-TM CD46-CD46-HF dans les parasites	63
II- Etude de l'adressage de GRA5 aux GD	65
II- Etude de l'adressage de GRA5 aux GD	66
II- 1- Rôle des domaines peptide signal et C-terminal.....	66
II- 1- 1- Rôle du domaine PS dans l'adressage de GRA5 aux GD	66
II- 1- 2- Rôle du domaine Ct dans l'adressage et les propriétés biochimiques de GRA5 dans les GD	68
II- 1- 2- 1- Nécessité du domaine Ct de GRA5 dans ces processus.....	68
II- 1- 2- 2- Suffisance du domaine Ct de GRA5 dans ces phénomènes.....	69
II- 2- Rôle du domaine transmembranaire et du domaine Nt de GRA5 dans l'adressage soluble aux GD.....	71
II- 2- 1- Influence du TM dans le contexte du Nt SAG1	71
II- 2- 2- Influence du TM dans le contexte du Nt GRA5	73
II- 2- 2- 1- Résultats de transfection transitoire	73
II- 2- 2- 2- Résultats obtenus sur les clones stables	75
III- Etude de l'adressage sélectif des protéines GRAs dans la vacuole	77
III- 1- Adressage et insertion membranaire de GRA5 dans la MVP.....	77
III- 1- 1- Importance des domaines PS, TM et Ct dans ce phénomène.....	77
III- 1- 2- Importance du domaine Nt dans l'insertion membranaire post-sécrétoire de GRA5	80
III- 1- 2- Importance du domaine Nt dans l'insertion membranaire post-sécrétoire de GRA5	80
III- 2- Adressage de GRA6 aux membranes du RNM.....	83
III- 2- 1- Suffisance du domaine Nt de GRA6 pour l'insertion dans les membranes du RNM.....	83

III- 2- 1- Nécessité du domaine Nt pour l'insertion membranaire post-sécrétoire de GRA6	85
III- 3- Fusions GRA5/GRA6	87
DISCUSSION et PERSPECTIVES	89
I- Comparaison des deux systèmes d'expression <i>Toxoplasme versus</i> cellule de mammifère	90
I- 1- Les propriétés particulières de sécrétion des protéines GRAs sont propres au parasite	90
I- 2- Vers l'identification d'une nouvelle voie pour l'adressage des protéines transmembranaires à la surface de <i>T. gondii</i>	92
II- Déterminants de l'adressage soluble de GRA5 aux GD	94
I- 1- Les domaines Nt et TM de GRA5 sont impliqués dans l'adressage aux GD	94
I- 2- Mécanismes permettant la solubilisation de GRA5 dans les GD : hypothèses.....	97
I- 2- 1- Solubilisation par interactions protéine-protéines	97
I- 2- 2- Solubilisation par interactions protéine-lipides	100
III- Adressage spécifique des GRAs TM aux différents systèmes membranaires de la VP	103
III- 1- Importance du domaine Nt dans ce processus.....	103
III- 2- Mécanisme(s) de l'insertion membranaire post-sécrétoire : hypothèses.....	105
III- 2- 1- Interaction du domaine Nt avec des partenaires protéiques.....	107
III- 2- 2- Hypothèse de l'insertion spontanée dans les membranes de la VP.....	108
III- 2- 3- Hypothèse de l'association des GRAs dans des microvésicules lipidiques solubles à 100,000 x g.....	109
CONCLUSIONS GENERALES	111
ANNEXE	113
MATERIEL ET METHODES	114
I- Techniques de biologie moléculaire	114
I-1- Vecteurs utilisés	115
I-1-1- Vecteurs de clonage	115
I-1-2- Vecteurs matrices.....	115
I-1-3- Vecteurs de co-transfection.....	115
I-2- Stratégie de clonage	116
1-2-1- Vecteurs destinés à être transfectés dans les parasites	116
1-2-2- Vecteurs destinés à être transfectés dans les cellules de mammifère.....	118

II- Techniques de biologie cellulaire.....	124
II-1 Culture des parasites et des cellules	124
II-2- Transfection, sélection et clonage de <i>T. gondii</i>	124
II-2-1- Transfection des parasites.....	124
II-2-2- sélection et obtention de transformants stables	125
II-2-3- Clonage des parasites sélectionnés	127
II-3- Transfection transitoire des cellules de mammifères HEK 293-T.....	129
III- Analyse de l'expression des protéines chimères.....	129
III-1- Analyses informatiques	129
III-2- Immunofluorescence (IF)	130
III-3- Techniques de fractionnement cellulaire.....	130
III-3-1- Fractionnement cellulaire de parasites extracellulaires.....	130
III-3-2- Fractionnement de cellules infectées.....	131
III-3-3- Fractionnement des cellules HEK 293-T	131
III-4- Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE et détection des protéines par immunoblot	132
BIBLIOGRAPHIE	134

LISTE DES ABREVIATIONS

GD granules denses
VP vacuole parasitophore
MVP membrane de la vacuole parasitophore
RNM réseau de nanotubules membranaires
MPP membrane plasmique du parasite
EVP extensions de la vacuole parasitophore
HOST host organelles sequestering tubules
AES Antigènes d'excrétion-sécrétion
IMC complexe membranaire interne
JM jonction mobile
aa acides aminés
PS peptide signal
TM transmembranaire
Nt N-terminal
Ct C-terminal
RE Réticulum endoplasmique
TG trans-Golgi
LSP culot de centrifugation basse vitesse
LSS surnageant de centrifugation basse vitesse
HSP culot de centrifugation à haute vitesse
HSS surnageant de centrifugation à haute vitesse
S surnageant
P culot
I insoluble
D détergent
A aqueuse
NP-40 Nonidet P 40
IF immunofluorescence

INTRODUCTION

I- *Toxoplasma gondii* : l'agent responsable de la toxoplasmose

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire qui a été identifié pour la première fois en 1908 par Nicolle et Manceaux dans le Nord de l'Afrique et par Splendore au Brésil. Le genre *Toxoplasma* appartient au phylum des Apicomplexa, qui comprend plus de 4500 espèces de parasites protozoaires différentes. Les pathogènes du genre *Plasmodium* (responsable de la malaria chez l'homme) ou *Eimeria* (responsable de coccidioses chez les aviaires) appartiennent également à ce phylum.

I- 1- Cycle biologique

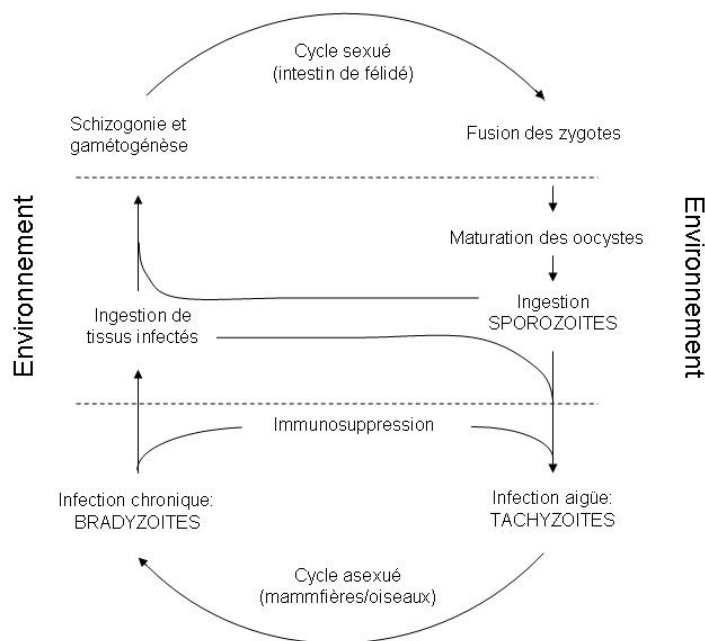


Fig.1 : Cycle biologique de *Toxoplasma gondii* (d'après Black and Boothroyd, 2000)

Toxoplasma est capable virtuellement d'infecter et de se multiplier dans toutes les cellules nucléées mammifères ou aviaires. Son cycle biologique est divisé entre une phase de reproduction sexuée, qui ne peut s'effectuer que chez les félinés, et une phase de reproduction

asexuée qui peut s'opérer chez tous les homéothermes, dénommés hôtes intermédiaires (Fig. 1). Pendant toute la phase de reproduction asexuée, le génôme de *Toxoplasma* est haploïde. Il contient 61.6 Mb répartis sur 14 chromosomes dont la taille varie entre 2 et 8 Mb. Parmi les formes de différenciation parasitaire rencontrées au cours du cycle, trois sont infectieuses (formes zoïtes):

- la forme **tachyzoïte**, qui est la forme proliférative responsable de la dissémination parasitaire au cours de la phase aiguë de la Toxoplasmose. Les tachyzoïtes mesurent environ 5 µm de long sur 2 µm de large. Ils se multiplient à l'intérieur d'une vacuole parasitophore dans la cellule-hôte, avec un temps de génération de 6 à 8h. On peut trouver jusqu'à 128 parasites dans une même vacuole, qui s'élargit jusqu'à la lyse cellulaire. Les parasites libérés vont ensuite infecter une cellule voisine.
- La forme **bradyzoïte**, caractéristique de la toxoplasmose chronique, est présente à l'intérieur de kystes qui apparaissent 7 à 10 jours après l'infection. Ces kystes mesurent environ 100 µm de diamètre et contiennent plusieurs milliers de parasites. On les trouve majoritairement dans le système nerveux central et dans les muscles, où ils peuvent perdurer pendant toute la vie de l'hôte.
- Le **sporozoïte** est issu de la reproduction sexuée. Il est contenu dans l'oocyste, qui constitue une forme de résistance du parasite dans le milieu extérieur.

Le passage d'une forme à l'autre s'opère en fonction de l'hôte et de son statut immunitaire. Chez l'hôte intermédiaire, l'ingestion de kystes ou d'oocystes provoque la libération de parasites (bradyzoïtes ou sporozoïtes) dans le tractus digestif, qui se différencient en tachyzoïtes (Dubey *et al.*, 1998). Ces derniers envahissent les cellules adjacentes et s'y multiplient activement. Ils infectent en particulier les cellules du système réticulo-histiocytaire, ce qui permet une dissémination rapide de l'infection par voie lymphatique et sanguine vers les ganglions, la rate et le foie. C'est la phase aiguë de l'infection. Le plus souvent, la réponse immunitaire de l'hôte permet le contrôle de cette infection. Les tachyzoïtes se différencient alors en bradyzoïtes, qui persistent à vie sous forme latente enkystée. C'est la phase chronique de l'infection.

I- 2- Pathogénicité

La toxoplasmose est une anthroponose qui constitue un problème de santé humaine aussi bien que vétérinaire. La prévalence de cette maladie dans la population humaine varie d'un pays à l'autre, en fonction des groupes ethniques, des habitudes alimentaires et des conditions d'hygiène. En Amérique du Nord, la prévalence est inférieure à 30% alors qu'en France, 45% environ de la population est séropositive. L'infection est habituellement asymptomatique chez l'hôte immunocompétent mais peut s'avérer gravissime dans les cas d'immunosuppression (Luft and Remington, 1992) ou de primo-infection au cours de la grossesse (Swisher *et al.*, 1994).

I- 2- 1- Chez les sujets immunocompétents

La phase aigüe de l'infection peut parfois se traduire par un syndrome pseudo-grippal accompagné ou non d'adénopathies (Montoya and Liesenfeld, 2004). Lors de la phase chronique, les kystes contenant les bradyzoïtes sont généralement bien tolérés par l'organisme. Néanmoins, des études récentes montrent que l'infection par *T. gondii* constituerait un facteur de vulnérabilité dans le déclenchement de troubles du comportement, en particulier dans le développement de la schizophrénie (Torrey and Yolken, 2007).

En Guinée française, 44 patients immunocompétents ont récemment développé une toxoplasmose sévère allant jusqu'au décès de l'un d'eux. Les isolats parasitaires responsables n'ont pu être classés parmi les génotypes actuellement connus et ils sont donc considérés comme « atypiques » (Ajzenberg *et al.*, 2004).

I- 2- 2- Toxoplasmose de l'immunodéprimé

Chez les individus immunocompétents, la réponse immunitaire de l'hôte restreint la dissémination des parasites qui s'enkystent dans le cerveau et dans les muscles. En cas de déficit de l'immunité cellulaire (atteinte par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), chimiothérapie ou traitements immuno-suppresseurs), il peut y avoir réactivation des parasites qui se différencient en tachyzoïtes et se multiplient au niveau cérébral, ce qui peut provoquer une encéphalite mortelle si elle n'est pas rapidement traitée. Ces cas de réactivation représentent la deuxième infection opportuniste chez les malades du SIDA dont l'immunodéficience est avancée, après la pneumocystose pulmonaire (Jones *et al.*, 1996).

I- 2- 3- Toxoplasmose congénitale

Si une femme enceinte non immunisée est confrontée au parasite, elle peut développer une infection aiguë qui sera contrôlée par son système immunitaire. Par contre, le fœtus peut être contaminé par voie trans-placentaire, or son système immunitaire est immature et l'empêche de réagir contre le parasite. La transmission au fœtus est d'autant plus fréquente que la contamination de la mère est tardive par rapport à la fécondation (Vogel *et al.*, 1996). Mais, inversement, l'atteinte fœtale est d'autant plus sévère que la contamination est précoce. En cas d'infection précoce de la mère, la plus fréquente des complications est l'encéphalomyélite qui peut provoquer la mort in utero et l'avortement spontané.

La forme congénitale de la toxoplasmose est également un problème vétérinaire important puisqu'elle est responsable de nombreux cas d'avortements spontanés dans les élevages ovins et caprins (Buxton, 1998).

I- 3- Etat actuel de la recherche anti-toxoplasmique

I- 3-1- Traitements existants

Une molécule efficace dans le traitement de la toxoplasmose doit être capable d'une part d'atteindre les différents tissus où prolifère le parasite, et d'autre part, de traverser la membrane plasmique de la cellule-hôte, la membrane de la vacuole parasitophore ou la paroi du kyste. Actuellement, c'est l'association de la pyriméthamine avec la sulfadiazine qui a montré les résultats les plus encourageants (Katlama *et al.*, 1996). Cette association bloque le métabolisme de l'acide folique et limite donc la production d'acides nucléiques nécessaires à la multiplication du parasite. Cependant, l'utilisation de ces drogues entraîne des effets secondaires importants, et doit donc être limitée, notamment chez la femme enceinte. De plus, ces traitements n'ont aucun effet sur les kystes, ce qui nécessite de ne pas interrompre le traitement par crainte de réactivation des parasites. D'autres molécules comme les macrolides ou l'atovaquone offrent des alternatives intéressantes dans le traitement de l'infection. De plus, de nouvelles voies de traitements sont à l'étude. Par exemple, la découverte chez *T. gondii* d'un organite d'origine végétale spécifique des Apicomplexa, l'apicoplaste, a soulevé la possibilité d'utiliser des dérivés d'herbicides comme drogues anti-parasitaires (Maréchal and Cesbron-Delauw, 2001).

I- 3- 2 Vaccination

Actuellement, il n'existe pas de vaccins contre la toxoplasmose humaine. Un vaccin basé sur l'infection par une forme atténuée de parasite (souche S48), incapable de se différencier en bradyzoïte, est employé avec succès pour lutter contre la toxoplasmose congénitale chez le mouton (Buxton and Innes, 1995). Chez l'homme, la vaccination par des parasites vivants est délicate à cause des risques de réactivation dont les conséquences sont encore mal évaluées. La recherche se tourne donc vers l'identification de molécules induisant la réponse immunitaire au cours de l'infection, afin de les utiliser comme candidats vaccinaux. Deux grandes classes d'antigènes sont principalement considérées :

- l'antigène de surface SAG1 est considéré comme l'antigène immunodominant de la forme tachyzoïte. Des expériences d'immunisation avec l'antigène SAG1 purifié ont donné des résultats contradictoires, et retardent l'utilisation de cette molécule comme vaccin (Kasper *et al.*, 1985 ; Khan *et al.*, 1991).

- les antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) représentent 90% des antigènes circulants, et sont fortement immunogènes. Ces molécules sont à la fois synthétisées au stade tachyzoïte et bradyzoïte, ce qui en fait de bons candidats à l'établissement d'une immunité de prémunition développée lors de la toxoplasmose. La production d'anticorps monoclonaux contre les composants des AES a montré que les protéines de granules denses (protéines GRA) se trouvent en majorité dans les AES. L'antigène GRA2, notamment, est considéré comme un bon candidat vaccinal (Prigione *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2007).

II-Toxoplasma gondii : une cellule infectieuse très compartimentalisée

En tant que parasite intracellulaire obligatoire, *T. gondii* a développé des mécanismes lui permettant d'envahir efficacement une cellule-hôte et de survivre à l'intérieur de celle-ci. *T. gondii* est capable d'envahir potentiellement tous les types cellulaires. L'invasion est un phénomène actif, qui aboutit à la création d'une vacuole parasitophore (VP) isolée du trafic cellulaire, dans laquelle le parasite va pouvoir se multiplier. Ces propriétés d'adaptation à l'environnement intracellulaire reposent sur une structure particulière qui présente une polarisation marquée, avec une extrémité antérieure effilée et une extrémité postérieure arrondie. Les événements moléculaires impliqués font intervenir la sécrétion coordonnée des différents organites spécialisés de *T. gondii* que sont les micronèmes, les rhoptries et les granules denses (GD) (Fig. 2). Dans un premier temps, les micronèmes sont sécrétés et les protéines de micronèmes exposées à la surface se lient à des récepteurs de la cellule-hôte. L'exocytose des rhoptries coïncide avec la formation de la jonction mobile, à travers laquelle le parasite se propulse dans la VP naissante. Enfin, la libération du contenu des GD permet la maturation de la VP.

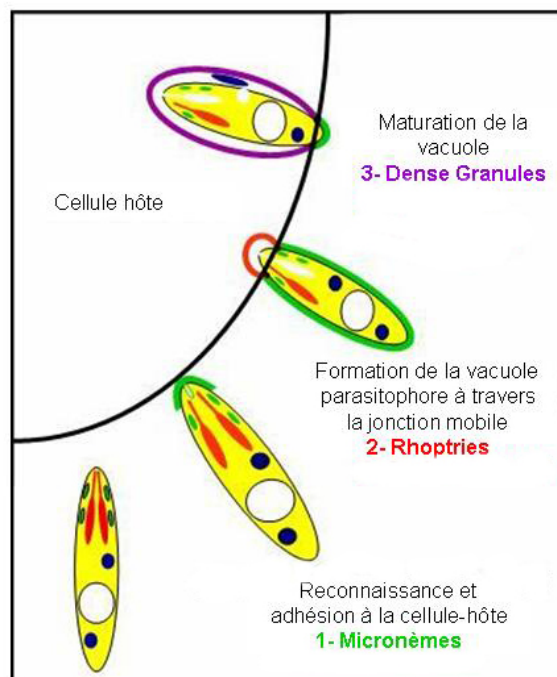


Fig. 2 : Représentation schématique des différentes étapes de l'invasion (d'après Dubremetz *et al.*, 1998).

II-1- Organisation subcellulaire du zoïte

La description de la structure et des composants du zoïte de *T. gondii* est basée sur la revue de Lebrun, Carruthers et Cesbron-Delauw (Lebrun *et al.*, 2007).

Le zoïte est le stade infectieux de tous les Apicomplexa. A quelques exceptions près, les organites décrits dans le cas de *T. gondii* sont donc communs à tous les membres du phylum. Le zoïte est une cellule hautement différenciée comprenant les organites classiques de toute cellule eucaryote : un noyau dans sa moitié supérieure, un réticulum endoplasmique (RE), un appareil de Golgi et une mitochondrie unique (Fig. 3). Les substances de réserve sont composées de globules lipidiques et de grains d'amylopectine, plus abondants chez les bradyzoïtes. Le zoïte est délimité par une membrane plasmique associée à un complexe membranaire interne (IMC) constitué de deux membranes étroitement accolées. Il possède des organites particuliers, parmi lesquels on trouve un plaste non photosynthétique, l'apicoplaste, ainsi que trois types organites de sécrétion : les micronèmes, les rhoptries et les GD.

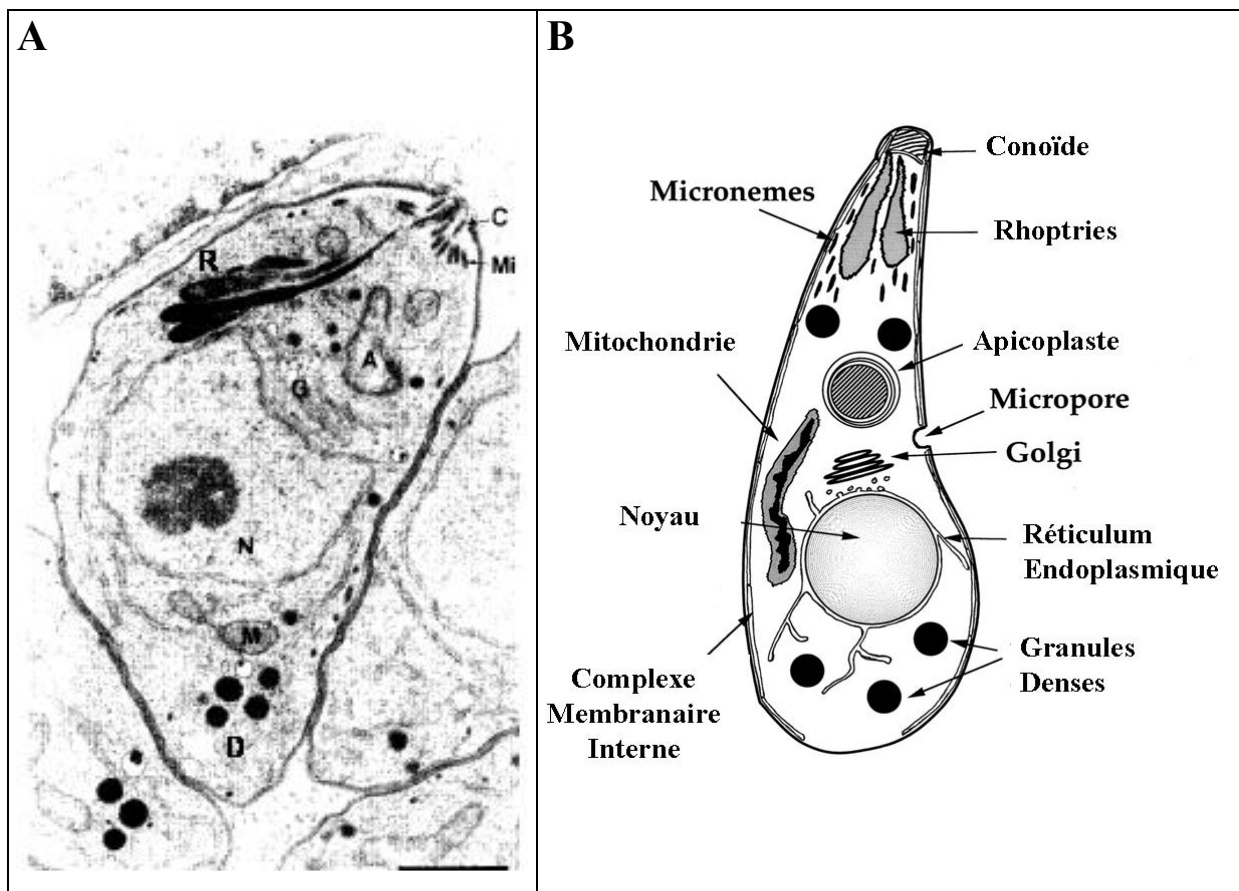


Fig. 3 : Ultrastructure parasitaire. A- Tachyzoïte intracellulaire en microscopie électronique, d'après Dubremetz, 1998. A, apicoplaste ; C, conoïde ; D, granules denses ; G, appareil de Golgi ; Mi, micronèmes ; M, mitochondrie ; N, noyau ; R, rhoptries. Barre 1µm. B- Schéma structural du parasite, d'après Black and Boothroyd, 2000.

II- 1- 1- La pellicule

Le parasite est entouré d'une pellicule de 60 nm d'épaisseur (Vivier and Petitprez, 1969) composée d'une membrane externe, le plasmalemne, et de l'IMC bimembranaire.

La membrane plasmique est recouverte de glycoprotéines ancrées par des groupements glycophosphatidylinositol (GPI) (de Macedo *et al.*, 2003). Ces protéines de surface, dont SAG1 constitue l'élément majeur, contribuent à l'adhésion du parasite à la cellule-hôte lors du processus d'invasion (Mineo and Kasper, 1994).

L'IMC est constitué de vésicules aplaties juxtaposées, organisées en plaques longitudinales qui convergent vers l'extrémité postérieure selon un tracé spiralé. Il est interrompu à plusieurs niveaux : au niveau apical au dessous du conoïde, au niveau de la partie postérieure arrondie du parasite, et au niveau du micropore, invagination circulaire et latérale de la membrane plasmique qui pourrait être impliqué dans les processus d'endocytose (Nichols *et al.*, 1994). L'IMC est étroitement associé aux microtubules sous-pelliculaires et à un réseau de filaments de 8 à 10 nm de diamètre qui s'étend de la partie antérieure à la partie postérieure des parasites. Le réseau sous-pelliculaire joue un rôle dans le maintien de la forme et de la polarité parasitaire et contribue à la motilité du parasite ou « gliding » (Morissette and Sibley, 2002).

II- 1- 2- L'apicoplaste

L'apicoplaste aurait été acquis par un ancêtre du phylum des *Apicomplexa* par endosymbiose secondaire d'une algue rouge. Ce mécanisme permettrait d'expliquer les 4 membranes observées à la périphérie de l'apicoplaste, qui proviendraient d'une enveloppe plastidiale ancestrale, de la membrane de l'algue rouge et du phagosome. Le génôme plastidial est circulaire, mesure 35 kb et contient environ 60 gènes. Cependant, la majorité des protéines de cet organite sont codées au niveau nucléaire et possèdent un peptide de transit qui permet leur translocation au travers des 4 membranes de l'apicoplaste (Joiner et Roos, 2002 ; Bisanz *et al.*, 2006).

Des parasites modifiés ne possédant plus d'apicoplaste ne sont pas viables (He *et al.*, 2001). L'inhibition de la réplication de l'ADN plastidial par des quinolones ou des fluoroquinolones empêche également la réplication parasitaire. L'apicoplaste a donc un rôle essentiel dans le développement parasitaire. Il est vraisemblablement impliqué dans la synthèse d'acides gras (Waller and McFadden, 2005). Ces propriétés de l'apicoplaste en font une cible de choix pour le développement de drogues anti-parasitaires potentielles de type « médicament herbicide » (Maréchal and Cesbron-Delauw, 2001).

II- 1- 3- Le complexe apical

Le complexe apical, caractéristique des *Apicomplexa*, comprend le conoïde, les anneaux polaires et apicaux ainsi que les micronèmes et les rhoptries.

II- 1- 3- 1- Le conoïde et les anneaux

Le conoïde, en forme de cône tronqué, est constitué de filaments de tubuline polymérisée enroulés en spirale (Fig. 4). Il est limité à l'avant par deux anneaux apicaux et à l'arrière par deux anneaux polaires, denses aux électrons. A sa base, l'anneau polaire le plus postérieur sert d'ancrage à l'insertion de 22 microtubules longitudinaux, disposés à intervalles réguliers contre la face interne de l'IMC (microtubules sous-pelliculaires). L'extrusion du conoïde peut être stimulée expérimentalement par un flux de calcium induit par un ionophore, alors qu'elle est inhibée par le prétraitement à la cytochalasine D qui dépolymérise le cytosquelette d'actine (Mondragon and Frixione, 1996).

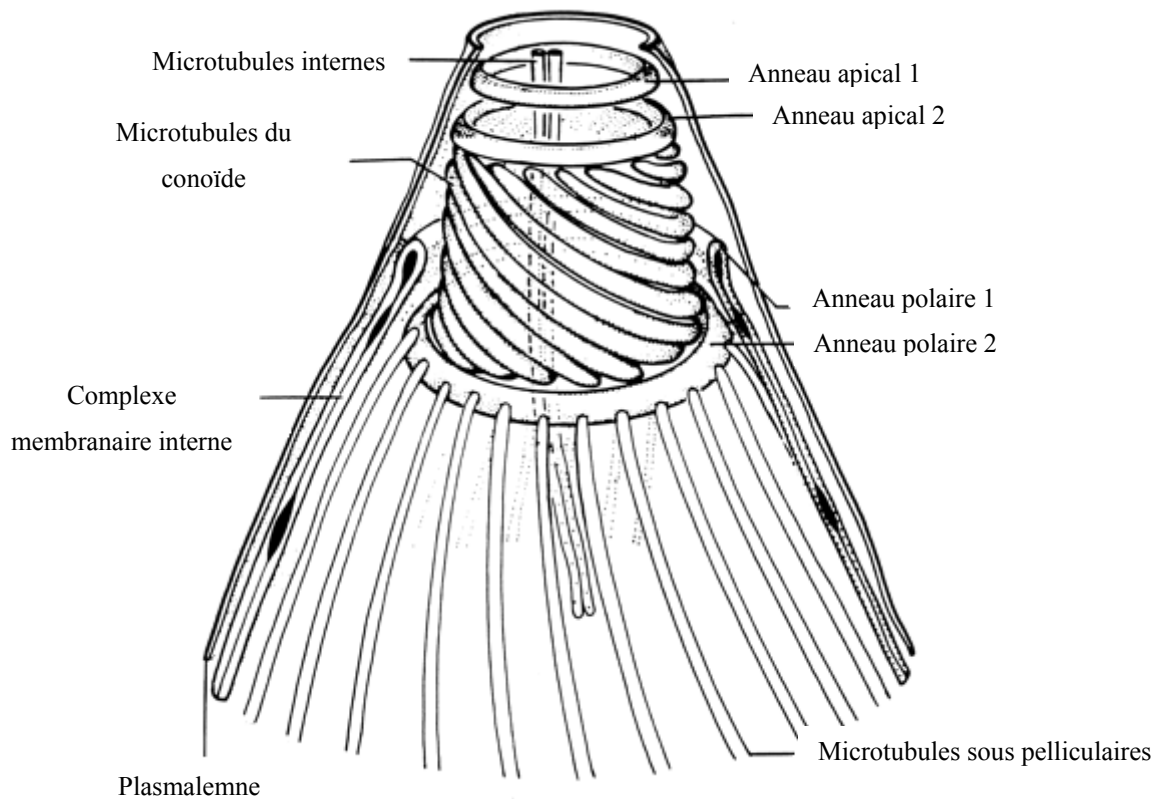


Fig. 4 : Le conoïde de *T. gondii* d'après Dubey *et al.*, 1998.

II- 1- 3- 2- Les micronèmes

On trouve 50 à 100 micronèmes dans la portion apicale des tachyzoïtes. Ce sont les organites apicaux les plus petits, en forme de bâtonnets mesurant 0,4 x 0,1 μm . Ils apparaissent souvent légèrement arqués, probablement du fait d'une association avec la face cytoplasmique de

l'IMC. On trouve dans les micronèmes une famille de protéines appelées MIC (MIC1 à 12), qui sont soit solubles soit transmembranaires (Fig. 5).

II- 1- 3- 2- 1- Caractérisation moléculaire des protéines de micronèmes

A l'origine, ces protéines ont été identifiées grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui ont permis le criblage de banques d'ADNc (Achbarou *et al.*, 1991 ; Fourmaux *et al.*, 1996 ; Garcia-Reguet *et al.*, 2000). Le séquençage du génome de *T. gondii* est venu compléter ces données par la découverte de nouvelles protéines de micronèmes, qui présentaient des homologies avec des protéines de micronèmes présentes chez d'autres Apicomplexa (AMA1, MIC2, SUB1) (Hehl *et al.*, 2000, Wan *et al.*, 1997, Miller *et al.*, 2001) ou dont les domaines transmembranaires ou C-terminaux étaient similaires à ceux de TRAP/MIC2 (MIC6, MIC7, MIC8, MIC9 et MIC12) (Meissner *et al.*, 2002).

Pour certaines protéines de micronèmes, on a pu identifier la présence de motifs d'adhésion similaires à des motifs connus chez les eucaryotes supérieurs (Tomley and Soldati, 2001) Parmi ces domaines, on trouve les domaines de type thrombospondine de MIC1 et MIC2, le I-domaine de MIC2, les domaines Apple de MIC4 et les domaines de type lectine de MIC3 et MIC8 (Fig. 5). Le rôle fonctionnel de ces adhésines a pu être démontré dans les processus d'attachement à la cellule-hôte, de motilité et d'invasion. Les protéines de micronèmes semblent agir en synergie dans le phénomène d'invasion, avec un rôle prédominant des protéines de micronèmes transmembranaires qui établissent un lien entre la cellule-hôte et le moteur acto-myosine situé sous la membrane parasitaire (Kappe *et al.*, 1999 ; Jewett and Sibley, 2003).

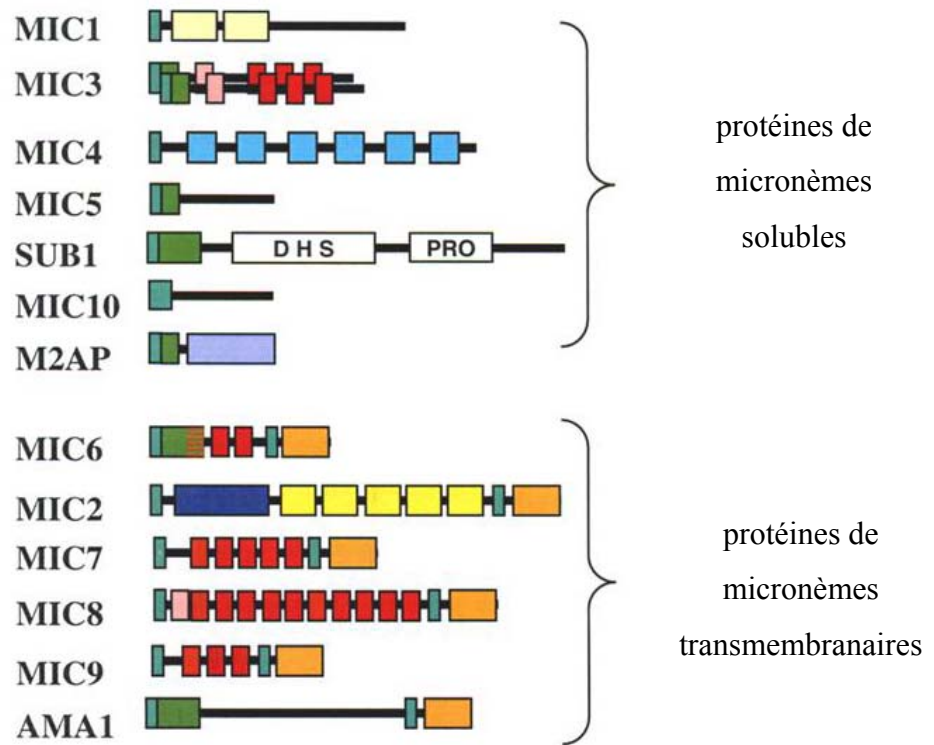
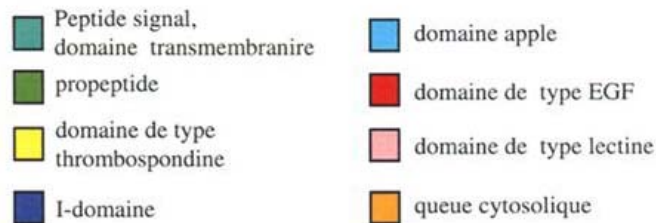


Fig. 5 : Représentation schématique des protéines de micronèmes solubles et transmembranaires les mieux caractérisées (d’après la thèse de Odile Céréde, 2003).



D’autres motifs sont impliqués dans des interactions protéines-protéines entre différentes protéines de micronèmes, conduisant à la formation de complexes de haut poids moléculaire. Par exemple, le motif Galectin-like présent dans la partie C-terminale de MIC1 permet le repliement correct de MIC6 et stabilise sa portion C-terminale (Saouros *et al.*, 2005), ce qui conduit à la formation du complexe MIC1/4/6 (Reiss *et al.*, 2001). Le domaine C-terminal des protéines de micronèmes transmembranaires possède également une importance fonctionnelle majeure puisqu’il permet l’interaction de ces protéines avec le complexe actine-myosine sous-membranaire, impliqué dans la motilité parasitaire et l’invasion. Ces interactions reposent sur la présence d’un résidu tryptophane dans l’extrémité C-terminale de la queue cytoplasmique (Kappe *et al.*, 1999).

On trouve également des protéases parmi les protéines de micronèmes. SUB1 et ROM1 sont des sérine-protéases, vraisemblablement impliquées dans la maturation enzymatique des MICs au cours de leur trafic cellulaire. Ces événements de clivage protéolytique sont d'importance majeure puisqu'ils sont probablement impliqués dans la régulation de l'adhésion par la dissociation des complexes de protéines de micronèmes à la fin du processus d'invasion.

II- 1- 3- 2- 2- Importance fonctionnelle des protéines de micronèmes

T. gondii possède un vaste répertoire de protéines de micronèmes, ce qui peut être mis en relation avec la possibilité qu'a le parasite d'infecter un grand nombre de cellules-hôtes dans des tissus très variés. La délétion des gènes *MIC* dans le parasite a permis de montrer que certaines protéines MIC ne sont pas essentielles pour l'invasion *in vitro* (Reiss *et al.*, 2001 ; Huynh *et al.*, 2003 ; Cérède *et al.*, 2005). Par exemple, la souche délétée pour le gène *MIC3* est capable d'envahir des fibroblastes *in vitro*, mais les souris infectées par cette souche meurent plus tardivement que celles infectées par la souche sauvage (Cérède *et al.*, 2005). Cette observation laisse supposer que *MIC3* serait essentielle pour l'invasion de types cellulaires spécifiques, différents de ceux que l'on utilise classiquement *in vitro*. La délétion du gène *MIC1* empêche l'adressage correct de *MIC4* et *MIC6* aux micronèmes (Reiss *et al.*, 2001), et les parasites qui n'expriment pas *MIC1* ont un taux d'invasion de 50% par rapport au sauvage (Cérède *et al.*, 2005). Bien que non essentielle *in vitro*, la protéine *MIC1* serait donc impliquée dans l'efficacité de l'invasion de part son rôle dans la formation du complexe *MIC1/MIC4/MIC6*.

A l'opposé, on n'a jamais pu obtenir de mutants de délétion pour les protéines *MIC2* et *AMA1* (Huynh *et al.*, 2004 ; Mital *et al.*, 2005). L'inhibition conditionnelle de l'expression de ces deux protéines a pu être obtenue récemment, ce qui a permis de montrer que ces protéines ont un rôle essentiel dans des étapes différentes de l'adhésion à la cellule-hôte. La protéine *MIC2* serait impliquée dans l'attachement initial, tandis que la protéine *AMA1* interviendrait ultérieurement dans l'association intime à la cellule-hôte par la formation de la « jonction mobile » (cf chapitre II-2).

II- 1- 3- 3- Les rhoptries

On trouve 6 à 12 rhoptries au pôle apical de chaque parasite. Il s'agit de longs organites en forme de massue, mesurant 2 x 0,2 µm. Leur cou effilé, dense aux électrons, peut fusionner avec la membrane apicale. Les rhoptries sont des vésicules acides, qui dérivent probablement à la fois des voies de sécrétion et d'endocytose. On y trouve notamment des hydrolases spécialisées, caractéristiques des lysosomes (Que *et al.*, 2002). Les rhoptries contiennent de nombreuses protéines (dont les protéines ROP) ainsi que des lipides.

II- 1- 3- 3- 1- Les protéines de rhoptries

Les techniques de fractionnement subcellulaire et de production d'anticorps monoclonaux ont permis l'identification des premières protéines de rhoptries (Leriche and Dubremetz, 1991). Par la suite, l'analyse protéomique d'une fraction purifiée de rhoptries a permis de découvrir 38 nouvelles protéines de rhoptries putatives, dont certaines sont bien localisées dans les rhoptries (Bradley *et al.*, 2005).

Toutes les protéines de rhoptries possèdent un peptide signal, et beaucoup présentent au moins un domaine transmembranaire potentiel ou une ancre GPI, ce qui suggère une association avec les membranes. Parmi les protéines identifiées récemment, certaines sont spécifiquement localisées au niveau du cou des rhoptries : ce sont les protéines RON pour RhOptries Neck proteins. Beaucoup de ROPs et de RONs présentent des domaines répétés, susceptibles d'être impliqués dans des interactions protéines-protéines.

Parmi les protéines de rhoptries, il existe un certain nombre de protéines qui n'ont pas d'homologues connus chez les autres Apicomplexa. Les protéines de la famille ROP2, les protéines ROP1, ROP10, ROP12, ROP13, ROP15, ROP17 et la toxofiline font partie de cette catégorie. On peut supposer que ces protéines sont le fruit d'une évolution permettant l'accomplissement du cycle de vie particulier de *Toxoplasma*, lui permettant notamment d'envahir un large spectre de cellules-hôtes.

On trouve cependant dans la séquence des protéines de rhoptries des domaines homologues à des domaines de fonctions connues. Ainsi, les 12 membres de la famille de ROP2 présentent des domaines kinases au niveau de leur région C-terminale, mais seules ROP16, ROP17, ROP

18 et ROP2L4 ont conservé la boucle glycine et le résidu acide aspartique, qui sont critiques pour l'activité phosphotransférase. ROP17 et ROP18 possèdent une activité kinase *in vitro* (El Hajj *et al.*, 2006; 2007b, Lebrun *et al.*, 2007). Ces protéines pourraient intervenir dans les voies de signalisation de la cellule-hôte (voir paragraphe III- 4- 2- 2-).

On trouve également dans les rhoptries différents types de protéases. Par exemple, SUB2 est une sérine-protéase de type subtilisine qui a été identifiée par homologie avec la protéine SUB2 du parasite *P. falciparum* (Miller *et al.*, 2003). TgSUB2 pourrait être impliquée dans la maturation protéolytique de ROP1 et des protéines de la famille ROP2 lors de leur adressage aux rhoptries (Bradley and Boothroyd, 1999). La délétion du gène codant pour SUB2 n'a pas pu être obtenue, mais le traitement de parasites avec des ARN antisens spécifiques de ce gène empêche la formation correcte des rhoptries (Binder et Kim, 2004), ce qui laisse supposer que SUB2 serait impliquée dans la biogénèse des rhoptries.

II- 1- 3- 3- 2- Lipides contenus dans les rhoptries

Les rhoptries de *T. gondii* contiennent aussi une fraction lipidique, composée majoritairement de cholestérol et de phospholipides (Foussard *et al.*, 1991). Parmi les phospholipides, la phosphatidylcholine est l'espèce la plus représentée, même si l'on trouve également de grandes quantités d'acide phosphatidique et de lysophospholipides. Il y a 4 fois plus de protéines que de lipides dans les rhoptries, et on estime à 1,5 le rapport nombre de moles de cholestérol/nombre de moles de lipides, ce qui indique que les lipides stockés dans les rhoptries présentent un état non-lamellaire. Il a été proposé que la sécrétion des lipides contenus dans les rhoptries pourrait faciliter la formation de la membrane de la vacuole naissante au moment de l'invasion. En faveur de cette hypothèse, on observe que l'exocytose des rhoptries est corrélée à la variation de conductivité de la membrane de la cellule-hôte que l'on détecte lors de l'attachement du parasite (Suss-Toby *et al.*, 1996). Cependant, des analyses récentes ont montré qu'il y a déjà du cholestérol dans la membrane de la vacuole parasitophore au tout début de l'invasion. De plus, on a pu obtenir des parasites qui stockent moins de cholestérol dans les rhoptries (16- 23 % de cholestérol en moins), or ceux-ci sont toujours capables d'envahir la cellule-hôte (Coppens and Joiner, 2003). Ces études suggèrent que le cholestérol contenu dans la membrane de la vacuole parasitophore provient majoritairement de la cellule-hôte et que la contribution parasitaire est mineure, même si elle peut être essentielle pour la formation de la vacuole parasitophore.

II- 1- 4- Les granules denses, un organe caractéristique de *T. gondii*

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

Bien que des organelles denses aux électrons chez *Plasmodium* aient été décrits (Blackman and Bannister, 2001), il est probable que ces structures soient fonctionnellement distinctes des GD du toxoplasme. En particulier, il n'existe pas d'homologues des protéines GRAs parmi les protéines de *Plasmodium* identifiées jusqu'à présent. *Toxoplasma* et *Plasmodium* présentent deux types de vacuoles parasitophores différents, ce qui reflète deux modes de parasitisme intracellulaire distincts. Si le processus d'invasion active est similaire pour la formation initiale des deux types de vacuoles, leur devenir est différent à la fois en termes d'architecture et de métabolisme, ce qui conduit à deux types de réplication distincts - endodyogénie *versus* schizogonie. Il est donc vraisemblable que l'existence chez *T. gondii* d'un set d'organites de type GD soit impliquée dans cette spécialisation de la vacuole parasitophore.

II- 1- 4- 1- Les protéines de granules denses

La caractérisation des protéines de GD a commencé grâce à la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre les constituants des antigènes d'excrétion-sécrétion (ESA) et aux premières expériences de fractionnement de tachyzoïtes (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989 ; Charif *et al.*, 1990 ; Leriche and Dubremetz, 1991). Le protéome des GD n'est pas complètement décrit à ce jour, car la purification de ces organites s'est avérée infructueuse jusqu'à présent.

A part quelques exceptions, les protéines de GD ne présentent pas d'homologie de séquences avec d'autres protéines de fonction connue, ni les unes avec les autres. Au jour d'aujourd'hui, on a pu ainsi identifier 9 protéines GRA dans les GD (Lebrun *et al.*, 2007), en plus de deux

nucléotides-hydrolases (Bermudes *et al.*, 1994b ; Sibley *et al.*, 1994 ; Asai *et al.*, 1995), de deux inhibiteurs de protéases (Pszenny *et al.*, 2000 ; 2002 ; Morris *et al.*, 2002 ; Morris and Carruthers, 2003) et d'une peptidyl-prolyl isomérase (High *et al.*, 1994 ; Carey *et al.*, 2000). Une dixième protéine GRA a été décrite (potGRA10), mais sa localisation dans les GD n'est pas convaincante (Ahn *et al.*, 2005).

Les protéines GRA représentent un groupe de petites protéines (21 à 41 k Da), qui présentent toutes un peptide signal N-terminal. GRA1 est la protéine la plus abondante puisque 2% de tous les EST dérivés d'une banque d'ADNc produite à partir de la souche RH correspondent à l'expression de cette protéine. Elle est prédite comme soluble et est caractérisée par la présence de deux domaines EF-Hand capables de lier le calcium (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989). A l'exception de GRA1, toutes les protéines GRAs connues actuellement présentent des domaines putatifs d'association membranaire. Il s'agit soit de domaines transmembranaires classiques (GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7 et GRA8) soit d'hélices- α de type amphiphile (GRA2 et GRA9) (Fig.6).

Un autre point commun des GRAs est la différence que l'on observe entre leur poids moléculaire théorique et la taille apparente obtenue par SDS-PAGE. Des modifications co- ou post-traductionnelles pourraient expliquer ces observations. La O-glycosylation de GRA2, GRA4 et GRA6 a été démontrée (Zinecker *et al.*, 1998; Achbarou *et al.*, 1991 ; Travier *et al.*, non publié). De plus, GRA2 et GRA6 sont phosphorylées après sécrétion dans la vacuole (Mercier and Sibley, non publié ; Labruyère *et al.*, 1999). En outre, la proportion importante d'acides aminés chargés et de résidus proline dans la séquence des GRAs pourrait également expliquer le profil de migration aberrant obtenu pour ces protéines.

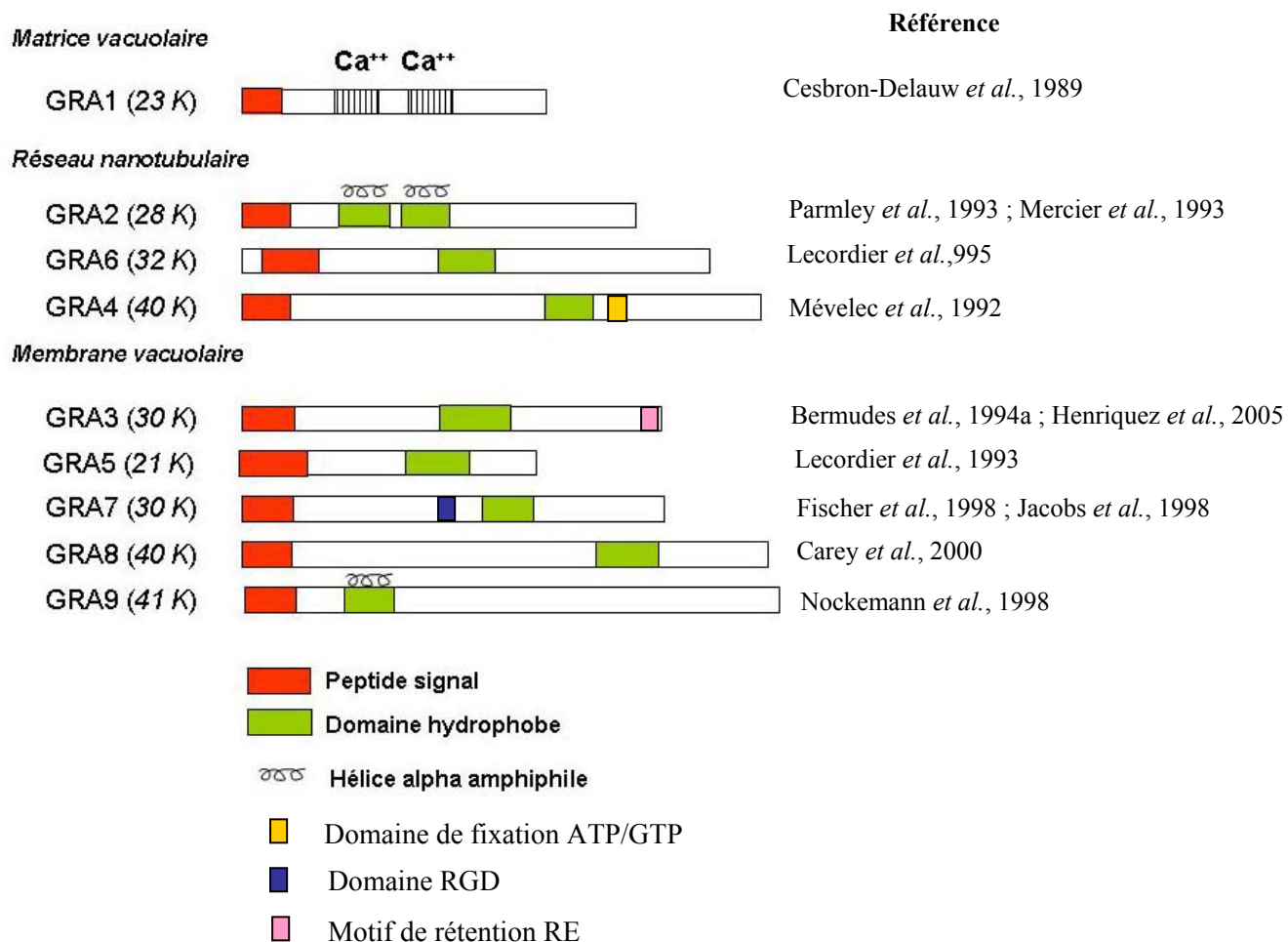


Fig.6 : Représentation schématique des GRAs d'après Mercier *et al.*, 2005. Les auteurs qui ont identifié les gènes sont indiqués à droite. RE, réticulum endoplasmique.

II- 1- 4- 2- Fonctions des protéines de granules denses

- **Protéines GRAs** : Si la recherche d'homologie de séquence sur les protéines entières n'a pas fourni de résultats satisfaisants, des motifs fonctionnels ont cependant pu être identifiés dans certaines GRAs. Les deux motifs EF-Hands de GRA1 ont été identifiés par cette méthode, ainsi qu'un site de liaison ATP/GTP dans l'ORF de GRA4, un domaine d'adhésion RGD dans la séquence de GRA7 (Mercier *et al.*, 2005), ou encore un motif d'adressage au RE à l'extrémité C-terminale de GRA3 (Henriquez *et al.*, 2005) (Fig.5). Dans les trois derniers cas, la relevance fonctionnelle de ces domaines reste à déterminer.

La fonction de plusieurs GRAs a pu être étudiée par la délétion des gènes correspondants dans des souches de parasites dérivées de la souche sauvage RH (souches KO pour KnockOut). Ces études ont révélé que GRA2, GRA5, GRA6 et GRA7 ne sont pas nécessaires à la prolifération du parasite *in vitro* (Mercier *et al.*, 1998a ; 2001 ; 2002 ; Coppens *et al.*, 2006). L'analyse des mutants GRA2 KO, GRA6 KO et du double mutant GRA2-GRA6 KO a montré que ces protéines seraient impliquées dans la formation du réseau de nanotubules membranaires qui occupe l'espace intra-vacuolaire (Mercier *et al.*, 2002) (voir paragraphe II-2-2-3). De plus, la protéine GRA2 semble essentielle à la formation du corps résiduel, qui attache tous les parasites d'une même vacuole par leur extrémité postérieure, ce qui confirme le rôle structural de cette protéine au sein de la vacuole (Muniz-Hernandez *et al.*, en préparation). Malgré leur prolifération *in vitro*, les parasites GRA2 et GRA6 KO sont moins virulents *in vivo* que la souche parentale RH, puisque les souris infectées survivent à l'infection aiguë et développent des kystes intra-cérébraux (Mercier *et al.*, 1998a ; Mercier *et al.*, non publié). La relation entre la déstructuration de la vacuole provoquée par l'absence de GRA2 et GRA6 *in vitro* et la baisse de virulence observée chez la souris reste inexpliquée.

La délétion des protéines GRA1, GRA4 ou GRA9 n'a pu être obtenue (Braun, Travier, Mercier and Cesbron-Delauw, non publié ; Adjogble, non publié). Ceci suggère qu'au moins certaines GRAs sont essentielles pour la répllication intracellulaire du tachyzoïte. GRA1, de part son abondance et ses propriétés de liaison au calcium, pourrait jouer un rôle important dans le maintien du taux de calcium de la vacuole à un niveau constant, ou dans l'assemblage des autres protéines GRAs (voir ci-dessous).

- **Autres protéines de GD** : Malgré leur homologie avec d'autres protéines bien caractérisées, la fonction des enzymes présentes dans les GD n'est pas clairement établie. Leur activité *in vitro* a été établie. Les nucléotides hydrolases sont très abondantes et sont essentielles, mais leur rôle dans le métabolisme des purines prélevées dans la cellule-hôte est remis en question par plusieurs études (Bermudes *et al.*, 1994b ; Silverman *et al.*, 1998 ; Ngô *et al.*, 2000a). Le rôle des inhibiteurs de protéases TgPI-1 et TgPI-2 est également obscur. Les cyclophilines présentes dans les GD possèdent une activité peptidyl-prolyl isomérase *in vitro* et pourraient être impliquées dans l'établissement de complexes protéiques de haut poids moléculaire à l'intérieur des GD et/ou de la vacuole. GRA4 et GRA8, qui sont riches en proline, sont des substrats potentiels de ces enzymes (Carey *et al.*, 2000).

II- 2- L'invasion et la formation de la vacuole parasitophore

L'invasion d'une cellule-hôte par *T. gondii* est un processus qui diffère fondamentalement de la phagocytose ou de l'endocytose induite par des pathogènes intracellulaires comme les virus, certaines bactéries, ou le parasite *Trypanosoma cruzi* (Finlay and Cossart, 1997 ; Antoine *et al.*, 1998 ; Sibley and Andrews, 2000). L'invasion s'accomplit en moins de 30 secondes et ne déclenche de mécanismes particuliers chez la cellule-hôte. On parle donc d'invasion « active », par opposé aux mécanismes d'« invasion induites » par différentes bactéries.

II- 2- 1- Description morphologique de l'invasion

Comme la plupart des zoïtes des Apicomplexa, les formes invasives de *T. gondii* sont motiles. Des parasites dont la motilité est inhibée sont incapables de pénétrer dans une cellule (Dobrowolski and Sibley, 1996). La cellule du toxoplasme ne possède ni cils ni flagelles, mais elle est capable de se déplacer sur un substrat solide selon une polarité antéro-postérieure, par un mouvement de glissement appelé « gliding ». Ce mode de déplacement, très conservé chez les Apicomplexa, est exceptionnellement rapide, atteignant des vitesses de 20 $\mu\text{m/s}$ *in vitro* (Black and Boothroyd, 2000).

In vivo, le Toxoplasme se déplace par gliding au niveau de l'organe cible, ce qui lui permet de rentrer en contact avec la cellule-hôte par son extrémité apicale. A cela s'ajoutent les mouvements du conoïde qui peuvent contribuer à l'apposition de l'apex du parasite sur la surface cellulaire (Morisaki *et al.*, 1995 ; Schwartzman and Saffer, 1992). Au point de contact avec le conoïde étendu, la membrane plasmique de la cellule-hôte s'invagine légèrement pour former la « jonction mobile » (JM), à travers laquelle le parasite se propulse à l'intérieur de la VP naissante (Aikawa *et al.*, 1978). La JM est une zone de contact étroit entre les membranes du parasite et de la cellule-hôte, et elle est visualisée par une constriction du toxoplasme qui apparaît au pôle apical et progresse le long du parasite en cours d'invasion. Cette constriction pourrait résulter des contraintes physiques imposées par la rigidité du cytosquelette de la cellule-hôte. La JM se referme sur le parasite une fois que celui-ci est entré, par fusion de la membrane de l'hôte (Aikawa *et al.*, 1978 ; Lebrun *et al.*, 2005). La membrane entourant le zoïte se pince et se détache du plasmaleme. Le parasite se trouve alors isolé du cytoplasme

de la cellule-hôte à l'intérieur de la VP, dont la membrane est principalement issue de la cellule-hôte.

II- 2- 2- Mécanismes moléculaires de l'invasion

Si les étapes de l'invasion sont bien caractérisées sur le plan morphologique, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces phénomènes sont moins bien compris, surtout en ce qui concerne l'établissement de la JM. L'intervention des organites de sécrétion apicaux a été clairement démontrée (Fig. 6): le contenu des micronèmes est libéré, suivi par l'exocytose des rhoptries, et les protéines contenues dans ces organites sont impliquées dans des fonctions distinctes coordonnées dans le temps et dans l'espace (Carruthers and Sibley, 1997). La sécrétion des GD intervient à la fin du processus d'invasion (Fig. 6), après la formation de la VP, ce qui suggère l'implication des protéines contenues dans ces organites dans la modification de la VP (Leriche and Dubremetz, 1990 ; Dubremetz *et al.*, 1993 ; Carruthers and Sibley, 1997).

II- 2- 2- 1- Reconnaissance de la cellule-hôte

Dans un premier temps, le contact entre le parasite et la cellule-hôte est établi de manière transitoire par des antigènes de surface du parasite (He *et al.*, 2002) (Fig. 7 [1]). Ces protéines reconnaissent les glycosaminoglycanes (GAG) présents à la surface de la cellule-hôte. Les différentes protéines SAG impliquées sont capables de reconnaître différents types de GAG, ce qui pourrait expliquer en partie la spécificité d'invasion stade-dépendante qui est observée (Naguleswaran *et al.*, 2003 ; Vonlaufen *et al.*, 2004). Ce contact initial déclenche la sécrétion des micronèmes à la surface du parasite, par fusion avec le cou des rhoptries (Carruthers *et al.*, 1999 ; Alexander *et al.*, 2005).

Les protéines de micronèmes, associées en complexe à la surface parasitaire après sécrétion, sont capables de se lier à des récepteurs cellulaires spécifiques. Par exemple, MIC2 lie le récepteur cellulaire ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) et l'héparine (Brossier and Sibley, 2005). La diversité des liaisons engagées entre les différents complexes de protéines de micronèmes et les différents récepteurs cellulaires permet au parasite d'interagir avec un grand nombre de types cellulaires différents (Cérède *et al.*, 2005). Ces liaisons induisent une réorientation du parasite qui résulte en la juxtaposition du conoïde avec la membrane de la cellule-hôte (Dubremetz *et al.*, 1993 ; Carruthers and Sibley, 1997) (Fig. 7 [2]).

II- 2- 2- 2- Formation de la VP

Immédiatement après l'attachement apical, le contenu des rhoptries est exocyté (Fig. 7 [3]). Même s'il n'existe pas de preuve de l'implication des protéines et lipides ainsi libérés dans la formation de la VP, on observe une corrélation entre cette libération et l'invagination de la membrane plasmique de la cellule-hôte (Hakansson *et al.*, 2001), et les protéines de rhoptries sont trouvées en association avec la membrane de la VP (MVP) dès les premiers stades du développement parasitaire intracellulaire, ce qui suggère fortement que ces organites sont importants pour la formation de la VP. Une partie du contenu des rhoptries est retrouvée dans le cytoplasme de la cellule-hôte (Hakansson *et al.*, 2001).

Le parasite entre dans la cellule-hôte au travers de la JM (Fig. 7 [4]). Les protéines RON du pédoncule des rhoptries ainsi que la protéine de micronèmes AMA1 ont été identifiées comme étant associées à la JM (Alexander *et al.*, 2005). Au niveau de cette jonction a lieu un mécanisme de tri moléculaire qui permet l'exclusion de la plupart des protéines de la cellule-hôte. Ainsi, la VP ne possède plus les molécules régulatrices qui gouvernent la fusion endocytaire, ce qui explique l'absence de fusion de la VP avec les lysosomes. Par contre, les protéines ancrées dans la membrane par un GPI et la plupart des lipides de la cellule-hôte peuvent passer la JM. La MVP ainsi formée possède donc une origine mixte, à la fois parasitaire et cellulaire.

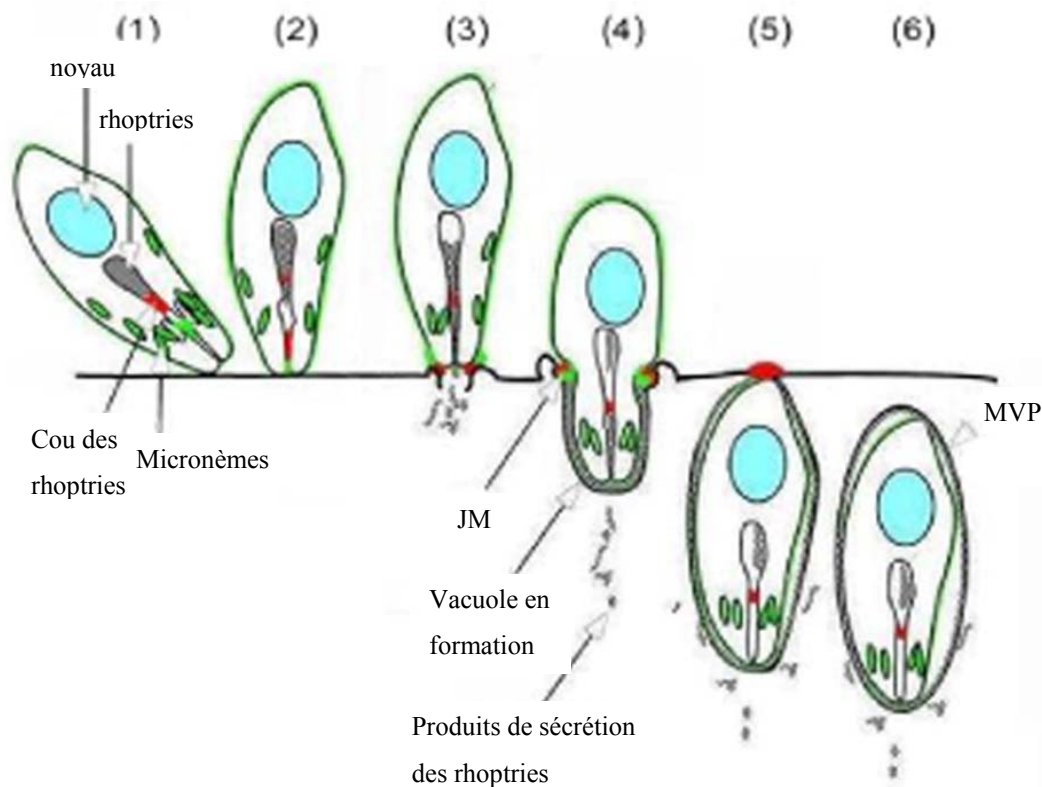


Fig. 7 : Reconnaissance de la cellule-hôte et invasion. (1) L'attachement initial à la cellule-hôte déclenche l'exocytose des micronèmes (en vert). (2) Les MICs reconnaissent des récepteurs cellulaires ce qui entraîne la réorientation du parasite. (3) L'exocytose des rhoptries permet l'établissement de la jonction mobile (JM), à laquelle participent à la fois des protéines du cou des rhoptries (en rouge) et des protéines de micronèmes. (4) Le parasite pénètre dans la cellule-hôte par invagination de la membrane plasmique. (5) Lorsque le parasite est complètement entré dans la vacuole, (6) celle-ci se referme. MVP, membrane de la vacuole parasitophore. D'après Alexander *et al.*, 2005.

II- 2- 2- 3- Maturation de la VP

La VP nouvellement formée migre vers le noyau par un mécanisme encore inconnu (Magno *et al.*, 2005). Les GD libèrent leur contenu, phénomène corrélé avec la maturation de la VP. Parmi les événements majeurs qui marquent cette maturation, on observe une association rapide (4 à 6 heures) des éléments du cytosquelette de la cellule-hôte avec la VP (Cintra and De Souza, 1985 ; Halonen and Weidner, 1994). Les microtubules de la cellule-hôte semblent se réorganiser autour de la VP, et le centrosome se détache de l'enveloppe nucléaire pour y être recruté (Coppens *et al.*, 2006). Des extensions membranaires de la MVP (EVP) dans le

cytosol de la cellule hôte s'étendent le long des microtubules de l'hôte (Dubremetz *et al.*, 1993), mais leur signification biologique reste à déterminer (Fig. 8). A l'inverse, des invaginations de la PVM dans la vacuole sous-tendues par des microtubules de la cellule-hôte sont également observées (Fig. 8). Les structures tubulaires ainsi formées, appelées HOST (Host Organelles Sequestering Tubules) permettraient l'acheminement vers la vacuole de vésicules de type endocytaires en vue de l'import de nutriments provenant de la cellule-hôte (Coppens *et al.*, 2006).

Certains organites de la cellule-hôte subissent également une relocalisation vers la VP : les endo-lysosomes, les mitochondries et le RE de l'hôte sont ainsi recrutés contre la MVP (Coppens *et al.*, 2006 ; Sinai *et al.*, 1997). Cette association pourrait permettre le détournement de lipides (cholestérol et choline) et d'acides gras pour lequel le parasite est auxotrophe (Coppens *et al.*, 2000). L'association du RE à la PVM semble essentielle pour le développement intracellulaire du parasite (Nakaar *et al.*, 2003).

Parallèlement à la sécrétion des GD, on observe la libération de vésicules multilamellaires 10 à 20 minutes après l'invasion, depuis une invagination postérieure de la membrane plasmique du parasite. Ce matériel membranaire se déploie dans tout l'espace de la vacuole, par un mécanisme inconnu qui semble impliquer les protéines GRA (Sibley *et al.*, 1986 , 1995). Le réseau de nanotubules membranaires (RNM, Fig. 8) ainsi formé est composé de tubules de 30 à 50 nm de diamètre, qui apparaissent connectés avec la MVP à certains endroits. Ces caractéristiques morphologiques semblent indiquer un rôle trophique du RNM dans les échanges de nutriments entre le parasite et la cellule hôte. La diffusion de substances de faible poids moléculaire (<1300 daltons) à travers la MVP a été démontrée (Schwab *et al.*, 1994), et l'existence d'un réseau de tubules intra-vacuolaires permettrait d'augmenter la surface d'échange entre le parasite et la cellule-hôte, favorisant ainsi ce mécanisme de diffusion. Cependant, le RNM n'apparaît pas essentiel pour la prolifération *in vitro* des parasites (Mercier *et al.*, 2002).

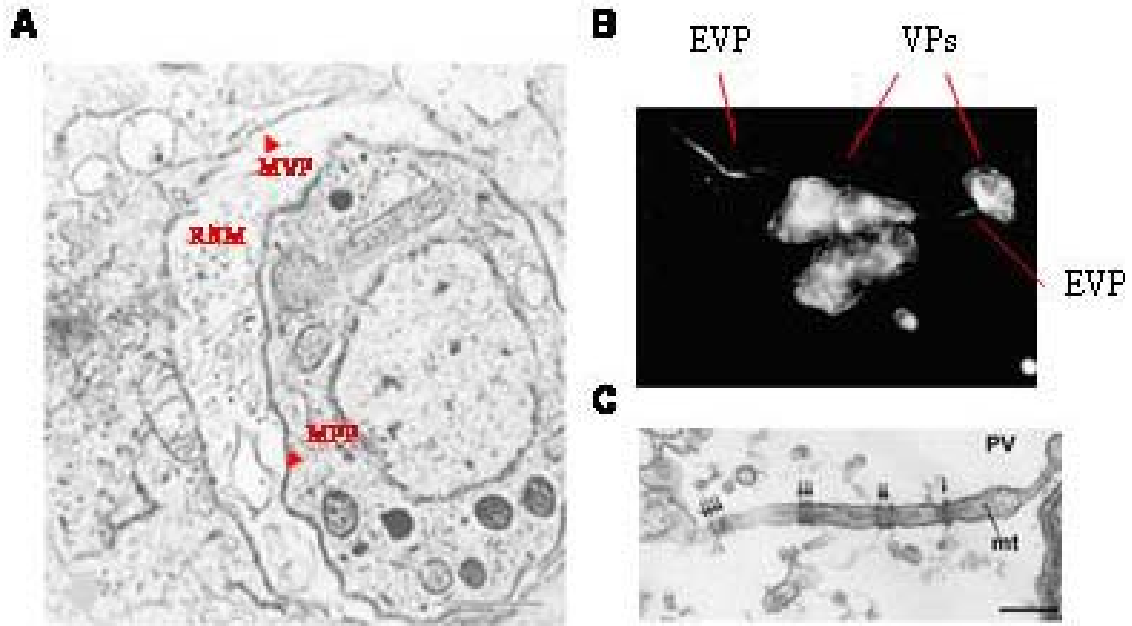


Fig. 8: Les différents systèmes membranaires de la VP. A- Vacuole parasitophore en microscopie électronique 10 minutes après invasion d'un macrophage (d'après Sibley *et al.*, 1986). MPP, membrane plasmique du parasite ; RMN, réseau de nanotubules membranaires ; MVP, membrane de la vacuole parasitophore. Barre 1µm. B- Extensions de la vacuole parasitophore (EVP) mises en évidence par immunofluorescence sur une cellule infectée par marquage anti-GRA7 (d'après Jacobs *et al.*, 1998). Barre 1µm. C- Structure d'un HOST à l'intérieur de l'espace vacuolaire d'après Coppens *et al.*, 2006. Les HOSTs sont ceinturés à intervalles réguliers par un matériel dense aux électrons (flèches). Mt , microtubule de la cellule-hôte. Barre 100 nm.

III- Trafic subcellulaire des protéines de *Toxoplasma gondii* : des processus conservés et des processus originaux

La mise en place de la vacuole de *T. gondii* implique la sécrétion orchestrée de protéines stockées dans des organites spécifiques des Apicomplexa : les micronèmes, les rhoptries, et les GD. Ce réseau de sécrétion régulée repose sur la compartimentation fonctionnelle des protéines du parasite, qui doivent être sécrétées de manière coordonnée aux différentes étapes de l'invasion. Après leur sécrétion, le devenir de ces protéines est variable : certaines s'associent à des membranes (protéines de GD) tandis que d'autres sont protéolysées, ce qui permet de réguler leur action (protéines de micronèmes). Le paragraphe suivant se propose de décrire l'état actuel des connaissances sur les mécanismes qui permettent l'adressage des protéines aux différents organites de sécrétion, puis l'exocytose régulée de ces organites. Enfin, les phénomènes post-sécrétoires impliquant ces protéines seront abordés. Les données présentées ci-dessous sont tirées principalement des revues de Ngô *et al.* (2000a), Kaasch and Joiner (2000), Mercier *et al.* (2005), et Lebrun *et al.* (2007).

III- 1- Trafic dans le système sécrétoire précoce

III- 1- 1- Entrée dans le réticulum endoplasmique

Toutes les protéines connues de *T. gondii* qui sont destinées aux organites de sécrétion ou à la surface du parasite possèdent un peptide signal N-terminal, qui leur permet d'entrer dans la voie de sécrétion au niveau du RE. Dans la plupart des cas étudiés, on a pu montrer que les protéines étaient transloquées dans la lumière du RE, et que le peptide signal était clivé. Les données issues du séquençage des EST ont permis d'identifier des homologues des gènes impliqués dans la machinerie de translocation (entre autres SEC61, SEC63, et SEC11) (Ajioka *et al.*, 1998). Un homologue de la protéine chaperonne BiP, spécifique du RE chez la levure et les eucaryotes supérieurs, a récemment été identifié comme étant une protéine résidente du RE de *T. gondii*. Cette rétention fait intervenir le motif HDEL carboxy-terminal de TgBiP (Hager *et al.*, 1999), probablement par interaction avec l'homologue parasitaire de Erd2, une protéine connue pour reconnaître les motifs KDEL/HDEL chez les eucaryotes

supérieurs. Le trafic des protéines sécrétoires de *T. gondii* fait donc intervenir des processus conservés au niveau du RE.

Il existe cependant des cas particuliers, qui concernent certaines protéines de micronèmes et de GD. La plupart des GRAs sont prédites comme transmembranaires par les logiciels de prédiction classiques (TMPRED, TMHMM), avec une topologie de type I. En effet, elles s'associent aux membranes de la vacuole parasitophore après sécrétion (voir paragraphe III-4-3). Chez les eucaryotes supérieurs, les protéines transmembranaires sont insérées de façon co-translationnelle dans la membrane du RE, et conservent une conformation transmembranaire tout le long de la voie de sécrétion, jusqu'à la membrane cible. Pourtant, à l'intérieur des GD, les GRAs se comportent comme des protéines solubles, avec une fraction fortement agrégée (Sibley *et al.*, 1995 ; Labruyère *et al.*, 1999 ; Lecordier *et al.*, 1999). Ces résultats sont corroborés par les données de la microscopie électronique, qui n'ont jamais montré l'intégration des GRAs transmembranaires dans la membrane du granule dense (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989 ; Charif *et al.*, 1990 ; Achbarou *et al.*, 1991) . Des constatations analogues concernent certaines protéines de micronèmes transmembranaires (MIC2, MIC6, MIC12, AMA1) (D. Soldati, communication personnelle). Les mécanismes moléculaires qui empêchent l'insertion membranaire attendue pour ces protéines au niveau du RE restent à élucider.

III- 1- 2- Trafic entre le RE et l'appareil de Golgi

Le traitement de tachyzoïtes à la bréfeldine A, une toxine qui inhibe le transport entre le RE et le Golgi, bloque le transport vésiculaire global de *T. gondii* (Chardin and McCormick, 1999). Ces observations suggèrent que toutes les protéines destinées aux organites transitent entre le RE et le Golgi. *T. gondii* possède des gènes homologues aux gènes codants pour les composants des complexes COP I et COP II, qui sont impliqués dans le transport antérograde et rétrograde entre le RE et le Golgi chez la levure et les eucaryotes supérieurs (Fig. 11). L'addition d'un motif acide à une protéine indicatrice exprimée dans le parasite permet l'export du RE, probablement par liaison avec les protéines COPII parasitaires (Hoppe and Joiner, 2000). Chez les eucaryotes supérieurs, les vésicules recouvertes de COPI interviennent dans le transport entre le RE et le Golgi mais aussi au sein du Golgi, or les sous-unités du

complexe COPI qui ont été identifiées chez le parasite sont localisées au niveau de l'appareil de Golgi en immunofluorescence (Liendo *et al.*, 2001).

Si ces données suggèrent la conservation fonctionnelle des mécanismes de transport entre les eucaryotes supérieurs et *T. gondii*, d'autres études mettent en évidence des particularités propres au parasite dans les mécanismes du trafic sécrétoire précoce :

Reiss *et al.* ont démontré l'interdépendance des protéines de micronèmes dès les premières étapes de la voie de sécrétion pour leur trafic et leur adressage correct aux micronèmes. Ils ont en effet démontré que le domaine galectin-like de MIC1 était nécessaire au repliement correct de MIC6, par la stabilisation du troisième domaine EGF et la région acide. En l'absence de ce domaine, le complexe MIC1/4/6 est retenu dans le RE (Reiss *et al.*, 2001). De même, la protéine MIC2, qui s'assemble en complexe avec la protéine M2AP (MIC2- Associated Protein) dans les parasites sauvages, est accumulée au niveau du ER/Golgi dans les parasites *m2apKO* (Huynh *et al.*, 2003). Initialement, ces phénomènes de rétention ont été interprétés comme résultant de la reconnaissance de ces complexes mal assemblés par le système qualité du RE. Cependant, des données récentes suggèrent plutôt que la protéine M2AP aurait un rôle d'escorteur pour la protéine MIC2, permettant son adressage correct aux micronèmes. Ces propriétés feraient intervenir la région propeptide de M2AP (Harper *et al.*, 2006). En ce qui concerne la protéine soluble MIC3, il a été montré que la présence du domaine propeptide empêche la liaison du domaine chitin-binding-like aux récepteurs cellulaires (Cérède *et al.*, 2002), ce qui suggère que cet élément pourrait faciliter le trafic de MIC3 en empêchant une interaction inadéquate avec d'autres protéines parasitaires dans le système sécrétoire précoce. Les régions propeptide des protéines de micronèmes sont par la suite clivées au niveau du réseau trans-Golgi (Soldati *et al.*, 2001 ; Rabeneau *et al.*, 2001 ; Carruthers, 2006) (Fig. 9).

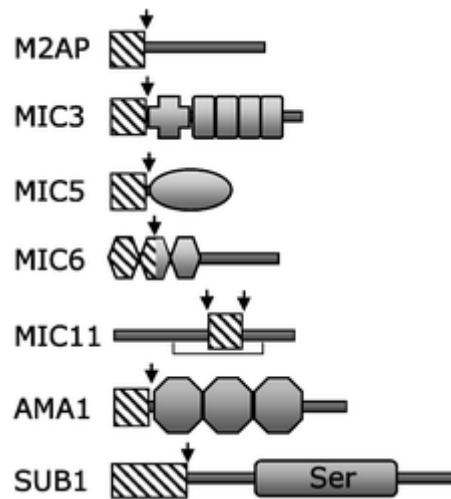


Fig. 9 : Maturation protéolytique des MICs au cours du trafic intra-parasitaire. Les complexes de MICs comprennent en général au moins un membre qui possède un domaine propeptide (rectangles hachurés). Ce domaine est situé à l'extrémité N-terminale sauf dans le cas de MIC11. Le site de clivage est indiqué par les flèches. Le crochet dessiné pour MIC11 représente un pont disulfure. D'après Carruthers, 2006.

Des mécanismes de protéines escorteurs similaires à ceux décrits pour les protéines de micronèmes existent pour les protéines de rhoptries de *Plasmodium*, chez qui les protéines solubles RAP2 et RAP3 forment un complexe oligomérique avec la protéine transmembranaire RAP1 (Baldi *et al.*, 2000). Même si des mécanismes similaires concernant les protéines de rhoptries de *T. gondii* n'ont pas encore été décrits, on peut supposer que l'assemblage en complexes de haut poids moléculaire est une caractéristique générale chez les Apicomplexa qui pourrait être nécessaire au trafic correct dans le RE/Golgi. Il existe chez les mammifères des mécanismes de tri similaires qui font intervenir la liaison à des protéines récepteurs transmembranaires (Thiele *et al.*, 1997), mais cela ne concerne que quelques exemples, alors que les parasites Apicomplexes semblent avoir recours à ces mécanismes de façon prédominante.

III- 2- Tri des protéines

III- 2- 1- Tri des protéines chez les eucaryotes supérieurs

Chez les eucaryotes supérieurs, le tri des protéines destinées à être sécrétées de manière constitutive versus celles dont la sécrétion est soumise à régulation se fait au niveau du trans-Golgi (TG). En l'absence de signal de rétention, les protéines transmembranaires de surface ainsi que les protéines associées à une ancre GPI sont ancrées dans la membrane des vésicules de la voie constitutive, qui permettent leur adressage par défaut à la surface de la cellule. A l'inverse, les protéines qui doivent être adressées aux voies de sécrétion régulées sont empaquetées dans des granules de sécrétion immatures, avant d'être stockées dans les granules de sécrétion définitifs. Certaines données montrent que l'adressage aux vésicules de sécrétion régulée repose sur des récepteurs présents au niveau du TG qui reconnaissent spécifiquement des motifs présents dans les protéines destinées aux granules. Par exemple, la carboxypeptidase E (CPE) semble jouer le rôle d'un récepteur permettant le tri de plusieurs protéines cargo vers les granules de sécrétion régulés (Cool and Loh, 1998). Ce modèle du « tri à l'entrée » s'oppose au modèle du « tri par rétention », selon lequel le contenu global du TG serait encapsulé dans les granules naissants, puis les protéines destinées à être sécrétées constitutivement progressivement extrudées dans des vésicules de faible densité. Ainsi, seules les protéines appropriées seraient retrouvées dans le granule mature (voir la revue de Arvan and Castle, 1998). Par exemple, l'adressage aux lysosomes des cellules β -pancréatiques de plusieurs enzymes lysosomales et du récepteur du mannose-6-phosphate fait intervenir une étape de bourgeonnement de vésicules recouvertes de clathrine à partir des granules de sécrétion immatures (Kuliawat *et al.*, 1997).

Plusieurs mécanismes ont été identifiés comme expliquant l'adressage spécifique de certaines protéines aux granules de sécrétion régulés (voir la revue de Dikeakos and Reudelhuber, 2007). Tout d'abord, beaucoup de protéines destinées à ces granules ont la capacité de former des multimères ou des agrégats. Une acidification du milieu intra-luminal ou une augmentation de la concentration de certains ions bivalents, comme les ions Ca^{2+} ou Zn^{2+} peuvent être à l'origine de ces phénomènes. Les agrégats sont empaquetés dans les granules de sécrétion immatures, qui conduisent à la formation de GD aux électrons (voir la revue de Dannies, 2001). Un autre mécanisme repose sur la reconnaissance par des protéines

adaptatrices (AP) de motifs basés sur des résidus tyrosine de type YXXΦ (avec X= n'importe quel acide aminé, et Φ= acide aminé portant un domaine hydrophobe encombrant). Des protéines transmembranaires présentant ces motifs tyrosine dans leur partie cytoplasmique peuvent ainsi être adressées spécifiquement aux membranes des granules de sécrétion. Une influence du domaine transmembranaire de ces protéines peut également être impliquée dans les processus de rétention ou d'adressage dans des compartiments spécifiques (Bonifacino *et al.*, 1991 ; Zaliauskiene *et al.*, 2000). La taille de ce domaine pourrait intervenir dans la stabilisation des protéines transmembranaires dans les différentes membranes plus ou moins épaisses de la cellule (Bretscher and Munro, 1993). En outre, la conformation correcte des protéines, une éventuelle maturation, le niveau et le temps d'expression sont autant de paramètres qui interviennent également dans l'adressage correct des protéines.

III- 2- 2- Tri des protéines chez *T. gondii*

Chez *T. gondii*, l'existence d'une voie de sécrétion constitutive n'a toujours pas été démontrée. Les protéines de surface décrites à ce jour sont majoritairement ancrées dans la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI (protéines SAG pour Surface Antigens), mais le trafic intra-parasitaire de ces protéines est trop rapide pour que l'on puisse identifier les vésicules par lesquelles elles transitent pour gagner la surface. Par contre, les organites de sécrétion spécifiques des Apicomplexa que constituent les micronèmes, les rhoptries et les GD ont été étudiés de façon extensive. Les mécanismes impliqués dans leur formation sont partiellement élucidés, et font intervenir à la fois des processus conservés et des événements originaux (voir résumé en Fig. 11).

III- 2- 2- 1- Adressage aux granules denses

III- 2- 2- 1- 1- La voie par défaut pour les protéines solubles

Des protéines indicatrices solubles qui ne possédaient aucun motif d'adressage identifié ont été exprimées dans le Toxoplasme, et il a été montré que ces protéines étaient adressées aux GD avant d'être libérées dans la vacuole parasitophore (Karsten *et al.*, 1998 ; Striepen *et al.*, 2001). Par contre, l'addition d'une ancre GPI à ces protéines entraîne leur relocalisation à la surface du parasite, probablement après transit via la voie constitutive de sécrétion. La délétion du signal d'ancrage GPI de la protéine SAG1 conduit à sa sécrétion dans l'espace de

la vacuole parasitophore via les GD. Ces éléments laissent supposer que les GD constitueraient la voie par défaut de sécrétion des protéines solubles dans le parasite, se substituant à la voie de sécrétion vésiculaire constitutive pour ces protéines. Pourtant, les GD sont morphologiquement semblables aux granules des voies de sécrétion régulées chez les eucaryotes supérieurs. Notamment les GRAs présentent un fort taux d'agrégation à l'intérieur de ces organites, ce qui pourrait représenter un mécanisme d'adressage aux GD comme c'est le cas chez les eucaryotes supérieurs (voir la revue de Dannies, 2001).

III- 2- 2- 1- 2- Cas des GRAs transmembranaires

Existe-t-il des signaux qui permettent l'adressage des GRAs transmembranaires aux GD? La condensation de ces protéines que l'on observe en fractionnement sur des parasites extracellulaires (Sibley *et al.*, 1995 ; Labruyère *et al.*, 1999; Lecordier *et al.*, 1999) pourrait constituer un mécanisme d'adressage. Cette agrégation ne semble pas résulter d'une diminution de pH dans les GD. Elle pourrait être due à une grande concentration en calcium dans ces granules, liée à la prédominance de la protéine GRA1 qui peut lier le calcium via ses domaines EGF. Des motifs YXXΦ ont été identifiés dans la queue C-terminale de GRA4 et GRA7, mais ce motif n'est pas reconnu par l'homologue parasitaire de AP-1 du moins dans le cas de GRA4 (Ngô *et al.*, 2003). Il a également été proposé que la petite taille des domaines transmembranaires des GRAs est responsable de leur adressage aux GD (Karsten *et al.*, 2004). En effet, une fusion composée de la protéine BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) associée aux domaines transmembranaire et C-terminal de GRA4 est adressée aux GD, alors que la même fusion présentant le domaine transmembranaire de la protéine LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor) à la place de celui de GRA4 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi.

III- 2- 2- 2- Formation des micronèmes

III- 2- 2- 2- 1- protéines de micronèmes transmembranaires

L'adressage aux micronèmes de certaines protéines transmembranaires repose sur des signaux d'adressage spécifiques présents dans la queue C-terminale de ces protéines. Di Cristina *et al.* ont montré en 2000 que le domaine C-terminal (Ct) de MIC2 était suffisant pour adresser aux micronèmes une protéine chimérique constituée du domaine N-terminal de SAG1, du domaine transmembranaire de CD46, et de ce domaine. Les motifs YHYY et EIEYE présents

dans ce domaine ont été identifiés comme déterminants dans l'adressage spécifique aux micronèmes. De plus, le motif GYQTI, présent dans le domaine Ct de la protéine de lysosomes Lamp, permet d'adresser aux micronèmes d'une fusion présentant ce domaine (Hoppe *et al.*, 2000). Il apparaît donc que des motifs basés sur des résidus tyrosine sont impliqués dans l'adressage aux micronèmes, probablement par association avec les molécules AP identifiées chez *T. gondii*.

La reconnaissance de ces signaux spécifiques et le tri des protéines de micronèmes semblent s'effectuer au niveau de l'appareil de Golgi puisque des mutants présentant une altération du motif GYQTI du domaine Ct de Lamp sont retenus dans un compartiment de type Golgi (Hoppe *et al.*, 2000).

III- 2- 2- 2- 2- protéines de micronèmes solubles

Des expériences de complémentation du mutant *mic3KO* ont permis d'élucider les mécanismes d'adressage de la protéine soluble MIC3 (El Hajj and Lebrun, non publié). La délétion du domaine propeptide N-terminal de cette protéine entraîne une délocalisation dans la vacuole parasitophore, ce qui montre que l'information nécessaire à l'adressage aux micronèmes est contenue dans ce pro-domaine. En plus du propeptide, chacun des 3 domaines EGF de la protéine est suffisant pour l'adressage aux micronèmes.

Dans certains cas, l'adressage correct des protéines de micronèmes solubles dépend de leur assemblage en complexe avec des protéines de micronèmes transmembranaires. En effet, l'absence de la protéine transmembranaire MIC6 dans les parasites *mic6KO* a pour effet de provoquer la libération de MIC1 et MIC4 dans la vacuole (Reiss *et al.*, 2001). Comme cette étude montre également que le domaine Ct de MIC6 est suffisant pour localiser la protéine aux micronèmes, on peut supposer que l'adressage correct de tout le complexe MIC1/4/6 repose sur les signaux présents dans ce domaine. De même, il a été montré que la protéine transmembranaire MIC8 joue le rôle d'escorteur pour MIC3 (Meissner *et al.*, 2002), et MIC2 pour M2AP (Hyunh *et al.*, 2004). Ces données démontrent l'aspect multifactoriel de l'adressage aux micronèmes.

III- 2- 2- 3- Biogénèse des rhoptries

Les protéines de la famille ROP2 sont des protéines transmembranaires de type I. Elles possèdent dans leur queues cytoplasmiques à la fois des motifs tyrosine et des motifs dileucine (Hoppe *et al.*, 2000 ; Ngô *et al.*, 2003). La mutation de l'un ou l'autre de ces signaux provoque la diminution de l'adressage aux rhoptries de ROP2 ou ROP4, et on observe l'accumulation de ces protéines dans un compartiment appelé multivesicular body (MVB) (Fig. 10B). Il s'agit d'un compartiment distinct des GD, des micronèmes et du trans-golgi, qui est marqué par un anticorps dirigé contre le marqueur endosomal VPS4 (Vacuolar Protein Sorting 4, Fig. 10B) (Yang *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que les protéines de rhoptries transitent via le système d'endocytose, par liaison avec des protéines adaptatrices. En faveur de cette hypothèse, il a été montré que le domaine YXX Φ facilite le tri des protéines de rhoptries en interagissant avec la chaîne μ de la protéine adaptatrice AP-1 de *T. gondii* (Hoppe *et al.*, 2000). Tg μ 1 est détectée au niveau de l'appareil de Golgi, de vésicules associées au Golgi, et au niveau des rhoptries à la fois dans la lumière et à la membrane (Fig. 10A). L'expression d'un dominant négatif de Tg μ 1 empêche l'adressage aux rhoptries et la biogénèse de ces organites (Ngô *et al.*, 2003). De larges structures tubulaires et multivésiculaires sont alors observées, et ROP2 est retrouvée au niveau d'un compartiment qui ressemble fortement au MVB décrit ci-dessus (Fig. 10B). Ces données suggèrent que les protéines de rhoptries issues du TG transitent à travers un compartiment endosomal lors de leur adressage aux rhoptries. Les rhoptries pourraient ainsi être considérés comme des lysosomes sécrétoires (Ngô *et al.*, 2004).

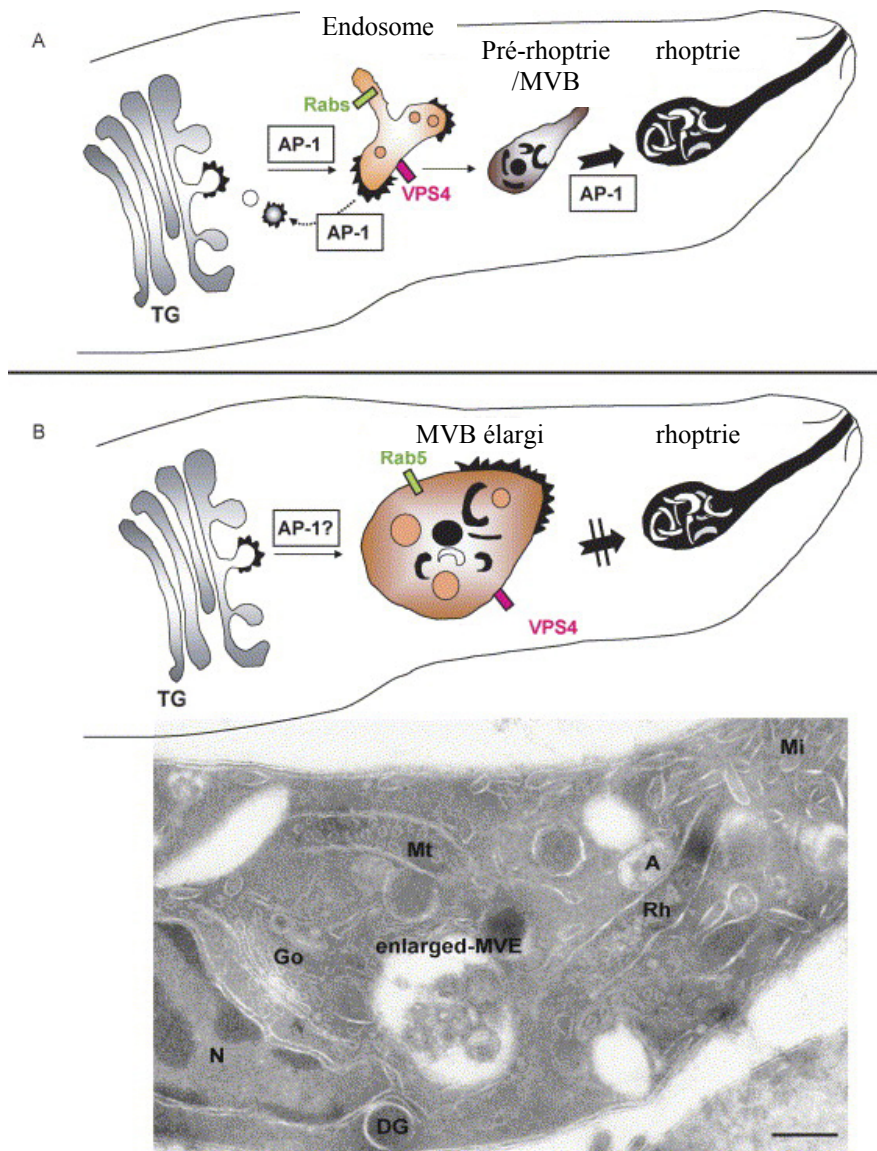


Fig. 10 : Modèle de la biogénèse des rhoptries chez les Apicomplexa. (A) Le transport vésiculaire qui permet la formation des rhoptries est médié par la molécule AP-1, généralement associée au transport vésiculaire vers les lysosomes. Les protéines ROP transitent par la voie endosomale depuis le réseau trans-Golgi (TG) via un corps multivésiculaire (MVB) ou rhoptrie immature. La protéine chaperonne VPS4 serait impliquée dans la régulation de la dynamique membranaire ou dans le transport du cholestérol au sein des différentes membranes. (B) Des parasites exprimant un dominant négatif de TgAP-1 ou une forme de ROP2 délétée de son signal tyrosine Ct présentent un compartiment de type MVB, facilement identifiable en microscopie électronique, au niveau duquel s'accumulent les marqueurs endosomaux Rab5 et VPS4. Rh, Rhoptrie ; Go, Golgi ; Mt, mitochondrie ; N, noyau ; MVE, multivesicular endosome ; A, apicoplaste ; DG, granule dense. Barre 0.25 μ m. D'après Coppens and Vielemeyer, 2005.

En ce qui concerne les protéines de rhoptries solubles, l'étude de l'adressage de ROP1 a conduit à l'identification de deux domaines, le domaine propeptide et un peptide central (Bradley and Boothroyd, 2001 ; Striepen *et al.*, 2001).

Ces études montrent que l'adressage aux rhoptries fait intervenir des mécanismes divers, présentant des similitudes avec les phénomènes connus chez les eucaryotes supérieurs.

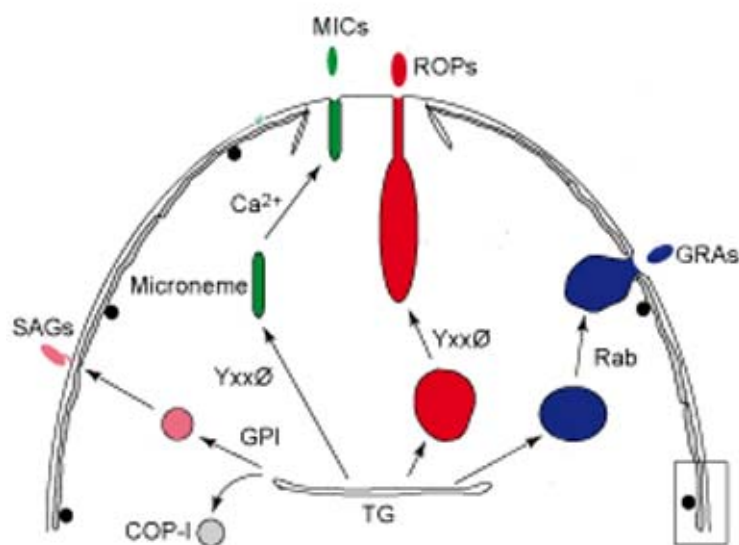


Fig. 11 : Résumé des différents mécanismes impliqués dans le trafic intracellulaire des protéines MICs/ROPs/GRAs de *T. gondii* d'après Ngô *et al.*, 2000b. Le transport rétrograde à partir du Golgi ferait intervenir des vésicules recouvertes par les protéines COP-I. Les protéines de surface SAGs qui sont ancrées par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) transitent probablement par la voie constitutive de sécrétion. Le tri des protéines MICs à partir du trans-Golgi (TG) et des ROPs à partir d'un compartiment intermédiaire de sécrétion fait intervenir des signaux tyrosine (YxxΦ). La sécrétion des micronèmes est calcium-dépendante (Ca²⁺), tandis que celle des GD fait intervenir des protéines de la famille Rab.

III- 3- Sécrétion des micronèmes, rhoptries et granules denses

L'invasion, l'établissement et le maintien de la vacuole parasitophore sont des étapes critiques du développement parasitaire. Ces étapes dépendent de l'exocytose séquentielle des micronèmes, rhoptries et GD lors de l'invasion (Dubremetz *et al.* 1993 ; Carruthers and Sibley, 1997). La libération du contenu de ces trois organites en moins de trente secondes doit être orchestrée de manière fine et nécessite des signaux initiés par l'entrée en contact avec la cellule-hôte. Certains de ces signaux ont été identifiés, mais plusieurs aspects de la sécrétion chez *T. gondii* restent obscurs.

III- 3- 1- Sécrétion des micronèmes

La sécrétion des protéines de micronèmes est initiée par le contact avec la cellule hôte, et est étroitement couplée avec l'invasion cellulaire. Les micronèmes fusionnent avec le cou des rhoptries, ce qui permet la libération des protéines de micronèmes dans l'espace extracellulaire (Carruthers *et al.*, 1999 ; Alexander *et al.*, 2005). Il s'agit d'une sécrétion régulée, dont le stimulus exogène n'a pas encore été identifié. On peut mimer l'effet de ce stimulus en augmentant artificiellement le taux de calcium intracellulaire dans le parasite par l'utilisation d'ionophores calciques tels que l'A23187 ou l'ionomycine : on observe alors la sécrétion des protéines de micronèmes en l'absence de cellules hôtes. Inversement, la chélation du calcium intracellulaire bloque la sécrétion des protéines de micronèmes et l'invasion, ce qui indique que la sécrétion des protéines de micronèmes est contrôlée par une voie calcium-dépendante (Carruthers *et al.*, 1999) (Fig. 11).

Une étude a montré que l'entrée de calcium extracellulaire dans le parasite n'est pas requise pour la sécrétion des protéines de micronèmes (Lovett and Sibley, 2003), ce qui indique que l'augmentation de calcium intra-parasitaire observée lors de l'invasion aurait pour origine des réservoirs internes au parasite. Les Apicomplexa possèdent de nombreux réservoirs calciques, tels que le RE, les mitochondries et les acidocalcisomes. L'activation de la sécrétion des protéines de micronèmes par la thapsigargine, qui empêche la séquestration du calcium intracellulaire dans le RE, montre que *T. gondii* utilise le RE comme réserve de calcium intracellulaire (Carruthers and Sibley, 1999). L'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et des canaux calciques de la famille des récepteurs IP3/ryanodine (présents chez les vertébrés à la

membrane du RE) semblent impliqués dans la libération de calcium intra-cellulaire lors de l'invasion (Lovett *et al.*, 2002). L'implication des acidocalcisomes dans la libération du calcium nécessaire à la sécrétion des protéines de micronèmes a également été suggérée (Moreno and Zhong, 1996 ; Luo *et al.*, 2005).

La sécrétion des micronèmes est également inhibée par l'addition d'un inhibiteur de kinases (Dobrowolski *et al.*, 1997, Carruthers *et al.*, 1999). En particulier, l'activité d'une protéine kinase dépendante du GMP cyclique (PKG) est nécessaire dans les étapes ultérieures à l'augmentation de calcium (Donald *et al.*, 2002 ; Wiersma *et al.*, 2004). L'exocytose des micronèmes est donc contrôlée par une voie calcium-dépendante, impliquant la phosphorylation de protéines.

III- 3- 2- Exocytose des rhoptries

Des observations de microscopie électronique ont révélé la présence de rhoptries vides dès le stade de l'attachement apical à la cellule hôte (Perkins, 1992 ; Dubremetz, 2007). Les mécanismes qui permettent l'exocytose des rhoptries sont méconnus, mais une étude récente a montré que la libération des protéines de rhoptries était réduite en l'absence de la protéine AMA1 (Mital *et al.*, 2005). L'attachement intime à la cellule-hôte serait donc requis pour la sécrétion efficace du bulbe des rhoptries. Il semblerait que les ROPs et les RONs soient libérées de façon simultanée, après la sécrétion des protéines de micronèmes (Lebrun *et al.*, 2005).

III- 3- 3- Sécrétion des granules denses : phénomène constitutif ou régulé ?

La sécrétion des GD pose plusieurs questions encore non résolues, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il est difficile de comprendre comment les GD peuvent fusionner avec la membrane plasmique du parasite (MPP), quand celle-ci est isolée du cytoplasme de la cellule par le complexe membranaire interne (IMC). On suppose qu'il existe des interruptions de l'IMC au niveau sub-apical, qui permettraient l'accès et la fusion des GD avec la MPP (Leriche and Dubremetz, 1990 ; Dubremetz *et al.*, 1993). De plus, la sécrétion des GD intervient en deux temps, tout d'abord sous forme d'un burst de sécrétion au moment de l'invasion, puis de manière continue pendant le développement intracellulaire du parasite. La

sécrétion des GD présente donc des traits caractéristiques à la fois d'une sécrétion régulée et d'une sécrétion constitutive, et l'on trouve des arguments en faveur des deux mécanismes :

- L'adressage quantitatif de protéines indicatrices hétérologues solubles aux GD sans signal d'adressage identifié est en faveur d'une sécrétion de type constitutif (Karsten *et al.*, 1998 ; Striepen *et al.*, 2001). De plus, une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , qui provoque habituellement l'exocytose des granules de sécrétion régulée, n'a aucun effet sur la sécrétion des GD (Chaturvedi *et al.*, 1999 ; Liendo and Joiner, 2000).

- A l'inverse, plusieurs arguments indiquent que les GD seraient sécrétés de façon régulée :

- La libération des GD pré-existants n'est pas sensible à la bréfeldine A (Coppens *et al.*, 1999), drogue qui a pour effet de bloquer la voie de sécrétion constitutive des eucaryotes par déstructuration du RE et de l'appareil de Golgi.
- La détection d'un burst de sécrétion de ces organites dans la vacuole parasitophore en formation indique l'existence d'un signal de sécrétion. On peut stimuler expérimentalement cette sécrétion en présence de sérum, ce qui laisse supposer qu'un ou des sécrétagogue(s) sont présents dans le sérum (Coppens *et al.*, 1999).

Il semblerait donc qu'il existe deux mécanismes distincts de sécrétion des GD. L'état de compaction des protéines contenues dans ces organites pourrait influencer le mode de sécrétion.

III- 4- Trafic post-sécrétoire chez *T. gondii*

La vacuole parasitophore (VP) de *T. gondii* est composée de différents systèmes membranaires (voir Fig. 8 dans le paragraphe II- 2- 2- 3) :

- Le parasite, délimité par sa membrane plasmique (MPP)
- Un Réseau de Nanotubules Membranaires (RNM), présent dans l'espace de la vacuole
- La Membrane de la Vacuole Parasitophore (MVP), délimitant la vacuole du cytoplasme de la cellule-hôte
- Le contour de la MVP n'est pas régulier mais forme des extensions dans le cytoplasme de la cellule-hôte (EVP pour Extensions de la Vacuole Parasitophore) et des invaginations dans la vacuole, sous-tendues par des microtubules de la cellule-hôte (HOST pour Host Organelles Sequestering Tubules).

Les protéines de *T. gondii* qui entrent dans la voie de sécrétion peuvent soit être adressées à la surface du parasite, soit être sécrétées et s'associer à un ou plusieurs des compartiments vacuolaires. De plus, certaines protéines de rhoptries sont adressées au-delà de la VP, au noyau de la cellule-hôte. Les mécanismes qui régissent le trafic post-sécrétoire de protéines chez ce parasite présentent donc des facettes originales, qui seront présentées ci-dessous.

III- 4- 1- Cas des protéines de micronèmes transmembranaires : insertion dans la MPP

La plupart des protéines de micronèmes transmembranaires semble adopter une topologie transmembranaire de type I dès le niveau du RE et conserver cette conformation tout au long de la voie de sécrétion. Lors de l'invasion, la fusion des micronèmes avec la surface entraînerait donc l'exposition du domaine N-terminal de ces protéines dans le milieu extérieur, alors que le domaine C-terminal resterait à l'intérieur du parasite. Selon le modèle actuel, le moteur acto-myosine qui est localisé juste sous la MPP interagirait de façon indirecte avec les queues cytoplasmiques des protéines de micronèmes transmembranaires, ce qui permettrait la relocalisation de ces protéines au pôle postérieur du parasite au fur et à mesure que celui-ci pénètre dans la cellule hôte (Sibley, 2003 ; Keeley and Soldati, 2004 ; Soldati and Meissner, 2004). Une fois redistribuées, les protéines de micronèmes impliquées dans ces processus seraient clivées au niveau de leur domaine transmembranaire ce qui

permettrait la dissociation de l'interaction hôte-parasite et la fermeture de la vacuole parasitophore. En effet, l'inhibition de la protéolyse de MIC2 par mutation de son domaine transmembranaire inhibe l'entrée dans la cellule-hôte (Brossier *et al.*, 2003). L'activité protéolytique impliquée a été dénommée MPP1 pour Microneme Protease Activity 1, il s'agirait d'une sérine protéase de type rhomboïde (Urban and Freeman, 2003 ; Dowse and Soldati, 2005 ; Brossier *et al.*, 2005).

III- 4- 2- Trafic post-sécrétoire des protéines de rhoptries

III- 4- 2- 1- Fusion de vésicules avec la MVP

Lors de l'invasion, des vésicules dérivées des rhoptries sont libérées dans la vacuole parasitophore en formation. Ces vésicules contiennent des composants lipidiques et certaines protéines de rhoptries (Saffer *et al.*, 1992 ; Beckers *et al.*, 1994 ; Carey *et al.*, 2004 ; El Hajj *et al.*, 2006). Leur fusion avec la MVP naissante entraîne l'exposition des protéines en question dans le cytoplasme de la cellule-hôte. ROP2 a été décrite comme étant une protéine intégrale de la MVP, avec son extrémité N-terminale exposée dans la cellule-hôte. Cette topologie revêt une importance fonctionnelle puisqu'elle permet l'exposition d'un signal d'adressage mitochondrial, ce qui permet de recruter les mitochondries de l'hôte au niveau de la MVP (Sinai *et al.*, 1997 ; Sinai and Joiner, 2001). Cette association permettrait l'approvisionnement de la vacuole parasitophore en lipides provenant de la cellule-hôte. En microscopie, on observe que les protéines de la famille ROP2 forment des agrégats au niveau de la MVP, ce qui laisse supposer que ces protéines sont organisées en complexes supra-moléculaires pouvant former des pores impliqués dans l'acquisition de nutriments (Schwab *et al.*, 1994). Ces données sur le rôle putatif de ROP2 sont à mettre en relation avec le fait que cette protéine est essentielle (C. J. M. Beckers and K. A. Joiner, résultats non publiés). L'inhibition ciblée de l'expression de ROP2 en utilisant des ARN antisens résulte en une diminution de la capacité à envahir et à se multiplier dans des fibroblastes *in vitro*, et en une atténuation de la virulence chez la souris (Nakaar *et al.*, 2003). D'autres protéines de rhoptries paraissent jouer un rôle primordial, comme ROP5 dont l'expression semble essentielle (El Hajj *et al.*, 2007a). A l'inverse de ROP2 et ROP4, ROP5 semble être insérée dans la MVP avec son extrémité C-terminale exposée dans le cytoplasme de la cellule-hôte, ce qui pourrait refléter un rôle spécifique de ce fragment de ROP5 dans l'interaction hôte-pathogène (El Hajj *et al.*, 2007a).

III- 4- 2- 2- Adressage au noyau de la cellule-hôte

Les cellules infectées par *T. gondii* voient leur expression génique remodelée par le parasite. Selon la virulence de la souche, le degré de cette modulation est plus ou moins important. Parmi les gènes concernés, on trouve des gènes codant pour des chimiokines (GRO1, GRO2, LIF et MCP1), des cytokines (IL-1 β , IL-6) et des régulateurs de transcription (REL-B, NF- κ B, p105, I- κ B) (Blader *et al.*, 2001). Des données récentes indiquent que des protéines de rhoptries pourraient participer à cette modulation. En effet, les protéines TgPP2C et ROP16 sont adressées au noyau de la cellule-hôte peu après l'infection (Gilbert *et al.*, 2005 ; Coller *et al.*, 2005). On a pu identifier un signal de localisation nucléaire dans la séquence de ROP16, et le fait que cette protéine possède un domaine kinase putatif (voir paragraphe II- 1- 3- 3- 1-) suggère qu'elle pourrait interférer avec les fonctions cellulaires par phosphorylation de molécules de la cellule-hôte. De plus, le gène *ROP16* appartient à un locus qui contient plusieurs autres gènes impliqués dans la manipulation de l'expression génique de la cellule-hôte (Coller *et al.*, 2005).

III- 4- 3- Association membranaire post-sécrétoire des protéines de granules denses

Les protéines de GD sont libérées dans l'espace de la vacuole néoformée sous forme d'un burst de sécrétion. Les données d'immunomarquage et de microscopie électronique indiquent que la plupart d'entre elles s'associent de manière spécifique aux différents systèmes membranaires de la vacuole. Les protéines GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9 sont détectées en association avec les membranes du RNM (Mercier *et al.* 1993 ; Mévelec *et al.*, 1992 ; Lecordier *et al.*, 1995 ; Adjogble *et al.*, 2004). Une fraction de GRA1, GRA3, GRA5, GRA7 et des NTPases sont également détectées au niveau de ces membranes (Charif *et al.*, 1990 ; Achbarou *et al.*, 1991 ; Bonhomme *et al.*, 1998 ; Sibley *et al.*, 1994) (Fig. 12). Par contre, les protéines GRA3, GRA5, GRA7 et GRA8 sont retrouvées préférentiellement associées à la MVP et à ses extensions (Achbarou *et al.*, 1991, Dubremetz *et al.*, 1993 ; Lecordier *et al.*, 1993 ; Sinai *et al.*, 1997 ; Bonhomme *et al.*, 1998 ; Carey *et al.*, 2000) (Fig. 12). GRA7 apparaît plus spécifiquement associée aux extensions intravacuolaires, les HOSTs (Coppens *et al.*, 2006).

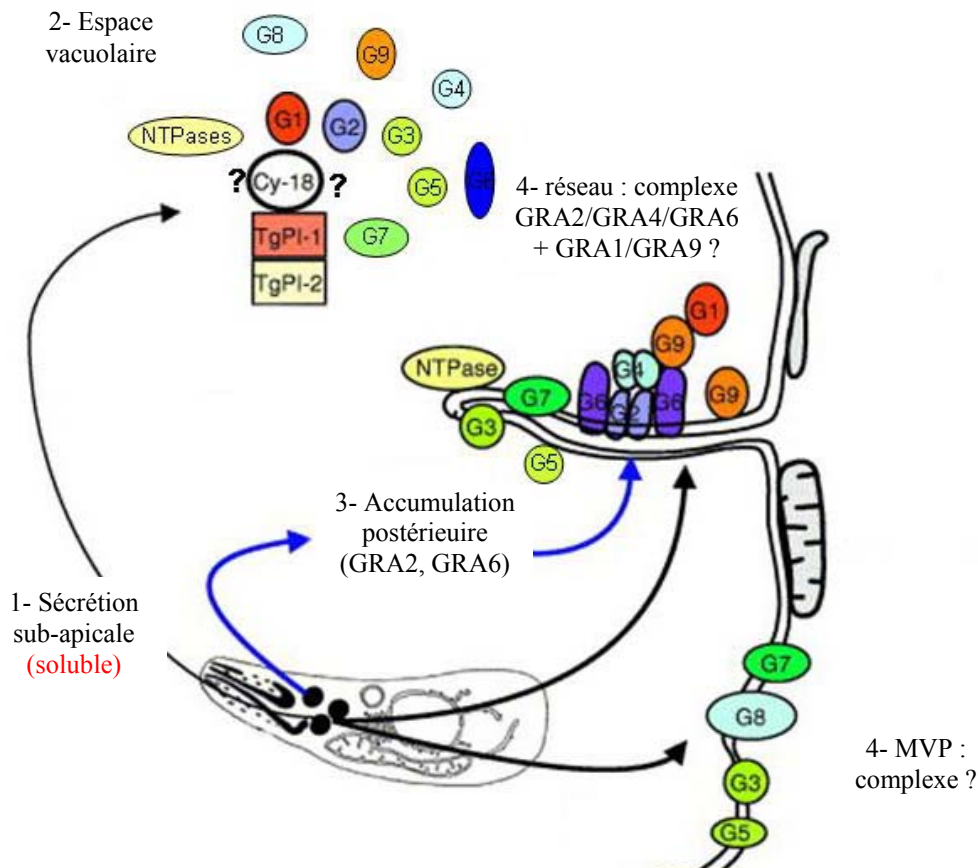


Fig. 12 : Adressage spécifique des protéines de GD dans la vacuole parasitophore d'après Mercier *et al.*, 2005. Pendant la première heure après l'invasion, les GD fusionnent avec la membrane sub-apicale du parasite. GRA1 et les TgPIs, ainsi qu'une fraction des autres GRAs, demeurent solubles dans la vacuole. GRA2 et GRA6 s'accumulent de façon transitoire au pôle postérieur, puis interviennent dans la formation d'un complexe GRA2/GRA4/GRA6 au niveau du réseau mature. D'autres protéines de GD sont également associées à ces membranes de façon plus ou moins forte. GRA3, GRA5, GRA7 et GRA8 sont détectées au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore (MVP). On ne connaît pas la localisation exacte de Cy-18.

Ces observations supposent que des mécanismes permettent le passage de l'état soluble à une association lipidique pour ces protéines. Les mécanismes qui permettent le tri des protéines de GD vers l'un ou l'autre des compartiments de la VP sont inconnus. Par contre, on peut étudier la nature biochimique de l'association de ces protéines avec les membranes de la vacuole.

Cette association repose soit sur des interactions de type liaison hydrogène, dissociables par traitement à l'urée, soit sur des interactions hydrophobes avec les lipides constitutifs des différentes membranes, dissociables avec des détergents non-ioniques comme le NP-40. Le principe du fractionnement subcellulaire de cellules infectées qui permet de distinguer les propriétés biochimiques de ces différents types de protéines est représenté sur la figure 13.

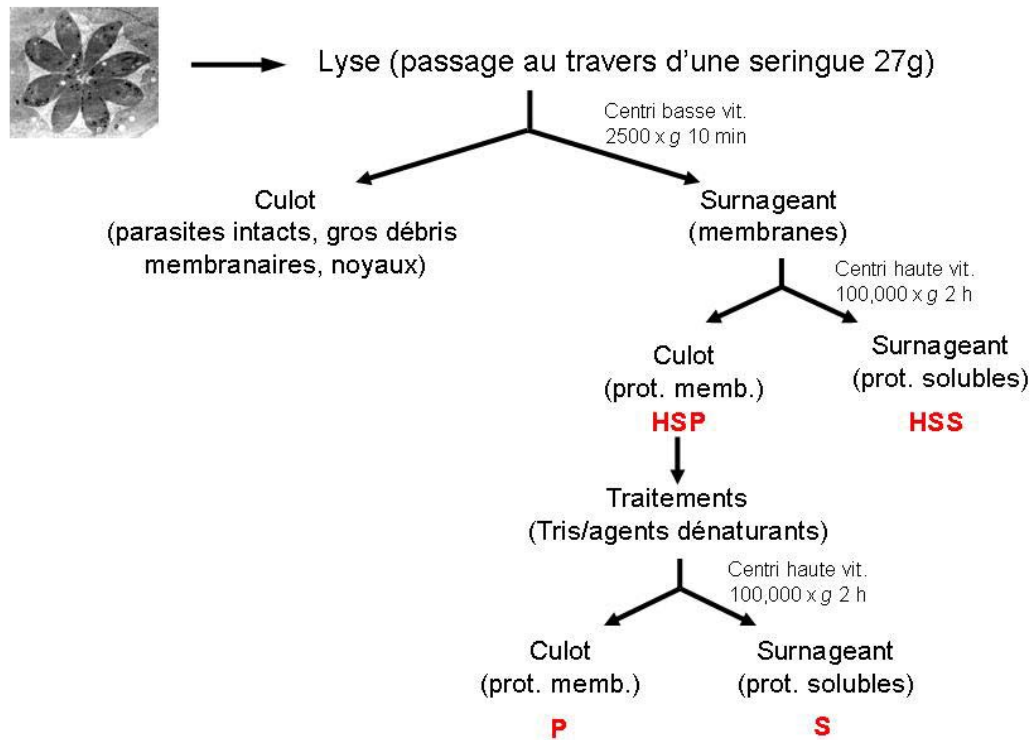


Fig. 13: Analyse de la fraction vacuolaire de cellules infectées par fractionnement subcellulaire. Les cellules sont lysées par passage à travers une seringue 27 g. Les parasites intacts et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à basse vitesse, puis le surnageant est soumis à une étape d'ultracentrifugation pour obtenir une fraction ultrasoluble (HSS pour High Speed Pellet). Les protéines associées au HSP (High Speed Pellet) sont traitées par différents agents dénaturants, et les protéines solubilisées (S) par ces traitements sont séparées des résidus membranaires (P) par ultracentrifugation. D'après Sibley *et al.*, 1995.

III- 4- 3- 1- Association aux membranes de la vacuole par des liaisons de type hydrogène

Les protéines GRA1 et les NTPases sont majoritairement solubles dans la vacuole mais présentent également une association très labile avec les membranes du réseau (Sibley *et al.*, 1994 ; 1995).

GRA4 et GRA9 présentent une association spécifique avec ce compartiment membranaire. Cette association repose uniquement sur des liaisons faibles de type liaison hydrogène pour GRA4 (Labruyère *et al.*, 1999), mais l'interaction de GRA9 avec le RNM fait également intervenir des liaisons hydrophobes (Adjogble *et al.*, 2004).

III- 4- 3- 2- Insertion dans les membranes du réseau

GRA6 est l'unique exemple de protéine GRA connue comme étant capable de s'insérer dans les membranes du réseau (Labruyère *et al.*, 1999). Elle est en effet pourvue d'un domaine transmembranaire de 19 acides aminés capable de traverser la bicouche lipidique. Le cas de GRA2 est particulier, puisqu'il s'agit d'une protéine pourvue de deux hélices α -amphipatiques qui sont responsables de l'association aux membranes du réseau (Mercier *et al.*, 1998b). Selon le modèle proposé, les deux hélices seraient capables de s'associer de façon à présenter une interface hydrophobe capable de traverser la membrane.

Il a été montré que GRA2 et GRA6 s'accumulent de façon transitoire au pôle postérieur du parasite juste après l'invasion (Sibley *et al.*, 1995). Par la suite, GRA2, GRA4 et GRA6 forment un complexe protéique multimérique au niveau du RNM (Labruyère *et al.*, 1999). Le rôle de GRA2 et GRA6 dans la formation des nanotubes a été mis en évidence par l'analyse des mutants invalidés pour les gènes GRA2 et GRA6 (Mercier *et al.*, 2002) (cf paragraphe II-1- 4- 2- 2).

III- 4- 3- 3- Insertion dans la MVP

Parmi les protéines qui sont détectées majoritairement à la MVP en microscopie électronique, certaines possèdent les propriétés biochimiques de protéines intégrales de membrane après leur sécrétion. En effet, une fraction de GRA3 sécrétée dans la vacuole migre dans la fraction détergent après extraction au triton X-114, ce qui indique qu'au moins une partie de la

protéine est intégrée de façon stable dans la MVP (Ossorio *et al.*, 1994). L'association de GRA5 et GRA7 avec les membranes de la vacuole ne peut être dissociée que par traitement au NP-40 (Lecordier *et al.*, 1999 ; Neudeck *et al.*, 2002). Dans le cas de GRA5, la délétion de 8 acides aminés dans le domaine transmembranaire de 18 acides aminés entraîne la perte de cette association, ce qui démontre l'importance du domaine transmembranaire de la protéine pour son insertion post-sécrétoire dans la MVP (Lecordier *et al.*, 1999). La protéine s'insère dans la MVP avec son domaine N-terminal dans le cytoplasme de la cellule-hôte et le domaine C-terminal dans l'espace vacuolaire (Lecordier *et al.*, 1999).

L'insertion de certaines protéines GRAs dans la MVP reflète probablement une importance fonctionnelle majeure de ces protéines dans les processus de protection des parasites vis-à-vis de la cellule-hôte, ou pour l'acquisition de nutriments. Par exemple, les propriétés d'oligomérisation des protéines GRA sont à mettre en relation avec la formation d'un assemblage de type pore qui permettrait la diffusion passive des molécules de poids inférieur à 1300-1900 Da à travers la MVP (Schwab *et al.*, 1994 ; Braun *et al.*, 2007). La présence d'un motif dilysine (KKXX) dans la séquence de la protéine GRA3 suggère son implication dans l'association de la VP avec le RE de la cellule-hôte (Henriquez *et al.*, 2005). Enfin, GRA7, dont le rôle dans la formation des HOSTs vient d'être découvert (Coppens *et al.*, 2006), pourrait jouer un rôle dans la fonction endocyttaire supposée de ces structures.

PROBLEMATIQUE ET STRATEGIE

Le projet de thèse présenté ici s'inscrit dans le cadre de la compréhension de la biogénèse de la vacuole parasitophore et plus généralement des mécanismes de survie intracellulaire de parasites pathogènes pour l'homme et l'animal. L'implication des protéines GRAs dans ces processus est fortement suggérée par le fait que leur sécrétion coïncide avec la maturation de la VP et sa transformation en un compartiment métaboliquement actif. Dans la vacuole mature, ces protéines sont localisées à l'interface entre le parasite et la cellule-hôte, ce qui traduit probablement une importance fonctionnelle.

Problématique :

La biogénèse des GD et le trafic post-sécrétoire des protéines GRAs font intervenir des processus originaux, dont les mécanismes ne sont pas élucidés. Plusieurs questions demeurent :

- Comment les protéines GRAs qui présentent des domaines d'association membranaire sont-elles solubilisées au cours de la voie de sécrétion ? Existe-t-il des mécanismes particuliers au niveau du RE qui préviendraient l'insertion membranaire classiquement attendue ? Le maintien de cet état de solubilisation dans les GD fait-il intervenir des propriétés particulières de ces organites et de leurs protéines?
- Plusieurs travaux ont démontré que les GD représentent la voie de sécrétion par défaut pour les protéines solubles (Karsten *et al.*, 1998 ; Striepen *et al.*, 2001), mais l'existence d'une voie par défaut pour les protéines transmembranaires n'a toujours pas été démontrée. Existe-t-il un signal d'adressage aux GD pour les protéines GRAs TM, ou bien suivent-elles cette voie en l'absence de toute information spécifique de tri?
- Après sécrétion, les protéines GRAs sont spécifiquement adressées aux différents systèmes membranaires de la vacuole. Quelle est la base de cette sélectivité ?
- Certaines protéines GRAs sont capables de s'insérer de façon post-sécrétoire dans les membranes du RNM (GRA6) ou dans la MVP (GRA5, GRA3, GRA7). Cette insertion

est-elle spontanée ou bien fait-elle intervenir une machinerie protéique spécialisée, de type translocon ?

Hypothèse :

Une des hypothèses permettant d'expliquer le profil de sécrétion particulier des protéines GRAs serait que l'un des domaines de ces protéines présenterait des propriétés d'adressage et/ou d'association membranaire. Les propriétés conférées par ce domaine pourraient être fonctionnellement conservées chez les eucaryotes supérieurs, ou au contraire restreintes au système de sécrétion particulier que possède le *Toxoplasme*.

Stratégie :

Afin de déterminer si les propriétés particulières de sécrétion des protéines GRAs TM sont propres au parasite, nous avons analysé le trafic de ces protéines en cellules de mammifères. Leur localisation subcellulaire et leurs propriétés biochimiques ont été étudiées dans ce système d'expression. Réciproquement, nous avons analysé le trafic d'une protéine transmembranaire de mammifères exprimée dans le parasite.

Par ailleurs, par une stratégie d'expression de protéines chimériques, nous avons cherché à identifier les domaines qui déterminent la ségrégation chez le parasite d'une protéine de surface *versus* une protéine GRA TM. Les protéines de fusion ont été exprimées de façon stable chez *Toxoplasma*, et leur localisation subcellulaire ainsi que leur profil de solubilité a été analysé par les techniques d'immunofluorescence et de fractionnement cellulaire. Enfin, cette stratégie d'expression de protéines chimériques a permis d'étudier les bases de la spécificité de l'adressage des protéines GRAs TM à la MVP *versus* aux membranes du RNM.

Protéines modèles :

- La protéine **GRA5** est la protéine de référence pour l'étude de l'insertion membranaire post-sécrétoire dans la VP (Lecordier *et al.*, 1999). C'est une protéine migrant avec un poids moléculaire apparent de 21 kDa, identifiée par Charif *et al.* en 1990 suite à la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes d'excrétion-sécrétion (ESA). En 1993, les travaux de Lecordier *et al.* ont permis la caractérisation moléculaire de la protéine par le clonage du gène correspondant. Il s'agit d'une protéine de 120 acides aminés présentant un

peptide signal N-terminal et un domaine d'insertion membranaire de 18 résidus (Fig. 14). En microscopie électronique, GRA5 est détectée à l'intérieur des GD, sans association évidente à la membrane des granules (Charif *et al.*, 1990). Après sécrétion, elle s'associe majoritairement à la MVP (Lecordier *et al.*, 1993). Des études de topologie membranaire ont démontré que le domaine N-terminal de GRA5 est exposé à l'extérieur de la vacuole, face au cytoplasme de la cellule-hôte, tandis que le domaine C-terminal est exposé dans la lumière de la vacuole (Lecordier *et al.*, 1999) : la protéine est donc bien insérée dans la MVP. Cette insertion est abolie par la délétion de 8 acides aminés dans le domaine transmembranaire putatif, ce qui démontre l'importance fonctionnelle de ce domaine (Lecordier *et al.*, 1999).

- L'analyse du trafic de la protéine **GRA7** en cellules de mammifères est venue compléter celle de GRA5. Le gène *GRA7* a été identifié et caractérisé en même temps par Fischer *et al.* et Jacobs *et al.* en 1998. GRA7 est une protéine de 29 kDa présentant un unique domaine transmembranaire de 22 aa selon Fischer *et al.*. Elle s'associe préférentiellement à la MVP et à ses extensions (Jacobs *et al.*, 1998 ; Bonhomme *et al.*, 1998), sous forme d'une protéine intégrale de membrane (Neudeck *et al.*, 2002).

- La protéine **CD46** a été choisie comme protéine modèle de surface de mammifères (Lublin *et al.*, 1988). Il s'agit d'une protéine de 380 acides aminés environ présente sous diverses isoformes à la surface de toutes les cellules humaines nucléées. La protéine CD46 présente un unique domaine transmembranaire (23 résidus) (Fig. 14), qui permet l'insertion de la protéine dans la membrane plasmique, avec une topologie de type I (Liszewski *et al.*, 1991). CD46 migre avec un poids moléculaire apparent de 39 kDa, et présente plusieurs sites de N- et O-glycosylation dont l'importance a été démontrée pour la régulation de l'activité du complément (Liszewski *et al.*, 1998). Le domaine TM de 27 acides aminés de la protéine **CD8** a également été testé pour comparaison. CD8 est également une protéine transmembranaire de surface de mammifères exprimée de façon spécifique sur certains lymphocytes T (Littman *et al.*, 1985).

- La compréhension des mécanismes permettant le ciblage de GRA5 dans les GD nécessitait de comparer son trafic intracellulaire à celui d'une protéine transmembranaire de la surface du Toxoplasme. La majorité des protéines parasitaires de surface sont ancrées dans la MPP par l'intermédiaire d'une ancre GPI (protéines SAG), et peu de protéines intégrées dans la MPP ont été décrites à ce jour. En 1998, Seeber *et al.* ont conçu une protéine recombinante

composée du domaine Nt de SAG1 délété du signal d'ancrage GPI, en fusion avec les domaines TM et Ct de CD46, qui se comporte comme une protéine intégrale de la PPM. Nous avons ajouté une étiquette HA-FLAG (HF) en Ct à cette protéine de fusion (Fig. 14) et utilisé la protéine résultante **SAG1-TMCD46-CD46-HF** comme modèle de protéine de surface parasitaire.

- L'adressage post-sécrétoire spécifique de GRA5 à la MVP a été comparé à celui de **GRA6** aux membranes du réseau. GRA6 est une protéine de GD de 32 kDa (Lecordier *et al.*, 1995). Le domaine PS de GRA6 est particulier puisqu'il n'est pas situé à l'extrémité N-terminale de la protéine (Fig. 14). Il est cependant fonctionnel car capable d'adresser une protéine indicatrice dans la VP (Balbeur et Cesbron-Delauw, non publié). L'insertion de GRA6 dans les membranes du réseau a été démontrée par Labruyère *et al.* en 1999 et implique probablement le domaine TM de 19 résidus de la protéine.

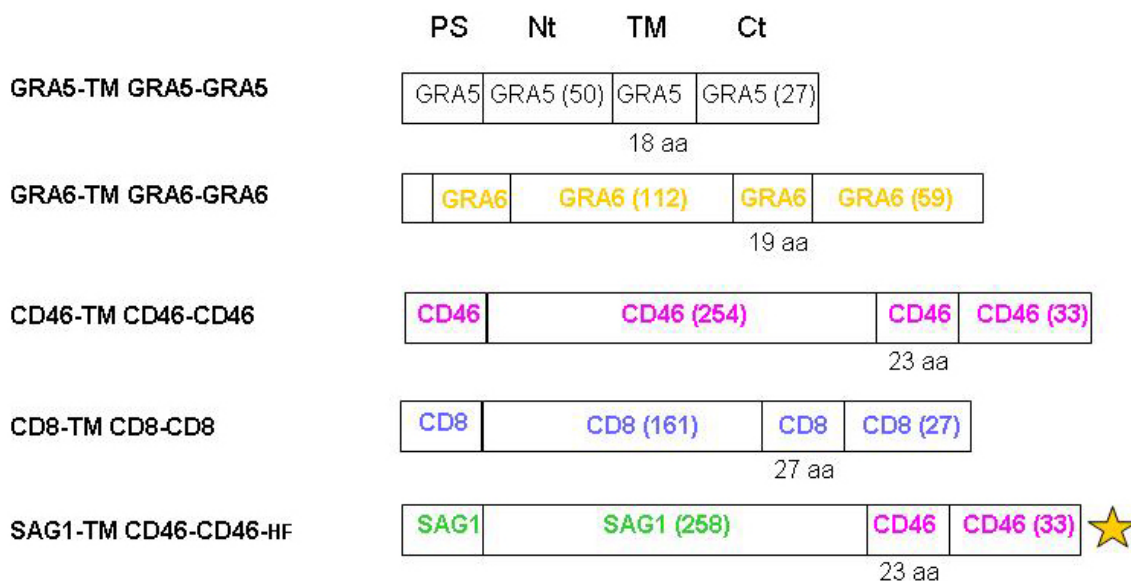


Fig. 14 : Représentation schématique des protéines modèles utilisées dans cette étude. PS, peptide signal ; Nt, domaine N-terminal ; TM, domaine transmembranaire ; Ct, domaine C-terminal ; aa, acides aminés. L'étoile indique une étiquette HA-FLAG.

RESULTATS

Les protéines GRAs TM ne présentent aucun signal d'adressage connu qui permettrait d'expliquer leur ciblage aux GD et aux différentes membranes de la vacuole après sécrétion. Dans les cellules de mammifères, il est prédit que ces protéines se comportent comme des protéines intégrales de membrane plasmique présentant une topologie de type I. La comparaison des deux systèmes d'expression cellules de mammifères *versus* Toxoplasme devrait permettre de confirmer ou d'infirmer ces données. La recherche d'un signal d'adressage spécifique aux GD et aux membranes de la vacuole a été réalisée par une approche génétique consistant à substituer séquentiellement les domaines de la protéine GRA5 par ceux d'une protéine de surface parasitaire.

Les résultats présentés ci-dessous font l'objet de la préparation d'un article qui sera soumis à J Cell Biol prochainement: **The N-terminal domain of Toxoplasma transmembrane GRA proteins is essential for their post-secretory membrane targeting into the host-cell.** Claire Gendrin, Laurence Braun, Jean-François Dubremetz, Corinne Mercier and Marie-France Cesbron-Delauw.

I- Comparaison du trafic de GRA5 et de CD46 dans les deux systèmes d'expression Toxoplasme versus cellule de mammifère

I- 1- Expression de GRA5 en cellules de mammifères

Afin de déterminer si le trafic intracellulaire soluble de GRA5 chez le Toxoplasme est conservé, nous avons fusionné les protéines GRA5, GRA7 et CD46 avec une étiquette HA C-terminale (GRA5-H, GRA7-H et CD46-H, Fig. 15A) et exprimé les protéines obtenues dans la lignée de cellules de mammifères HEK 293-T.

L'expression des protéines est détectée en immunofluorescence par l'utilisation de différents jeux d'anticorps : le sérum de souris anti-GRA5 (Lecordier *et al.*, 1999), le mAb anti-GRA7 (BATO214, Jacobs *et al.*, 1998 ; Neudeck *et al.*, 2002) et le mAb anti-CD46 (TRA2-10, Andrews *et al.*, 1985) reconnaissent la partie Nt des protéines exprimées, alors que le sérum

de lapin anti-HA reconnaît l'étiquette C-terminale. Après perméabilisation des cellules au triton X-100, on observe un liseré de fluorescence à la périphérie des cellules exprimant GRA5-H et GRA7-H. GRA5 et GRA7 sont donc adressées à la membrane plasmique des cellules, comme le contrôle de protéine de surface de mammifère CD46 (Figure 15B gauche). Au contraire, la protéine soluble de Toxoplasme GRA1 semble majoritairement cytoplasmique lorsqu'elle est exprimée transitoirement en cellules HEK. En effet, le signal obtenu pour la fusion GRA1-H avec le sérum de lapin anti-HA ressemble fortement à celui obtenu avec le mAb anti-FLAG pour le contrôle de protéine soluble de mammifères MLO2-F (Fig. 15C). Ce résultat est surprenant lorsque l'on considère la présence d'un peptide signal dans la séquence de GRA1, élément qui devrait orienter la protéine vers une sécrétion soluble à l'extérieur des cellules.

D'après plusieurs méthodes de prédiction de topologie (TMPRED, TMHMM), les protéines GRA5 et GRA7 devraient se comporter comme des protéines intégrales de membranes présentant une topologie de type I en cellules de mammifères. Pour confirmer biochimiquement que GRA5 est une protéine intégrale de membrane en cellules de mammifères, nous avons effectué une séparation des protéines solubles et du matériel membranaire obtenus après lyse mécanique de cellules exprimant la protéine GRA5-HF de façon transitoire. Le mode d'association de la protéine à la fraction membranaire a été étudié par traitement de cette fraction avec différents agents dénaturants (Fig. 15D). GRA5 est exclusivement associée à la fraction HSP, ce qui reflète un comportement de protéine membranaire. Cette association n'est pas dissociée quand le HSP est soumis à de fortes concentrations en sels ou à un pH élevé, conditions qui permettent de rompre l'association des protéines périphériques aux membranes. Cette association est également résistante à l'urée 6M, tandis que le traitement du HSP au NP-40 1% permet de solubiliser GRA5. Ces propriétés sont tout-à-fait similaires à celles de CD46, utilisée comme contrôle de protéine transmembranaire, ce qui montre que GRA5 se comporte comme une protéine intégrale de membrane en cellules de mammifères. Au contraire, la protéine soluble de Toxoplasme GRA1 est retrouvée exclusivement dans la fraction HSS comme le contrôle soluble MLO2-F, ce qui montre que GRA1 se comporte comme une protéine soluble également en cellules de mammifères (Fig. 15D).

Dans les cellules non-perméabilisées exprimant GRA5-H et GRA7-H, la surface cellulaire est clairement marquée quand on utilise un anticorps dirigé contre la partie Nt des protéines (*i.e.*

le sérum de souris anti-GRA5 et le mAb anti-GRA7, respectivement). A l'inverse, aucun signal n'est observé par marquage avec le sérum de lapin anti-HA, qui reconnaît l'étiquette Ct (Fig. 15B droite). En parallèle, la détection de CD46-H est permise par l'utilisation du mAb anti-CD46 qui reconnaît le domaine Nt de la protéine, tandis que l'étiquette Ct est inaccessible au sérum anti-HA (Fig. 15B droite). Ces résultats montrent que les protéines de Toxoplasme GRA5 et GRA7 se comportent comme le contrôle CD46 quand on les exprime en cellules HEK 293-T, à savoir comme des protéines intégrales de la membrane plasmique de la cellule, avec une topologie de type I. L'expression soluble de GRA5 et GRA7 dans les GD est donc propre au parasite et reflète l'existence de mécanismes particuliers d'adressage et de solubilisation dans ce système particulier d'expression.

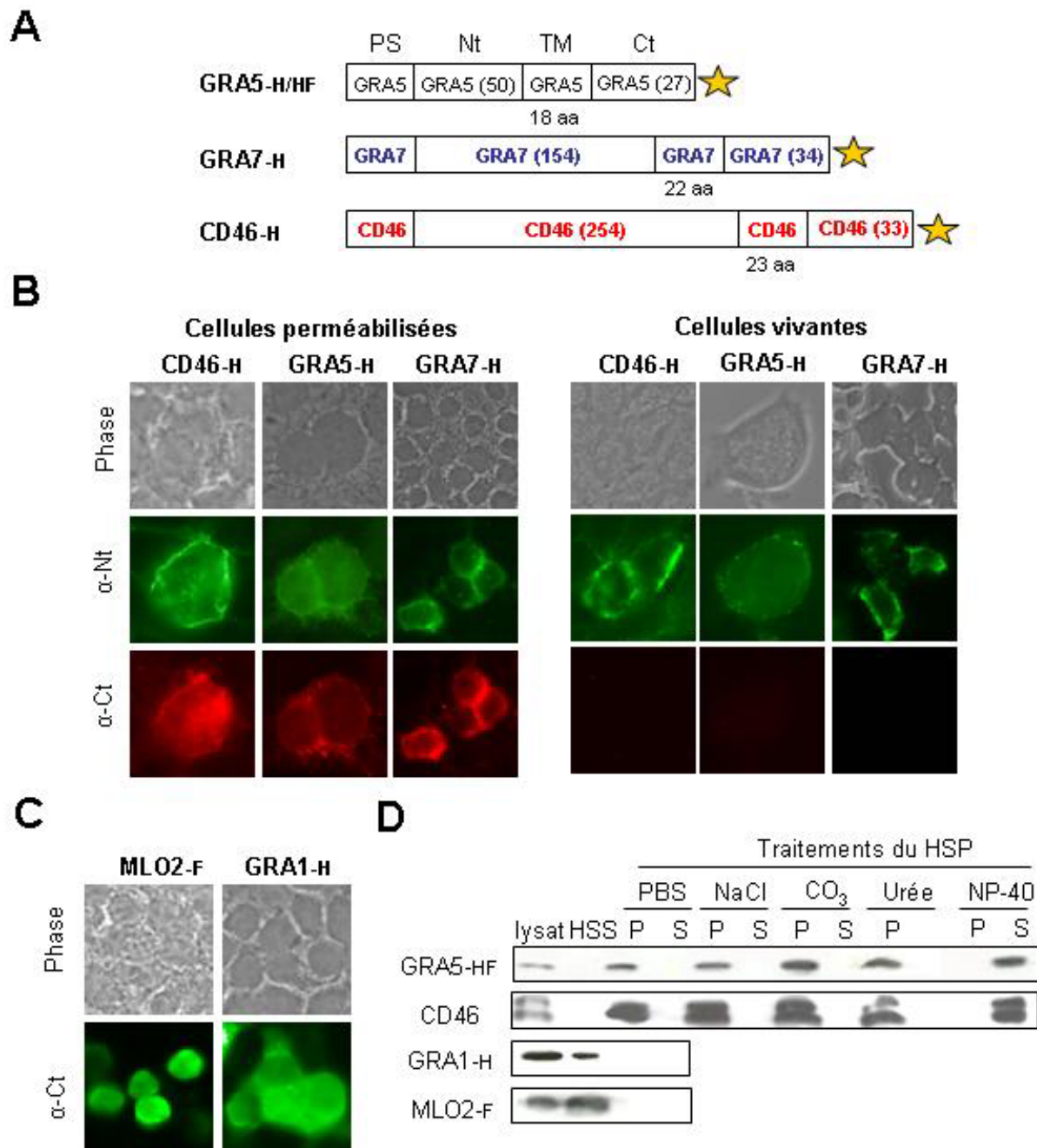


Fig. 15 : GRA5 se comporte comme une protéine transmembranaire de type I en cellules de mammifères. (A) Représentation schématique des constructions GRA5-H/HF, GRA7-H et CD46-H. Les gènes à partir desquels les domaines peptide signal (PS), transmembranaires (TM), N- et C-terminaux (Nt et Ct) ont été amplifiés sont indiqués à l'intérieur des rectangles. La longueur de chaque segment est indiquée en acides aminés (aa) entre parenthèses, ou en dessous du schéma pour les domaines TM. Les étiquettes HA (H) ou HA-FLAG (HF) sont représentées par une étoile. (B) GRA5-H/HF, GRA7-H et CD46-H exprimées transitoirement dans les cellules HEK sont détectées dans des cellules perméabilisées au triton X-100 0,1% (cellules perméabilisées) ou directement dans des cellules non perméabilisées (cellules vivantes). Le domaine Nt de GRA5 est détecté grâce au sérum de souris α-GRA5 Nt, celui de GRA7 grâce au mAb α-GRA7 et celui de CD46 grâce au mAb TRA2-10. Le sérum de lapin α-HA permet la détection de l'étiquette Ct pour les 3 protéines. (C) Immuno-détection de GRA1-H en cellules HEK. Des cellules exprimant transitoirement GRA1-H ou MLO2-F sont perméabilisées puis soumises au marquage par le sérum de lapin α-HA et le mAb α-FLAG, respectivement. (D) Profil de solubilité de GRA5-HF en cellules HEK. Des cellules transfectées transitoirement sont fractionnées en un culot membranaire (HSP) et une fraction soluble (HSS) par ultracentrifugation. Le culot (P) et les protéines solubilisées (S) après traitement du HSP avec différents agents dénaturants (PBS, NaCl, CO₃, urée, NP-40) sont analysés par immunoblot. Les protéines sont détectées à l'aide du mAb α-FLAG (GRA5-HF et MLO2-F), du mAb α-GRA1 (GRA1-H) ou du sérum de lapin α-CD46 (CD46 endogène).

I- 2- Expression de protéines de surface dans les parasites

I- 2- 1- Expression de CD46-TM CD46-CD46-HF dans les parasites

Après avoir examiné le trafic de GRA5 dans les cellules de mammifères, nous avons réciproquement tenté d'exprimer la protéine de mammifères CD46 chez *Toxoplasma*. A l'inverse des résultats obtenus dans les cellules HEK, nous avons pu observer que CD46-TM CD46-CD46-HF ne co-localise pas avec GRA5 endogène dans le système d'expression du parasite (Fig. 16A). En effet, dans des parasites extracellulaires de la souche sauvage RH qui expriment CD46-TM CD46-CD46-HF de façon stable, on observe par immunofluorescence que la protéine se situe de façon prédominante autour du noyau et au niveau de structures réparties dans l'ensemble du cytoplasme qui pourraient correspondre à des vésicules (Fig. 16B droite, têtes de flèches blanches). Ces structures sont distinctes des GD, qui sont marqués à l'aide du mAb anti-GRA5 (Fig. 16B droite, têtes de flèches jaunes).

Pour préciser la localisation de CD46-TM CD46-CD46-HF, des cellules infectées par des transformants stables ont été traitées à la saponine, ce qui permet une perméabilisation sélective de la membrane de la cellule-hôte et de la MVP (perm. MCH+MVP). Dans ces conditions, la fusion CD46-TM CD46-CD46-HF n'est détectée ni par l'anticorps TRA2-10 anti-Nt ni par le sérum de lapin anti-HA (Fig. 16B gauche), ce qui indique que la protéine n'atteint pas la surface du parasite à l'issue de son trafic intracellulaire. Pour interpréter le trafic particulier de CD46 dans le parasite, il faut considérer le haut niveau de glycosylation de la protéine en cellules de mammifères. Ces modifications ne sont pas nécessairement réalisées dans le système sécrétoire du parasite, ce qui pourrait expliquer l'absence de détection de la protéine à la surface du parasite (voir discussion).

I- 2- 2- Expression de SAG1-TM CD46-CD46-HF dans les parasites

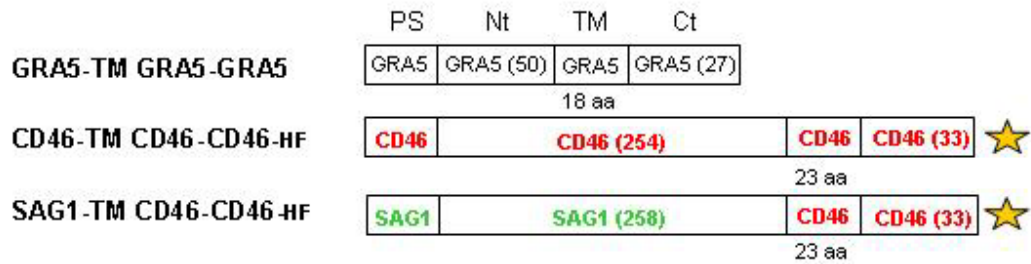
Dans le but d'étudier le trafic de GRA5 dans les GD, nous avons cherché un modèle de protéine intégrale de la MPP. Peu de protéines de la MPP sont connues au jour d'aujourd'hui, et la majorité d'entre elles sont ancrées dans la membrane par l'intermédiaire d'un GPI. Cependant, Seeber *et al.* ont utilisé en 1998 un variant de la protéine majeure de surface SAG1 qui s'intègre dans la MPP. Cette protéine est composée du domaine Nt de SAG1 délété

de son signal d'ancrage GPI, fusionné avec les domaines TM et Ct de CD46 (SAG1-TM CD46-CD46). Nous avons fusionné cette protéine avec une étiquette HA-FLAG C-terminale (SAG1-TM CD46-CD46-HF, Fig. 16A), et vérifié que cet ajout ne modifiait pas l'adressage de la protéine (Fig. 16C gauche). En effet, quand des cellules infectées par un variant de la souche *Δsag1* qui exprime la fusion de façon stable sont perméabilisées à la saponine, on détecte un signal correspondant à la surface du parasite avec le mAb anti-SAG1 mais aucun signal avec le sérum de lapin anti-HA (Fig. 16C gauche). Ces données indiquent que l'extrémité Ct de la fusion est située côté cytoplasme du parasite (et est donc inaccessible à l'anticorps anti-HA), ce qui reflète l'insertion de la fusion dans la MPP avec une topologie de type I.

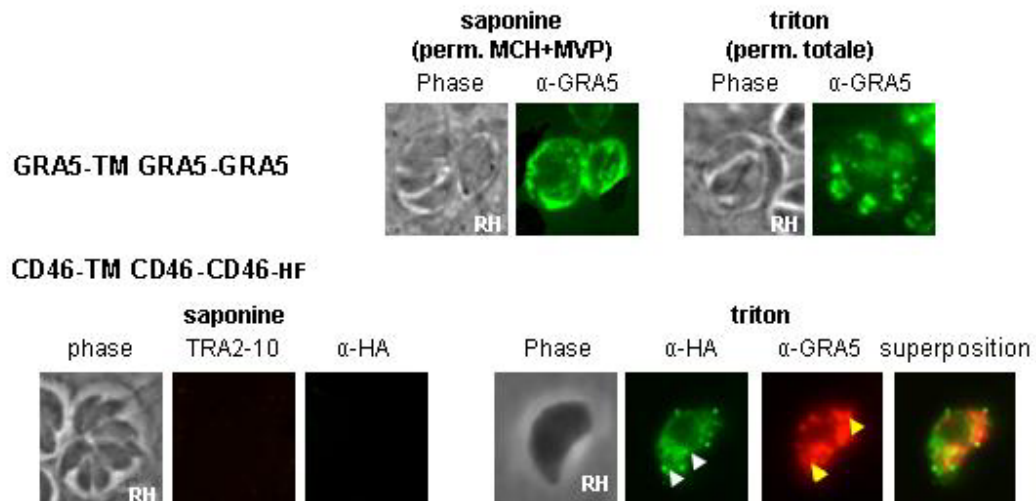
Afin de préciser la localisation de SAG1-TM CD46-CD46-HF à l'intérieur du parasite, nous avons perméabilisé des parasites extracellulaires exprimant la fusion de façon stable au triton X-100 (Fig. 16C droite). Dans ces conditions, l'intégrité de la MPP est rompue, ce qui explique l'absence de marquage de la surface parasitaire. Par contre, le sérum de lapin anti-HA permet la détection de la fusion au niveau de structures vésiculaires à l'intérieur du parasite (Fig. 16C droite, têtes de flèches blanches) qui ne co-localisent pas avec les GD comme indiqué par la co-détection de GRA5 (Fig. 16C droite, têtes de flèches jaunes).

Il semblerait donc que SAG1-TM CD46-CD46-HF et CD46-TM CD46-CD46-HF empruntent une voie vésiculaire distincte des GD à l'intérieur du parasite. A l'opposé, l'adressage aux GD de GRA5 nécessite l'expression de la protéine dans le système de sécrétion particulier du Toxoplasme, et pourrait reposer sur des propriétés intrinsèques des protéines GRAs.

A



B



C

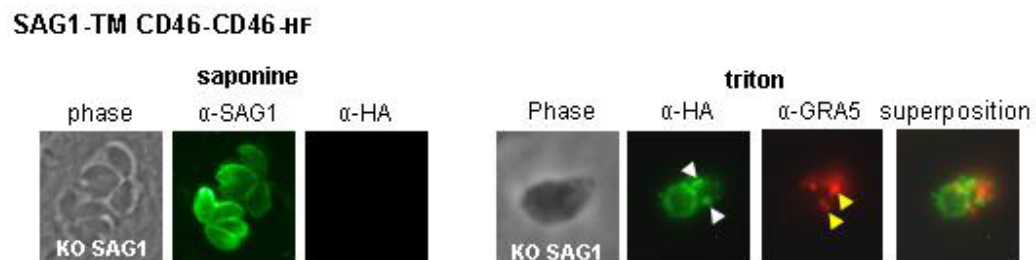


Fig. 16 : Chez *Toxoplasma*, les deux protéines CD46-TM CD46-CD46-HF et SAG1-TM CD46-CD46-HF empruntent une voie vésiculaire différente de la voie des GD, mais seule la protéine SAG1-TM CD46-CD46-HF atteint la surface du parasite. (A) Représentation schématique de GRA5 endogène et des protéines fusion CD46-TM CD46-CD46-HF et SAG1-TM CD46-CD46-HF. L'étiquette HA-FLAG (HF) est indiquée par une étoile. Les annotations et symboles utilisés sont décrits dans la légende de la Figure 1. (B) Immuno-marquage de CD46-TM CD46-CD46-HF comparé à GRA5 endogène exprimées dans des parasites de la souche sauvage RH. GRA5 endogène est détectée à l'aide du mAb α-GRA5 dans des parasites intracellulaires de la souche RH (partie supérieure). La membrane de la cellule hôte et la MVP sont sélectivement perméabilisées par traitement des cellules infectées à la saponine 0,002% (perm. MCH+MVP, à gauche), alors que l'utilisation du triton X-100 0,1% permet une perméabilisation complète du système (perm. totale, à droite). Des parasites exprimant de façon stable CD46-TM CD46-CD46-HF sont marqués à l'intérieur de cellules infectées perméabilisées à la saponine (partie inférieure gauche) ou en tant que parasites extracellulaires perméabilisés au triton X-100 (partie inférieure droite). Le mAb TRA2-10 et le sérum de lapin α-HA sont utilisés pour la détection des domaines Nt et Ct de la protéine, respectivement. Dans les parasites extracellulaires, la localisation de la protéine de fusion (flèches blanches) est comparée à celle de GRA5 endogène détectée à l'aide du mAb α-GRA5 (flèches jaunes). (C) Immuno-détection de SAG1-TM CD46-CD46-HF dans des parasites $\Delta sag1$ intracellulaires (à gauche) ou extracellulaires (à droite) exprimant de façon stable la protéine de fusion. Dans des cellules infectées perméabilisées à la saponine, la fusion est détectée avec le mAb α-SAG1 qui reconnaît le domaine Nt, alors que le sérum α-HA ne reconnaît pas l'étiquette Ct. Dans des parasites extracellulaires perméabilisés au triton X-100, le sérum α-HA permet la détection de la protéine de fusion (flèches blanches), et GRA5 endogène est détectée grâce au mAb α-GRA5 (flèches jaunes).

II- Etude de l'adressage de GRA5 aux GD

Afin de déterminer si un (des) domaine(s) spécifique(s) de GRA5 serait responsable de son adressage particulier aux GD, nous avons comparé le trafic de GRA5 à celui de la protéine de surface parasitaire SAG1-TM CD46-CD46-HF en substituant séquentiellement les domaines de GRA5 par les domaines correspondants de SAG1 ou CD46. Les protéines chimères obtenues ont été exprimées de façon stable dans le parasite, et leurs propriétés ont été étudiées par les techniques d'immunofluorescence et de fractionnement subcellulaire de parasites extracellulaires.

II- 1- Rôle des domaines peptide signal et C-terminal

II- 1- 1- Rôle du domaine PS dans l'adressage de GRA5 aux GD

Toutes les protéines GRAs possèdent un domaine N-terminal hydrophobe (Mercier *et al.*, 2005) dont on suppose qu'il fonctionne comme un PS classique, permettant l'entrée des GRAs dans la voie de sécrétion. On peut cependant imaginer que ce domaine soit impliqué dans des interactions spécifiques au niveau du RE qui permettraient de masquer le domaine TM de la protéine dans la lumière du RE. Afin de tester cette hypothèse, nous avons remplacé le domaine PS de GRA5 par celui de CD46 (construction (PS CD46)-GRA5-TM GRA5-GRA5-HF, Fig. 17A) et étudié l'adressage de la protéine de fusion obtenue. Dans des parasites $\Delta gra5$ exprimant la fusion de façon transitoire, l'utilisation du sérum de lapin anti-HA permet l'obtention d'un signal superposable avec le signal obtenu pour GRA3 endogène (Fig. 17B partie supérieure). En comparaison, la co-localisation de GRA5 endogène avec GRA3 endogène dans des parasites sauvages de la souche RH est présentée dans la partie inférieure de la Fig. 17B. La substitution du PS de GRA5 par celui de CD46 ne modifie donc pas l'adressage de GRA5 aux GD, ce qui montre que le PS de GRA5 n'est pas nécessaire à cet adressage.

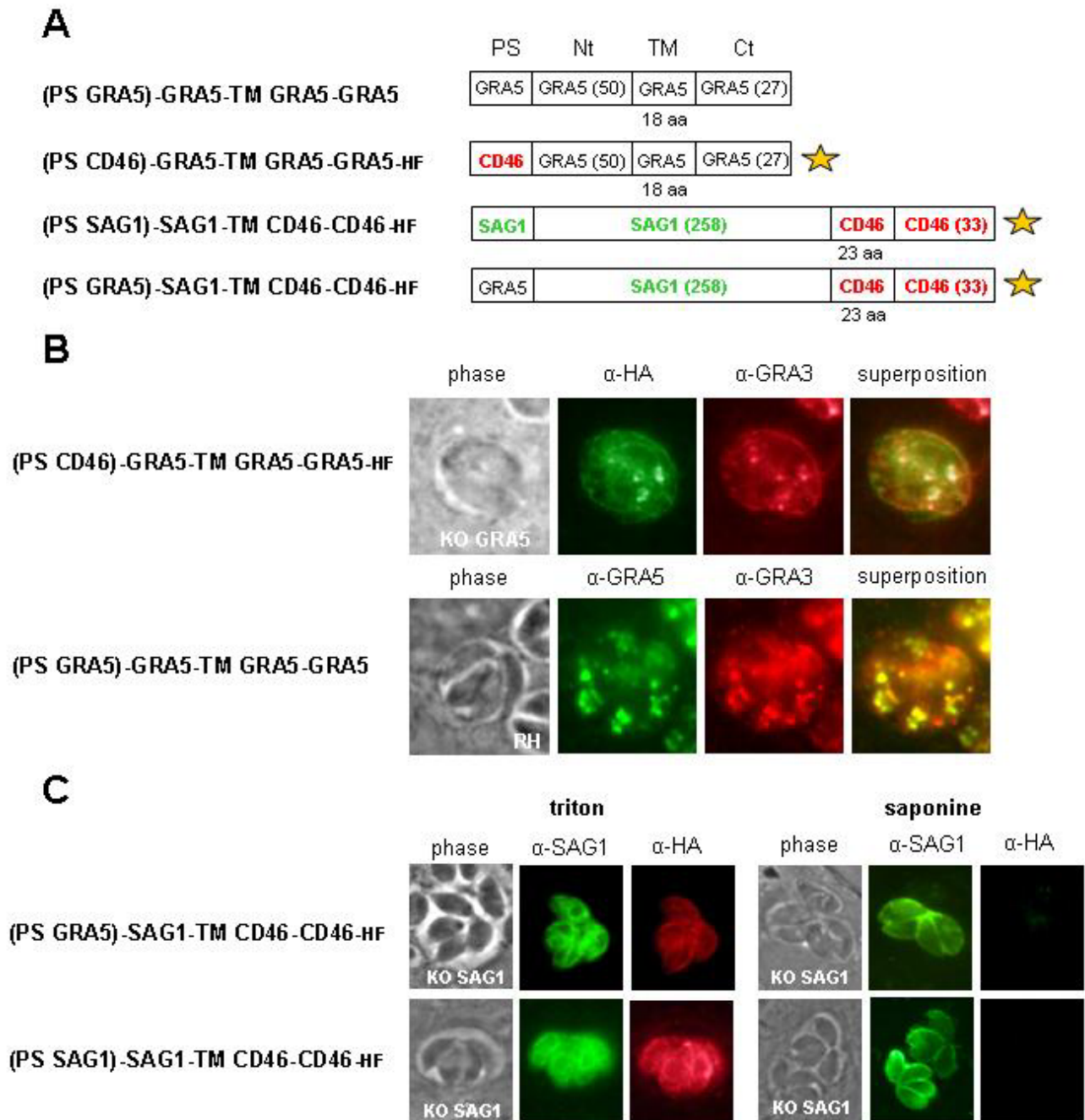


Fig. 17 : Le domaine PS de GRA5 n'est ni nécessaire ni suffisant pour l'adressage aux granules denses. (A) Représentation schématique de GRA5 endogène et des protéines fusion (PS CD46)-GRA5-TM GRA5-GRA5-HF, (PS CD46)-SAG1-TM CD46-CD46-HF et (PS GRA5)-SAG1-TM CD46-CD46-HF. Les annotations et symboles utilisés sont décrits dans la légende de la Figure 1. (B) Immuno-localisation de la protéine de fusion (PS CD46)-GRA5-TM GRA5-GRA5-HF comparée à celle de GRA5 endogène. Des transformants de la souche $\Delta gra5$ qui expriment transitoirement la fusion sont marqués avec le sérum α -HA après perméabilisation totale des cellules infectées au triton X-100 0,1% (partie supérieure). GRA3 endogène est co-détectée avec le mAb α -GRA3. Pour comparaison, le co-marquage dans la souche RH de GRA5 endogène (détectée avec le mAb α -GRA5) et de GRA3 (détectée avec le sérum α -GRA3) est également présenté (partie inférieure). (C) Localisation des protéines (PS SAG1)-SAG1-TM CD46-CD46-HF et (PS GRA5)-SAG1-TM CD46-CD46-HF dans des parasites de la souche $\Delta sag1$ transfectés transitoirement. Les cellules infectées sont perméabilisées au triton (à gauche) ou à la saponine (à droite). Dans ces parasites, le mAb α -SAG1 permet la détection du domaine Nt des protéines fusion, alors que le sérum α -HA permet de détecter l'étiquette Ct.

Réciproquement, nous avons substitué le domaine PS de SAG1 par celui de GRA5 dans le cadre de la fusion SAG1-TM CD46-CD46-HF (construction (PS GRA5)-SAG1-TM CD46-CD46-HF, Fig. 17A). L'expression transitoire de cette fusion dans des parasites $\Delta sag1$ permet la détection de la protéine à la MPP grâce au mAb anti-SAG1 dans des cellules infectées perméabilisées en saponine (Fig. 17C droite). Dans ces mêmes cellules, on n'obtient aucun signal avec le sérum de lapin anti-HA, ce qui indique que la protéine est insérée dans la MPP avec une topologie de type I. Par perméabilisation de tous les systèmes membranaires au triton X-100, on vérifie que la fusion est détectée avec les deux anticorps mAb anti-SAG1 et sérum anti-HA (Fig. 17C gauche). Ces résultats indiquent que le domaine PS de GRA5 n'est pas suffisant en soi pour détourner une protéine adressée à la surface du parasite vers les GD.

II- 1- 2- Rôle du domaine Ct dans l'adressage et les propriétés biochimiques de GRA5

dans les GD

Si le domaine PS de GRA5 n'est ni nécessaire ni suffisant pour expliquer l'adressage de GRA5 aux GD, c'est qu'un autre domaine de la protéine doit être impliqué dans ce phénomène. Chez les eucaryotes supérieurs, de nombreux motifs d'adressage sont présents dans le domaine Ct des protéines transmembranaires de type I (Nishimura and Balch, 1997 ; Sevier *et al.*, 2000). Chez *T. gondii*, on a pu identifier des motifs YXX Φ dans la queue C-terminale de GRA4 et GRA7, mais ces motifs ne pas reconnus par l'homologue parasite de AP-1 du moins dans le cas de GRA4 (Ngô *et al.*, 2003). Peut-être existe-t-il dans ces domaines d'autres motifs, non canoniques ou pas encore connus, qui interviendraient dans l'adressage spécifique des GRAs aux GD.

II- 1- 2- 1- Nécessité du domaine Ct de GRA5 dans ces processus

Pour tester cette hypothèse dans le cas de GRA5, nous avons exprimé de façon stable la protéine de fusion GRA5-TM GRA5-CD46-HF (Fig. 18A) dans des parasites de la souche $\Delta gra5$. Par immunofluorescence sur des parasites extracellulaires perméabilisés en triton X-100, on peut observer que la fusion co-localise avec GRA3 dans les GD (Fig. 18B). Les propriétés biochimiques de la protéine de fusion ont été comparées à celle de GRA5 endogène à partir d'un lysat de parasites extracellulaires de la souche sauvage RH qui expriment de façon stable la protéine de fusion (Fig. 18C). Par extraction des protéines du lysat au triton X-

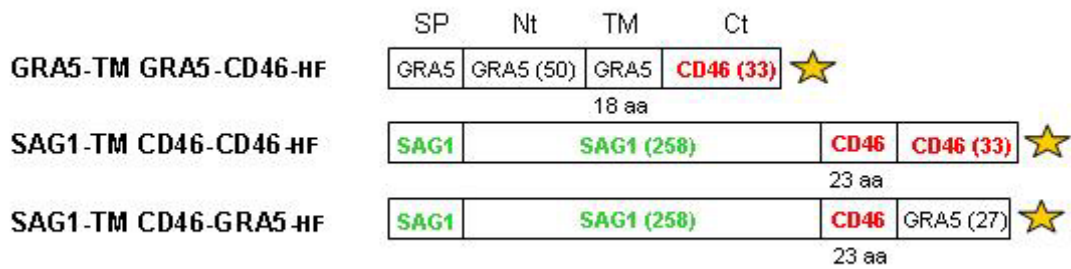
114, on observe que les deux protéines migrent majoritairement dans la fraction D. Quand on soumet le lysat parasitaire à la procédure de fractionnement cellulaire décrite dans la section « matériel et méthodes », on observe que la protéine de fusion est présente comme GRA5 endogène dans les fractions solubles (HSS) mais aussi dans les fractions hydrophobes (LSP et HSP). Le traitement du LSP par différents agents dénaturants débouche sur le même profil pour la fusion GRA5-TM GRA5-CD46-HF et pour GRA5 endogène, puisqu'on observe dans les deux cas une solubilisation partielle par l'urée et totale par le NP-40. A l'opposé, la protéine soluble GRA1 migre principalement dans la fraction A par extraction au triton X-114, et est majoritairement associée à la fraction HSS en fractionnement cellulaire (Fig. 18C). Ces données indiquent que dans les parasites extracellulaires, la substitution du domaine Ct de GRA5 par celui de CD46 ne modifie pas les propriétés biochimiques de GRA5, qui est présente à la fois sous forme soluble et sous forme d'agrégats hydrophobes dans les GD (Lecordier *et al.*, 1999).

Le domaine Ct de GRA5 n'est donc pas nécessaire pour l'adressage soluble de la protéine aux GD.

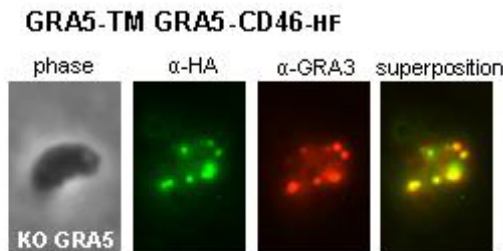
II- 1- 2- 2- Suffisance du domaine Ct de GRA5 dans ces phénomènes

Pour étudier la suffisance du domaine Ct de GRA5 dans l'adressage de la protéine aux GD, nous avons fusionné ce domaine au domaine Nt de SAG1 et au domaine TM de CD46 (construction SAG1-TM CD46-GRA5-HF, Fig. 18A). L'expression stable de cette fusion dans des parasites de la souche $\Delta sag1$ a permis de localiser la protéine à la MPP du parasite (Fig. 18D). En effet, dans des cellules infectées perméabilisées en saponine, la fusion est détectée au niveau de la surface parasitaire à l'aide du mAb anti-SAG1 alors qu'aucun signal n'est obtenu avec le sérum de lapin anti-HA. La fusion est donc insérée dans la MPP avec une topologie de type I, tout comme la fusion SAG1-TM CD46-CD46-HF (Fig. 18D). Les propriétés biochimiques de ces deux fusions ont été étudiées par analyse d'un lysat de parasites extracellulaires (Fig. 18E). Par extraction au triton X-114, les deux protéines migrent dans les fractions D et A. En fractionnement, les deux fusions sont associées exclusivement aux fractions membranaires (LSP et HSP). L'association des protéines avec la fraction LSP est dissociée uniquement par traitement au NP-40, ce qui reflète un comportement de protéine transmembranaire. A l'opposé, les contrôles GRA5 et GRA1 se comportent à la fois comme des protéines solubles et agrégées, propriétés caractéristiques des protéines de GD

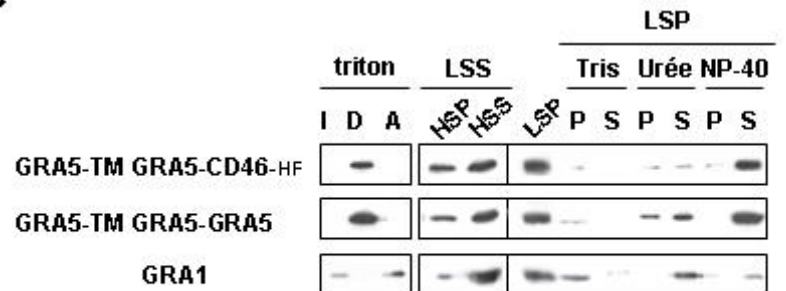
A



B



C



D



E

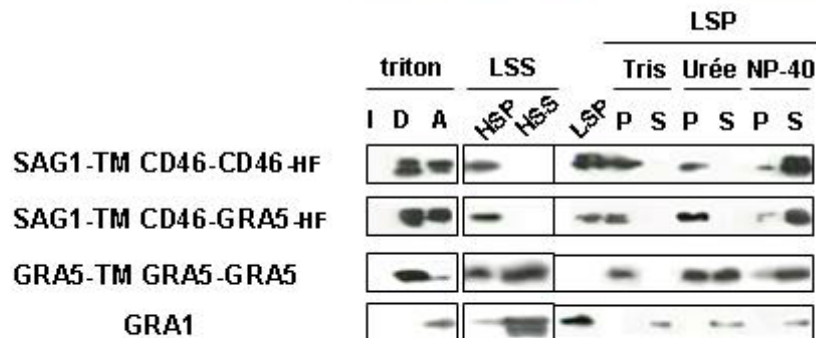


Fig. 18 : Le domaine Ct de GRA5 n'est pas essentiel pour l'adressage aux GD. (A) Représentation schématique des protéines fusion GRA5-TM GRA5-CD46-HF, SAG1-TM CD46-GRA5-HF et SAG1-TM CD46-GRA5-HF. Les annotations et symboles utilisés sont décrits dans la légende de la Figure 1. (B) Des parasites extracellulaires de la souche $\Delta gra5$ qui expriment de façon stable GRA5-TM GRA5-CD46-HF sont perméabilisés au triton X-100. La protéine de fusion et GRA3 endogène sont détectés avec le sérum α -HA et le mAb α -GRA3, respectivement. (C) Profil de solubilité de GRA5-TM GRA5-CD46-HF exprimée de façon stable dans des parasites extracellulaires de la souche RH. Une extraction des protéines parasitaires au triton X114 permet leur séparation entre un culot insoluble (I), une phase détergent (D) et une phase aqueuse (A). Le lysat parasitaire est également soumis à une étape de centrifugation à basse vitesse pour séparer les débris cellulaires (LSP) des protéines solubles (LSS). Par ultracentrifugation de cette fraction, on obtient un culot membranaire (HSP) et une fraction ultrasoluble (HSS). Le LSP est soumis au traitement par des agents dénaturants et les protéines solubilisées (S) sont séparées des résidus (P) par ultracentrifugation. La protéine de fusion est détectée à l'aide du sérum α -HA, alors que GRA5 et GRA1 endogènes sont détectées à l'aide des mAb α -GRA5 et α -GRA1, respectivement. (D) Immunolocalisation des protéines chimères SAG1-TM CD46-CD46-HF et SAG1-TM CD46-GRA5-HF dans des cellules infectées perméabilisées soit au triton X-100 (à gauche) soit à la saponine (à droite). Les deux constructions sont exprimées de façon stable dans des parasites $\Delta sag1$, ce qui permet d'utiliser le mAb α -SAG1 comme anticorps α -Nt. La portion Ct des protéines fusion est détectée à l'aide du sérum α -HA. (E) Analyse biochimique des chimères SAG1-TM CD46-CD46-HF et SAG1-TM CD46-GRA5-HF dans des parasites extracellulaires $\Delta sag1$. Des transformants stables sont traités comme décrits en (C). Les protéines fusion sont détectées à l'aide du sérum α -HA, alors que GRA5 et GRA1 endogènes sont détectées à l'aide des mAb α -GRA5 et α -GRA1, respectivement.

(Sibley *et al.*, 1995 ; Labruyère *et al.*, 1999 ; Lecordier *et al.*, 1999) (Fig. 18E). Ces analyses biochimiques indiquent que la fusion SAG1-TM CD46-GRA5-HF se comporte comme une protéine intégrale de membrane tout au long de son trafic intracellulaire dans le parasite. Le domaine Ct de GRA5 n'est donc pas en soit un élément suffisant pour solubiliser une protéine dans les GD.

II- 2- Rôle du domaine transmembranaire et du domaine Nt de GRA5 dans l'adressage soluble aux GD

L'implication du domaine TM des protéines transmembranaires dans les processus d'adressage a été mis-en-évidence par plusieurs études chez les eucaryotes supérieurs (Bonifacino *et al.*, 1991, Zaliauskiene *et al.*, 2000). Les GRAs transmembranaires présentent des domaines TM de petite taille (17 à 22 aa), et il a été proposé que la taille de ce domaine serait le critère de ségrégation des protéines destinées aux GD *versus* celles qui sont destinées à la surface du parasite (Karsten *et al.*, 2004). Ces travaux faisaient appel à des protéines fusion composées de la protéine indicatrice BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) combinée avec différents segments TM et Ct.

Nous avons donc examiné si des caractéristiques particulières du segment TM de GRA5 permettraient d'expliquer son adressage soluble aux GD.

II- 2- 1- Influence du TM dans le contexte du Nt SAG1

Les deux fusions SAG1-TM CD46-CD46-HF et SAG1-TM CD46-GRA5-HF (Fig. 18A), qui présentent le domaine TM de 23 aa de CD46, sont adressées à la MPP dans des clones stables issus de la souche $\Delta sag1$ (Fig. 18D). Pour étudier l'influence du domaine TM dans cet adressage, nous avons exprimé dans la même souche la fusion SAG1-TM GRA5-GRA5-HF (Fig. 19A), qui présente le domaine TM de 18 aa de GRA5. Dans des parasites extracellulaires perméabilisés en triton, on observe que cette fusion est adressée aux GD (Fig. 19B partie supérieure), ce qui confirme les résultats publiés (Karsten *et al.*, 2004). Les propriétés biochimiques de cette fusion dans des parasites extracellulaires ont été étudiées par

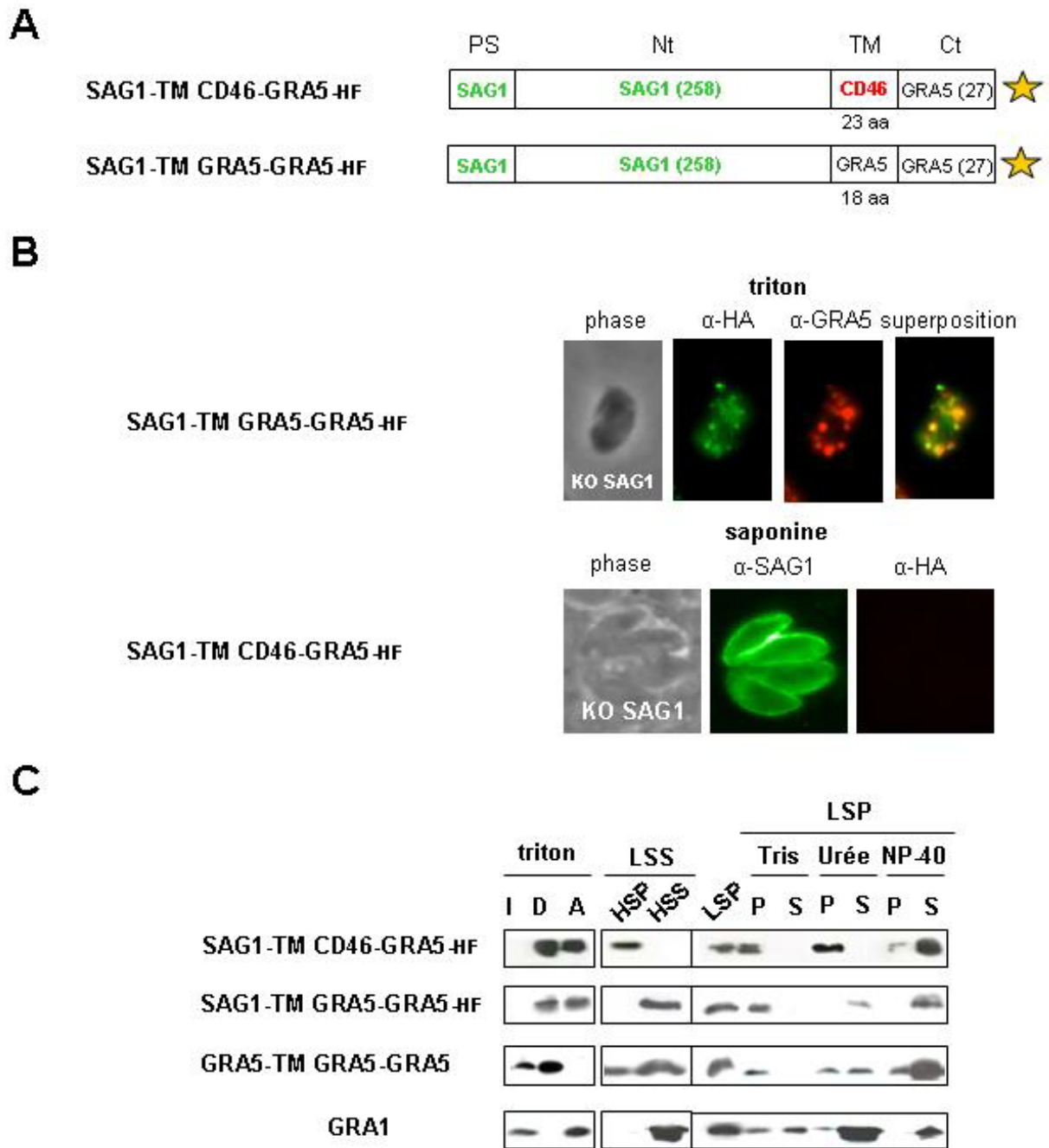


Fig. 19 : Le domaine TM de GRA5 permet l'adressage aux GD dans le contexte du Nt SAG1. (A) Représentation schématique des protéines fusion SAG1-TM CD46-GRA5-HF et SAG1-TM GRA5-GRA5-HF. Les annotations et symboles utilisés sont décrits dans la légende de la Figure 1. (B) Comparaison de la localisation de SAG1-TM CD46-GRA5-HF et SAG1-TM GRA5-GRA5-HF exprimées de façon stable dans des parasites $\Delta sag1$. SAG1-TM GRA5-GRA5-HF est détectée grâce au sérum α -HA, tandis que GRA5 endogène est marquée grâce au mAb α -GRA5 dans des parasites extracellulaires perméabilisés au triton X-100 (partie supérieure). Le domaine Nt de SAG1-TM CD46-GRA5-HF est détecté grâce au mAb α -SAG1 et le domaine Ct grâce au sérum α -HA après perméabilisation de cellules infectées à la saponine (partie inférieure). (C) Profil de solubilité des chimères SAG1-TM CD46-GRA5-HF et SAG1-TM GRA5-GRA5-HF exprimées de façon stable dans des parasites extracellulaires $\Delta sag1$. La procédure de fractionnement utilisée est décrite dans la légende de la Figure 4C. Le sérum α -HA permet la détection des protéines fusion, tandis que les mAb α -GRA5 et α -GRA1 permettent de détecter les contrôles GRA5 et GRA1 endogènes, respectivement.

comparaison avec celles de SAG1-TM CD46-GRA5-HF (Fig. 19C). Les deux protéines se comportent de façon identique lors d'une extraction au triton X-114, puisqu'elles migrent toutes les deux dans les fractions D et A. Des différences de comportement sont cependant observées en fractionnement cellulaire : alors que la fusion SAG1-TM CD46-GRA5-HF est exclusivement associée aux culots membranaires (LSP et HSP), et que l'association au HSP ne peut être solubilisée que par le NP-40, SAG1-TM GRA5-GRA5-HF est majoritairement associée à la fraction soluble HSS. Une fraction de la protéine est associée au LSP, association qui est solubilisée à la fois par l'urée et par le NP-40. Ce profil ressemble fortement à celui observé pour le contrôle GRA1. A l'opposé de SAG1-TM CD46-GRA5-HF qui possède les propriétés biochimiques d'une protéine intégrale de membrane, SAG1-TM GRA5-GRA5-HF est donc à la fois présente sous forme soluble et sous forme d'agrégats, ce qui est caractéristique des protéines GRAs (Sibley *et al.*, 1995 ; Labruyère *et al.*, 1999 ; Lecordier *et al.*, 1999).

Ces résultats démontrent que dans le contexte du domaine Nt de SAG1, la longueur du domaine TM intervient dans l'adressage soluble aux GD *versus* à la MPP.

II- 2- 2- Influence du TM dans le contexte du Nt GRA5

II- 2- 2- 1- Résultats de transfection transitoire

Afin de valider ce résultat dans le contexte du domaine Nt de GRA5, nous avons conçu des protéines chimériques dérivées de GRA5 présentant le domaine TM de CD46. Les constructions GRA5-TM CD46-GRA5, GRA5-TM CD46-GRA5-HF et GRA5-TM CD46-CD46-HF (Fig. 20A) ont été transfectées transitoirement dans des parasites de la souche $\Delta gra5$. Dans des cellules infectées perméabilisées en saponine, nous avons pu observer que les deux fusions GRA5-TM CD46-GRA5-HF et GRA5-TM CD46-CD46-HF étaient adressées à la MPP (Fig. 20B droite). L'utilisation de constructions étiquetées permet de préciser que cette insertion présente une topologie de type I, puisque la partie Nt est reconnue par le mAb anti-GRA5 tandis que l'étiquette Ct est inaccessible au sérum de lapin anti-HA (Fig. 20B droite). La construction non étiquetée GRA5-TM CD46-GRA5 présente également cette insertion dans la MPP. De façon inattendue, nous avons également observé que les fusions GRA5-TM CD46-GRA5-(HF) et GRA5-TM CD46-CD46-HF étaient adressées aux GD dans

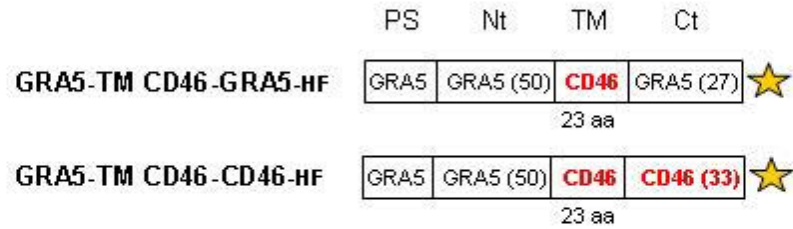
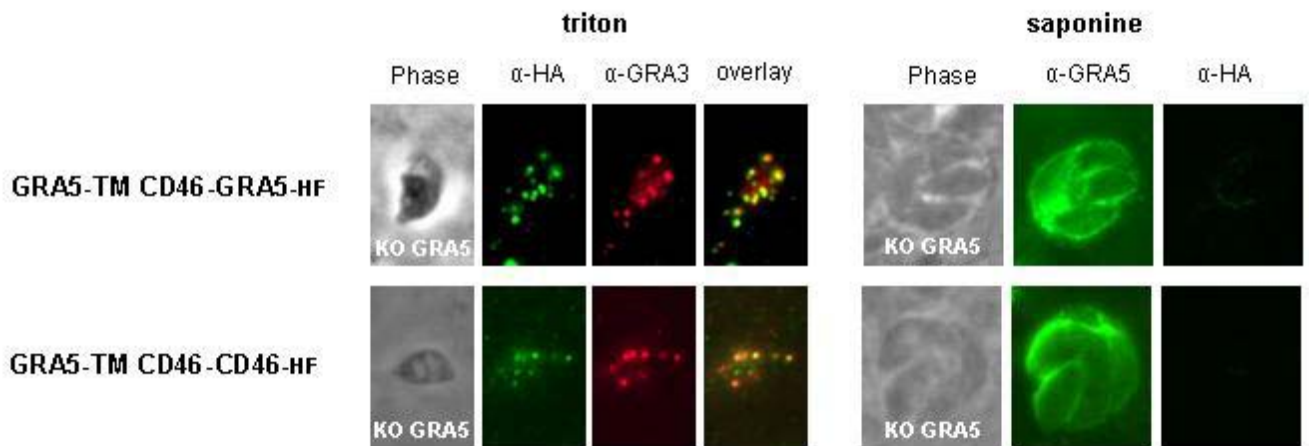
A**B**

Fig. 20 : Le domaine Nt de GRA5 constitue un facteur prédominant de l'adressage soluble aux GD. (A) Représentation schématique de GRA5 endogène et des fusions GRA5-TM CD46-*GRA5* et GRA5-TMCD8-*GRA5*. Les annotations utilisées sont décrites dans la légende de la Figure 1. (B) Séquence des domaines transmembranaires de GRA5, CD46 et CD8. (C) Localisation des fusions GRA5-TM CD46-*GRA5* et GRA5-TM CD8-*GRA5* exprimées de façon stable dans des parasites Δ *gra5*, en comparaison à la localisation de GRA5 endogène dans des parasites sauvages RH. Les cellules infectées sont perméabilisées totalement au triton X-100, puis les protéines fusion et GRA5 endogène sont détectées grâce au mAb α -GRA5. Leur localisation est comparée à celle de GRA3 endogène détectée grâce au sérum α -GRA3. (D) Comportement biochimique de GRA5-TM CD46-*GRA5* et GRA5-TM CD8-*GRA5* dans des parasites extracellulaires. Des transformants stables sont soumis à la procédure de fractionnement décrite dans la légende de la Figure 4C. Les fractions sont analysées à l'aide du mAb α -GRA5, et le comportement des protéines fusion est comparé à celui de GRA5 endogène issue de la souche RH.

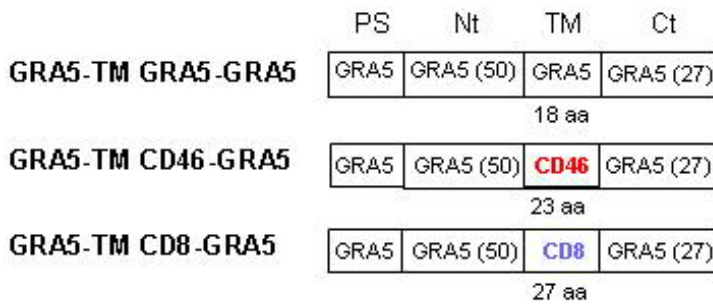
des parasites extracellulaires (Fig. 20B gauche). Or, les protéines délivrées à la surface ne semblent pas transiter par la voie des GD (Fig. 16C). Nous avons déduit de ces résultats qu'en transfection transitoire, les fusions GRA5-TM CD46-GRA5-(HF) et GRA5-TM CD46-CD46-HF présentent un mécanisme d'adressage double, aux GD d'une part et à la MPP d'autre part. La présence du domaine TM de CD46 exerce donc une certaine influence sur l'adressage de ces protéines, qui sont partiellement insérées dans la MPP, mais il semblerait que le domaine Nt de GRA5 contienne un signal contradictoire qui tend à entraîner les fusions vers les GD.

II- 2- 2- Résultats obtenus sur les clones stables

L'expression stable des protéines est la méthode de choix pour étudier les événements moléculaires qui les concernent. Afin d'étudier l'influence du domaine TM dans le cadre du Nt GRA5, nous avons donc obtenu des transformants stables de la souche $\Delta gra5$ qui expriment des constructions dérivées de GRA5 présentant différents domaines TM. Nous avons substitué le domaine TM de 18 aa de GRA5 par celui de CD46 (23 aa) ou de CD8 (27 aa), de façon à obtenir les fusions GRA5-TM CD46-GRA5 et GRA5-TM CD8-GRA5 (Fig. 21 A, B). Dans des cellules infectées perméabilisées en triton, les deux protéines sont adressées à la voie des GD (Fig. 21C). Quand les cellules sont perméabilisées à la saponine, aucun signal n'est obtenu avec le mAb anti-GRA5 à la surface du parasite. Ce résultat est conforme aux observations de transfection transitoire réalisées pour GRA5-TM CD8-GRA5, mais pour GRA5-TM CD46-GRA5 on observe une perte du marquage de surface lorsque l'expression de la protéine est stabilisée.

Des expériences de fractionnement cellulaire à partir de parasites extracellulaires ont permis de montrer que les deux protéines se comportent comme GRA5 endogène d'un point-de-vue biochimique (Lecordier *et al.*, 1999) : i) elles sont majoritairement associées à la fraction D après extraction au triton X-114 et ii) elles sont présentes sous forme soluble (HSS) mais aussi sous forme d'agrégats hydrophobes qui ne sont solubilisés que par le NP-40 (Fig. 21D).

Ces résultats démontrent l'importance du domaine Nt dans l'adressage soluble aux GD. Bien que nous ayons montré que dans le contexte du domaine Nt de SAG1, la longueur du TM constitue un facteur déterminant de l'adressage soluble aux GD, nos résultats indiquent que la présence du domaine Nt de GRA5 prédomine sur l'influence du domaine TM. Ce domaine

A**B**

TM GRA5: AVGLAAAVVAVWSLLRLL

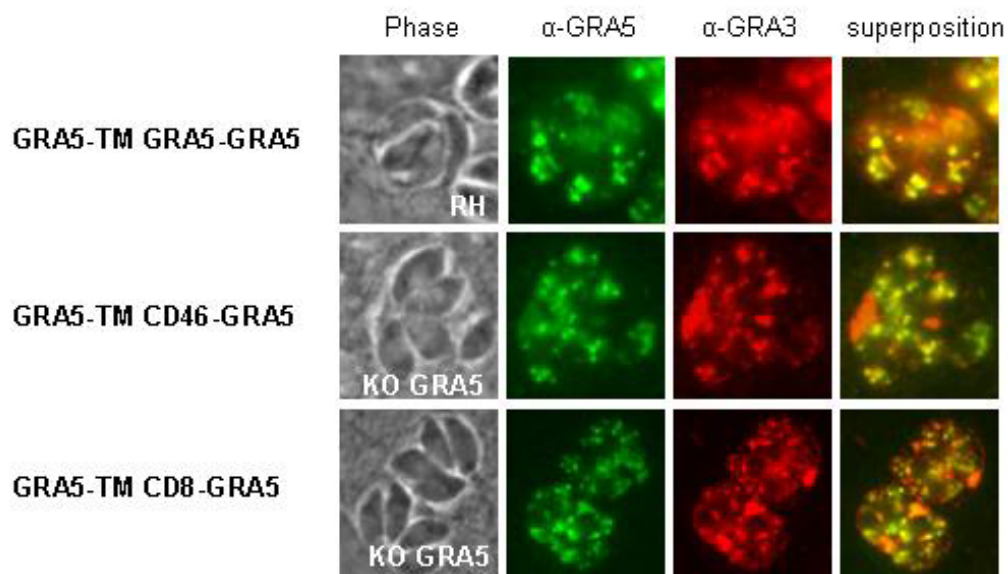
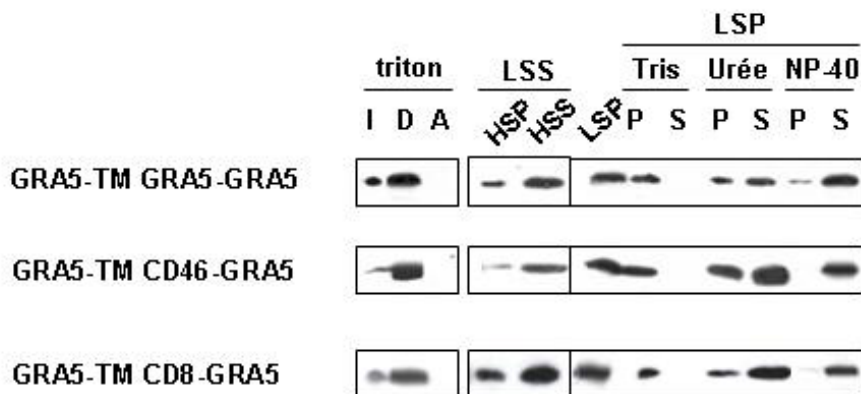
TM CD46: **VWVIAVIVIAIVVGVAVICWVPY**TM CD8: **DIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNH****C****D**

Fig. 21 : Double adressage des protéines fusion GRA5-TM CD46-GRA5-HF et GRA5-TM CD46-CD46-HF en immunofluorescence. Des parasites de la souche $\Delta gra5$ exprimant transitoirement les protéines sont marqués en tant que parasites extracellulaires perméabilisés au triton (à gauche), ou intracellulaires après perméabilisation des cellules infectées à la saponine (à droite). Le mAb α -GRA5 est utilisé comme anticorps anti-Nt et le sérum α -HA comme anticorps anti-Ct. GRA3 endogène est co-détectée à l'aide du mAb α -GRA3.

contient probablement un ou des signaux d'adressage qui permet(tent) la solubilisation à la fois de GRA5 endogène et de protéines fusions dérivées de GRA5 dans les GD.

III- Etude de l'adressage sélectif des protéines GRAs dans la vacuole

Après leur transit dans les GD, les protéines GRAs sont sécrétées sous formes solubles dans l'espace de la vacuole. GRA1, qui ne contient pas de domaine d'association membranaire, est le seul exemple de protéine GRA soluble. Les autres GRAs sont sélectivement adressées aux membranes du RNM (GRA2, 4, 6, 9) ou à la MVP (GRA3, 5, 7, 8). Parmi ces protéines, certaines se comportent biochimiquement comme des protéines intégrales de membrane (GRA3, 5, 6, 7). Les bases de cette insertion membranaire post-sécrétoire sélective ont été étudiées par substitution des domaines de GRA5 et GRA6 et étude des propriétés des protéines chimériques obtenues.

III- 1- Adressage et insertion membranaire de GRA5 dans la MVP

III- 1- 1- Importance des domaines PS, TM et Ct dans ce phénomène

Si le domaine PS des protéines GRAs est bien clivé lors de l'entrée dans le réticulum endoplasmique comme on le suppose, il ne devrait pas intervenir dans l'adressage post-sécrétoire de ces protéines. Afin de vérifier cela, nous avons exprimé de façon transitoire la fusion (PS CD46)-GRA5-TM GRA5-GRA5-HF (Fig. 17A) dans des parasites de la souche $\Delta gra5$. Des cellules infectées ont été perméabilisées sélectivement à la saponine, de façon à permettre le marquage des structures vacuolaires (Fig. 22). Dans ces cellules, la fusion (PS CD46)-GRA5-TM GRA5-GRA5-HF co-localise avec GRA3 au niveau de la MVP (Fig. 22 partie inférieure). Pour comparaison, la co-localisation de GRA5 endogène avec GRA3 endogène est présentée dans des parasites sauvages de la souche RH (Fig. 22 partie supérieure). Ces résultats permettent d'exclure un rôle du domaine PS de GRA5 dans l'adressage à la MVP.

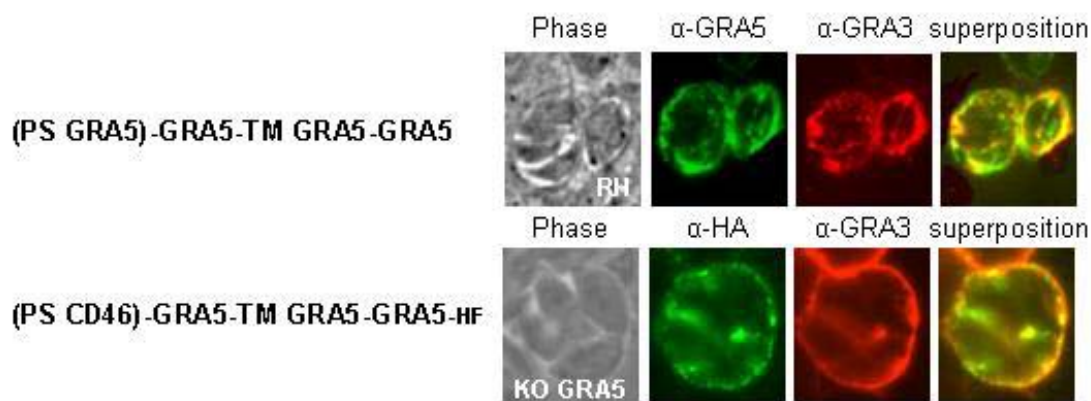


Fig. 22 : Le domaine PS de GRA5 n'est pas nécessaire à l'adressage post-sécrétoire de la protéine à la MVP. La fusion (PS CD46)-GRA5-TM GRA5-GRA5-HF est exprimée de façon transitoire dans des parasites de la souche $\Delta gra5$. Des cellules infectées perméabilisées à la saponine sont marquées par le sérum α - HA pour détecter la chimère, tandis que GRA3 endogène est détectée avec le mAb α - GRA3 (partie supérieure). Pour comparaison, la co-localisation de GRA5 endogène (détectée avec le mAb α - GRA5) avec GRA3 (détectée avec le sérum α - GRA3) au niveau de la MVP est présentée dans des cellules infectées par des parasites de la souche RH (partie inférieure).

Les résultats de cette étude ainsi que des résultats précédemment publiés (Karsten *et al.*, 2004) ont montré que le domaine TM des protéines GRAs intervenait dans l'adressage soluble aux GD. Pour déterminer si ce domaine joue également un rôle dans les phénomènes post-sécrétoires, nous avons comparé les propriétés des fusions GRA5-TM CD8-GRA5 et GRA5-TM CD46-GRA5 (Fig. 21 A, B) dans la vacuole (Fig. 23). Des transformants stables dérivés de la souche $\Delta gra5$ ont été utilisés pour infecter des cellules HFF, qui ont ensuite été perméabilisées à la saponine. La détection des protéines chimères avec le mAb anti-GRA5 procure un signal qui superpose avec celui obtenu pour GRA3 endogène à la MVP (Fig. 23A), ce qui indique que l'adressage de GRA5 à la MVP ne dépend pas de particularités de son domaine TM. Afin de préciser le comportement biochimique de ces fusions dans la vacuole, le matériel vacuolaire issu de cellules infectées a été séparé en une fraction soluble (HSS) et une fraction membranaire (HSP). Comme GRA5 endogène, les protéines fusions sont exclusivement associées au HSP. Cette association est résistante au traitement par l'urée mais elle est solubilisée par le NP-40 (Fig. 23B). Ces résultats montrent que le domaine TM de CD8 ou de CD46 permet non seulement l'adressage mais aussi l'insertion de GRA5 dans la MVP. Les propriétés post-sécrétoires particulières de GRA5 ne dépendent donc pas de son domaine TM.

Pour étudier le rôle potentiel du domaine Ct de GRA5 dans ce phénomène, la protéine de fusion GRA5-TM GRA5-CD 46-HF (Fig. 18A) a été exprimée de façon stable dans des parasites de la souche $\Delta gra5$, et ses propriétés d'adressage dans la vacuole ont été examinées. La fusion co-localise avec GRA3 endogène au niveau de la MVP (Fig. 23A). Quand on perméabilise de façon sélective la membrane des cellules infectées à la digitonine (Lecordier *et al.*, 1999), on observe que la MVP n'est pas marquée par le sérum de lapin anti-HA, alors que dans les mêmes conditions on observe un liseré correspondant à la MVP avec le mAb anti-GRA5 (qui reconnaît le domaine Nt de GRA5 ; Lecordier *et al.*, 1999) (Fig. 23C). Ces données montrent que GRA5-TM GRA5-CD46-HF est insérée dans la MVP avec le domaine Nt dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Cette orientation est la même que celle obtenue pour le contrôle GRA5-TM GRA5-GRA5-HF (Fig. 23C) (Lecordier *et al.*, 1999), ce qui permet de conclure que le domaine Ct de GRA5 n'a pas de rôle essentiel pour l'intégration de la protéine dans la MVP.

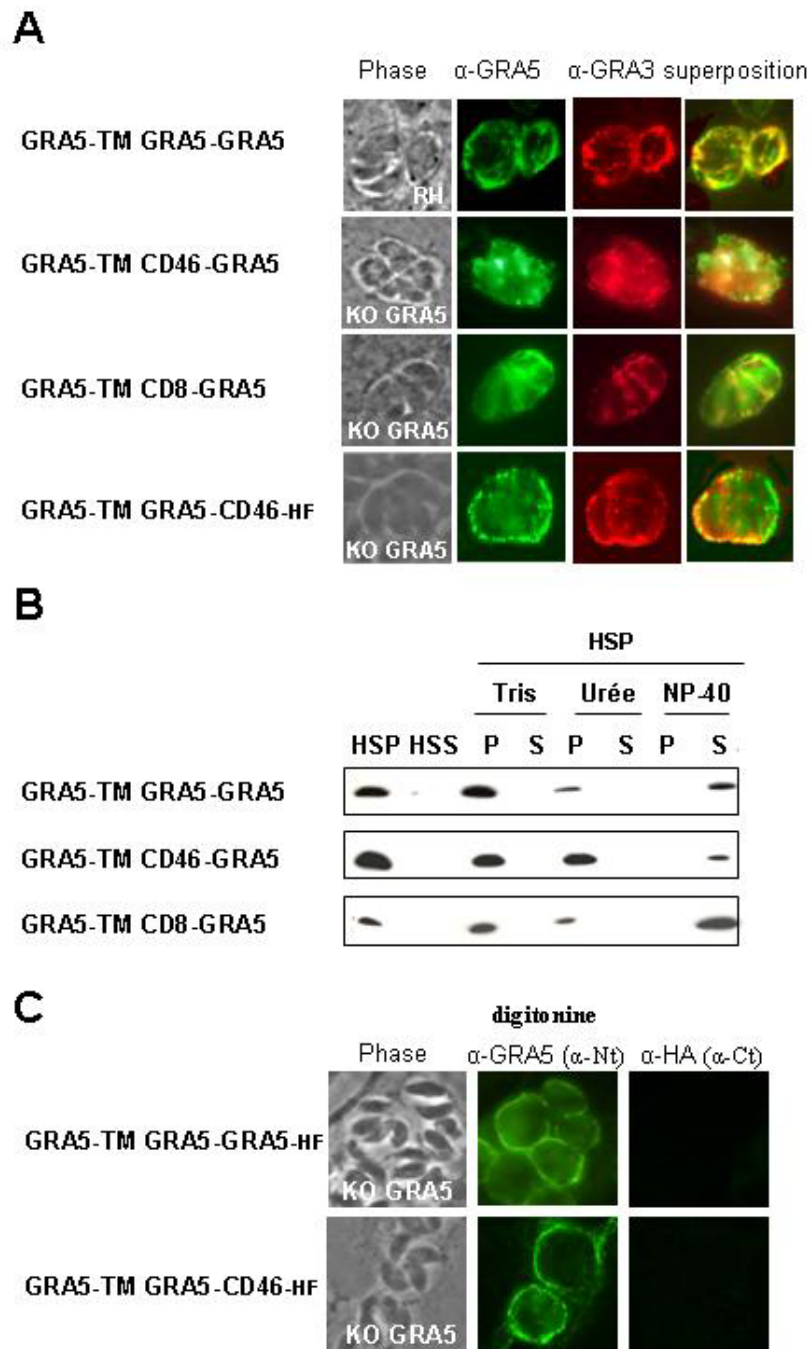


Fig. 23 : Ni le domaine TM ni le domaine Ct de GRA5 ne sont impliqués dans l'insertion de la protéine dans la MVP. (A) Immunolocalisation de GRA5-TM CD46-GRA5, GRA5-TM CD8-GRA5 et GRA5-TM GRA5-CD46-HF à l'intérieur de la vacuole. Des cellules HFF sont infectées soit par des parasites de la souche sauvage RH, soit par des parasites $\Delta gra5$ qui expriment de façon stable les protéines chimères, et perméabilisées de façon sélective à la saponine. Le mAb α -GRA5 permet de marquer à la fois GRA5 endogène et les protéines fusion. Le co-marquage GRA3 est obtenu grâce au sérum α -GRA3. (B) Profil de solubilité de GRA5-TM CD46-GRA5 et GRA5-TM CD8-GRA5 vacuolaires, par rapport à celui de GRA5 endogène. Des cellules sont infectées sur la nuit par des transformants stables dérivés de la souche $\Delta gra5$. Après élimination des parasites intracellulaires, les membranes (HSP) sont séparées des protéines solubles (HSS) par une étape de centrifugation à haute vitesse. Le HSP est traité par différents agents dénaturants, et les culots membranaires (P) sont séparés des fractions solubles (S) par une seconde centrifugation à haute vitesse. Les fractions sont analysées à l'aide du mAb α -GRA5. (C) Étude de la topologie de GRA5-TM GRA5-CD46-HF dans la MVP (partie supérieure) par rapport à celle de GRA5-TM GRA5-GRA5-HF (partie inférieure). Des cellules infectées avec des parasites $\Delta gra5$ qui expriment de façon stable les protéines chimères sont perméabilisées à la digitonine 0.002%. Le mAb α -GRA5 et le sérum α -HA sont utilisés en tant qu'anticorps α -Nt et α -Ct, respectivement.

III- 1- 2- Importance du domaine Nt dans l'insertion membranaire post-sécrétoire de

GRA5

Après avoir éliminé un rôle potentiel des segments PS, TM et Ct de GRA5 dans l'adressage post-sécrétoire de la protéine à la MVP, nous nous sommes intéressés à l'importance du domaine Nt dans ce phénomène. Dans un premier temps, afin de déterminer si ce domaine est suffisant pour adresser une protéine à la MVP, nous avons exprimé de façon stable la fusion GRA5-TM CD46-CD46-HF (Fig. 20A) dans des parasites de la souche $\Delta gra5$ (Fig. 24A). Dans des cellules infectées perméabilisées en saponine, le sérum anti-HA permet le marquage de la MVP, qui superpose avec celui obtenu pour GRA3 (Fig. 24B). Le fractionnement cellulaire de cellules infectées montre que la fusion est effectivement associée à la fraction membranaire (HSP) (Fig. 24C). Les propriétés d'association de la fusion avec le HSP sont différentes de celles observées pour GRA5 endogène : alors que la protéine endogène se comporte typiquement comme une protéine intégrale de membrane, l'association de la fusion GRA5-TM CD46-CD46-HF au HSP est partiellement déplacée par l'urée et par le NP-40. L'association de la protéine à la MVP reposerait donc à la fois sur des liaisons de type hydrogène et sur des liaisons hydrophobes. Si le domaine Nt de GRA5 ne paraît donc pas capable à lui tout seul de médier l'insertion stable d'une protéine transmembranaire dans la MVP, il est cependant suffisant pour permettre l'association de ce type de protéines avec la MVP.

Dans un second temps, nous avons cherché à déterminer si ce domaine était nécessaire pour l'insertion dans la MVP. Des transformants de la souche $\Delta sag1$ qui expriment de façon stable la fusion SAG1-TM GRA5-GRA5-HF (Fig. 24A) ont été utilisés pour répondre à cette question. De façon inattendue, nous avons obtenu un marquage de l'espace vacuolaire avec le sérum de lapin anti-HA, qui superpose avec le signal obtenu pour GRA1 (Fig. 24B). Des analyses biochimiques de la fraction vacuolaire de cellules infectées ont révélé que la fusion SAG1-TM GRA5-GRA5-HF est présente uniquement dans la fraction HSS, comme le contrôle soluble GRA1 (Fig. 24D). Le domaine Nt de GRA5 est donc bien nécessaire pour l'insertion membranaire de la protéine dans la MVP.

Des études antérieures ont montré que les régions flanquantes du TM pouvaient jouer un rôle à la fois dans l'adressage et la solubilité des protéines transmembranaires (Rayner *et al.*, 1997). Dans le contexte de la fusion SAG1-TM GRA5-GRA5-HF, l'absence de la région Nt

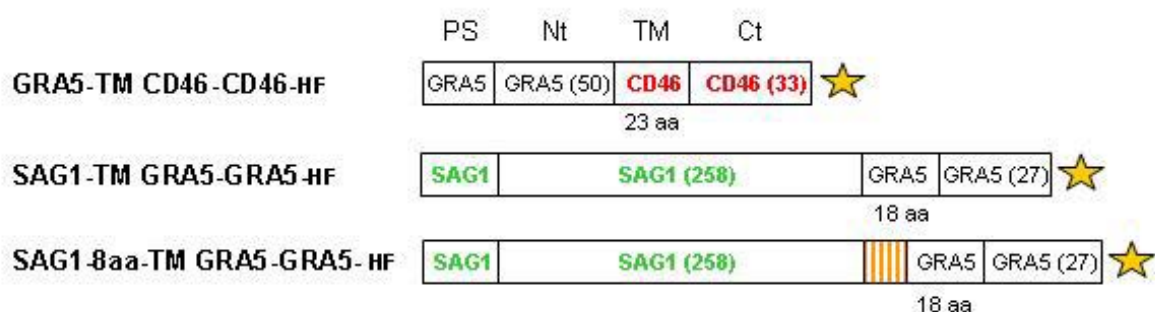
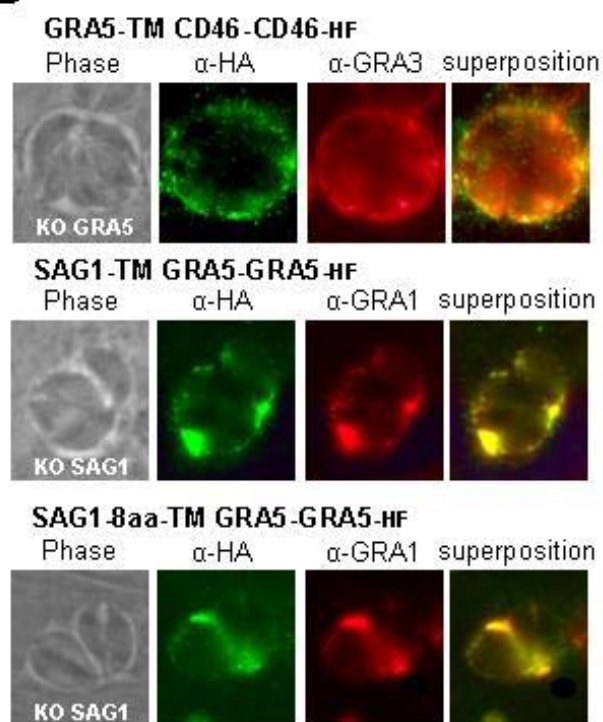
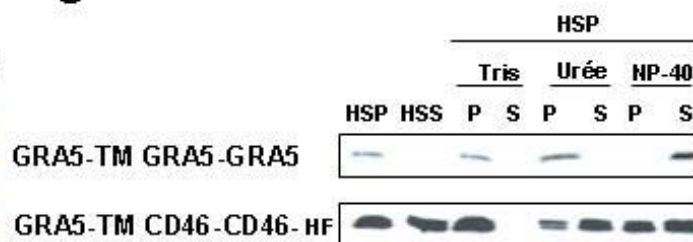
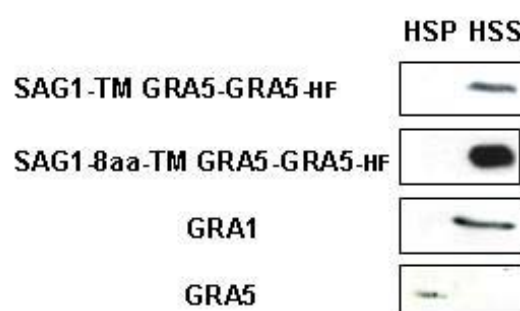
A**B****C****D**

Fig. 24 : Le domaine Nt de GRA5 est à la fois suffisant et nécessaire pour l'association à la MVP. (A) Représentation schématique des protéines fusion GRA5-TM CD46-CD46-HF, SAG1-TM GRA5-GRA5-HF et SAG1-8aa-TM GRA5-GRA5-HF. Le rectangle à rayures jaunes représente les 8 aa de GRA5 qui flanquent le domaine TM du côté Nt. (B) Immunolocalisation de GRA5-TM CD46-CD46-HF exprimée de façon stable dans des parasites $\Delta gra5$, et des fusions SAG1-TM GRA5-GRA5-HF et SAG1-8aa-TM GRA5-GRA5-HF exprimées de façon stable dans des parasites $\Delta sag1$. Des cellules infectées sont perméabilisées de façon sélective à la saponine. Les protéines de fusion sont détectées avec le sérum α -HA, et GRA3 ou GRA1 endogènes sont détectées avec les mAb α -GRA3 et α -GRA1, respectivement. (C) Analyse par fractionnement cellulaire de GRA5-TM CD46-CD46-HF vacuolaire. Des cellules HFF infectées sur la nuit avec un mutant $\Delta gra5$ qui exprime de façon stable la protéine de fusion sont traitées comme décrit dans la légende de la Figure 9B. Le mAb α -GRA5 permet la détection de la protéine de fusion. En contrôle, GRA5 endogène est détectée à l'aide du mAb α -GRA5 dans des parasites RH soumis à la même procédure. (D) Analyse de solubilité SAG1-TM GRA5-GRA5-HF et SAG1-8aa-TM GRA5-GRA5-HF vacuolaires. Les deux protéines fusion sont détectées à l'aide du sérum α -HA, alors que GRA5 et GRA1 endogènes sont détectées avec les mAb α -GRA5 et α -GRA1, respectivement.

de GRA5 adjacente au TM pourrait expliquer la solubilisation observée dans l'espace de la vacuole. Pour étudier cette possibilité, nous avons exprimé de façon stable dans la souche *Δsag1* la construction SAG1-8aa-TM GRA5-GRA5-HF, qui contient les 8 aa proximaux du TM du côté Nt (Fig. 24A). Cette fusion est adressée aux GD (Fig. 26A), et est détectée dans l'espace vacuolaire (Fig. 24B) sous forme soluble (Fig. 24D). Ces résultats indiquent que les propriétés particulières du domaine Nt de GRA5 ne reposent pas sur la région Nt flanquante du TM.

En résumé, nos données démontrent que le domaine Nt de GRA5 est à la fois nécessaire et suffisant pour l'adressage de la protéine à la MVP. Ce domaine contient donc un signal d'adressage à la MVP, qui n'est pas inclus dans l'environnement Nt proximal du domaine TM.

III- 2- Adressage de GRA6 aux membranes du RNM

Afin de déterminer si les résultats obtenus pour GRA5 pouvaient être étendus à une autre protéine GRA transmembranaire, nous avons construit un jeu de protéines chimères qui présentent des domaines spécifiques de GRA6, une protéine ciblée aux membranes du RNM. Nous avons pu ainsi étudier la sélectivité du processus d'adressage des protéines GRAs aux différents systèmes membranaires de la VP.

III- 2- 1- Suffisance du domaine Nt de GRA6 pour l'insertion dans les membranes du

RNM

Des parasites *Δgra6* qui expriment de façon stable la construction GRA6-TM CD46-CD46-HF (Fig. 25A) ont été obtenus. La protéine est adressée à la voie des GD (Fig. 26B), et est sécrétée dans l'espace de la vacuole, où elle co-localise avec GRA2 (Fig. 25B). Par fractionnement cellulaire de cellules infectées, on observe que la protéine est présente à la fois dans les fractions solubles et membranaires, comme GRA6 endogène (Labruyère *et al.*, 1999) (Fig. 25C). GRA6-TM CD46-CD46-HF est donc au moins partiellement associée aux membranes du RNM. Cette association est en partie solubilisée par l'urée et par le NP-40, ce

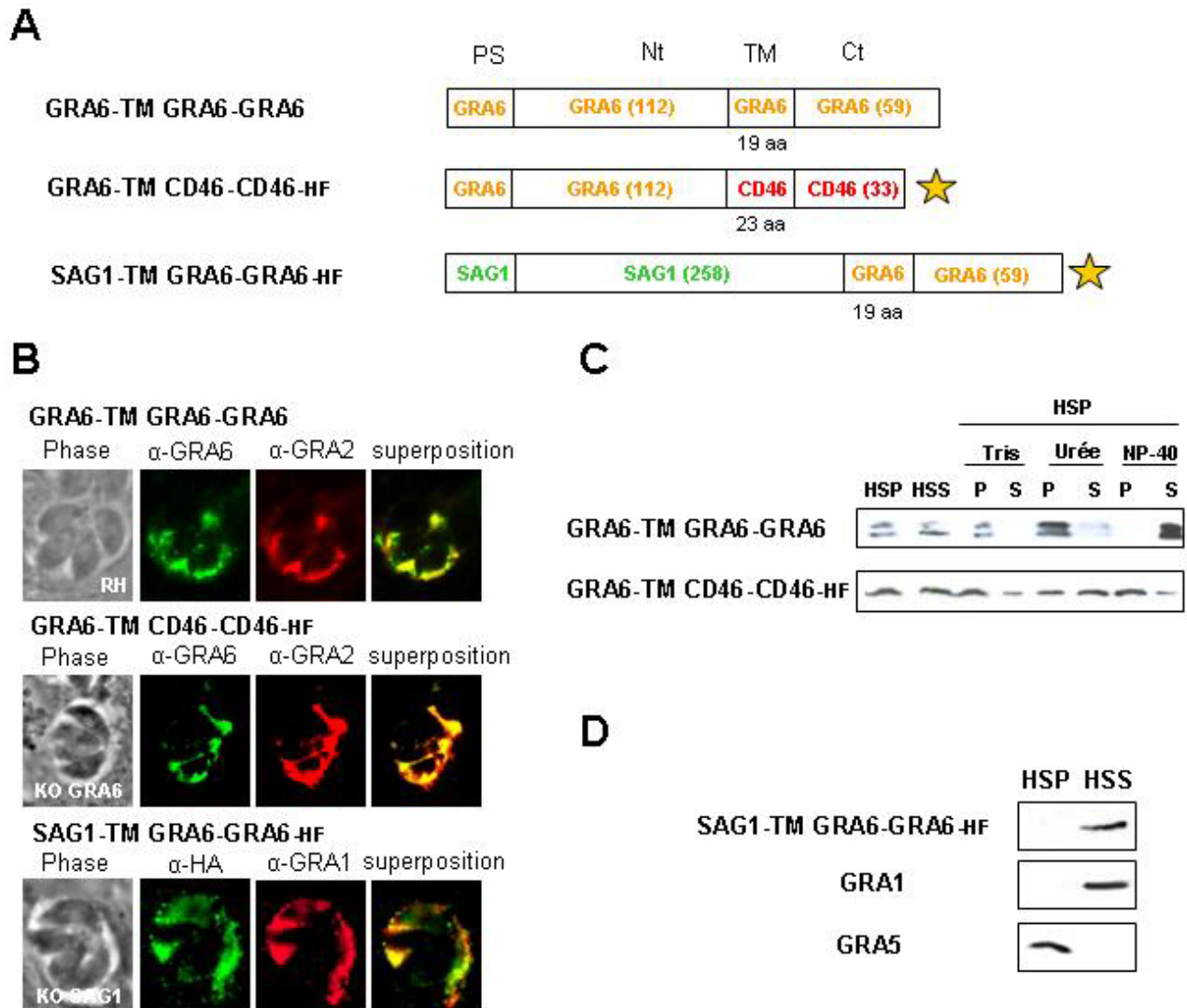


Fig. 25 : Le domaine Nt de GRA6 est responsable de l'association de la protéine au MNN. (A) Représentation schématique de GRA6 endogène et des protéines fusion GRA6-TM CD46-CD46-HF et SAG1-TM GRA6-GRA6-HF. Les annotations et symboles utilisés sont décrits dans la légende de la Figure 1. (B) Immuno-localisation de GRA6-TM CD46-CD46-HF exprimée de façon stable dans des parasites $\Delta gra6$ et de SAG1-TM GRA6-GRA6-HF exprimée de façon stable dans des parasites $\Delta sag1$. Après perméabilisation à la saponine de cellules infectées sur la nuit, GRA6-TM CD46-CD46-HF est détectée à l'aide du sérum α -GRA6, et SAG1-TM GRA6-GRA6-HF à l'aide du sérum α -HA. GRA2 et GRA1 endogènes sont détectées à l'aide des mAb α -GRA2 et α -GRA1, respectivement. En comparaison, GRA6 et GRA2 endogènes sont détectées dans la souche sauvage RH à l'aide du sérum α -GRA6 et du mAb α -GRA2, respectivement (partie supérieure). (C) Comportement biochimique de GRA6-TM CD46-CD46-HF vacuolaire exprimée de façon stable dans des parasites $\Delta gra6$. Des cellules infectées sont traitées comme décrit dans la légende de la Figure 9B. En contrôle, des parasites RH sont traités de la même façon. Le sérum α -GRA6 permet à la fois de détecter la protéine de fusion et GRA6 endogène. (D) Profil de solubilité de SAG1-TM GRA6-GRA6-HF dans la vacuole. Des cellules sont infectées par un transformant stable dérivé de la souche $\Delta sag1$, et traitées comme décrit dans la légende de la Figure 9B. Le profil obtenu pour la protéine de fusion avec le sérum α -HA est comparé aux profils obtenu pour GRA1 (avec le mAb α -GRA1) et GRA5 (avec le mAb α -GRA5).

qui montre qu'elle repose à la fois sur des liaisons hydrogènes et hydrophobes (Fig. 25C). Même si le mode d'association de GRA6-TM CD46-CD46-HF aux membranes du RNM diffère de l'insertion transmembranaire de GRA6 dans ces membranes, nos résultats permettent de conclure que le domaine Nt de GRA6 est responsable de cette association.

III- 2- 1- Nécessité du domaine Nt pour l'insertion membranaire post-sécrétoire de

GRA6

La substitution du domaine Nt de GRA6 par celui de SAG1 dans le contexte de GRA6 endogène a été réalisée (construction SAG1-TM GRA6-GRA6-HF, Fig. 25A). Exprimée de façon stable dans des parasites *Δsag1*, la protéine de fusion emprunte la voie des GD (Fig. 26C) avant d'être sécrétée dans l'espace vacuolaire (Fig. 25B). A l'intérieur de la vacuole, la protéine est entièrement solubilisée (Fig. 25D). Le domaine Nt de GRA6 est donc nécessaire à l'association sélective de la protéine aux membranes du RNM.

Par substitution avec le domaine Nt de SAG1, nous avons démontré que le domaine Nt de deux protéines GRAs transmembranaires (GRA5 et GRA6) est nécessaire à l'insertion membranaire post-sécrétoire de ces protéines dans la VP. Lorsque l'on fusionne ces domaines avec le TM et le Ct d'une protéine transmembranaire de mammifère, on observe l'association sélective des protéines à la MVP (dans le cas du Nt GRA5) ou aux membranes du RNM (dans le cas du Nt GRA6). Ces résultats démontrent que le domaine Nt des protéines GRAs transmembranaires constitue un élément essentiel dans le tri post-sécrétoire de ces protéines vers leurs domaines membranaires respectifs.

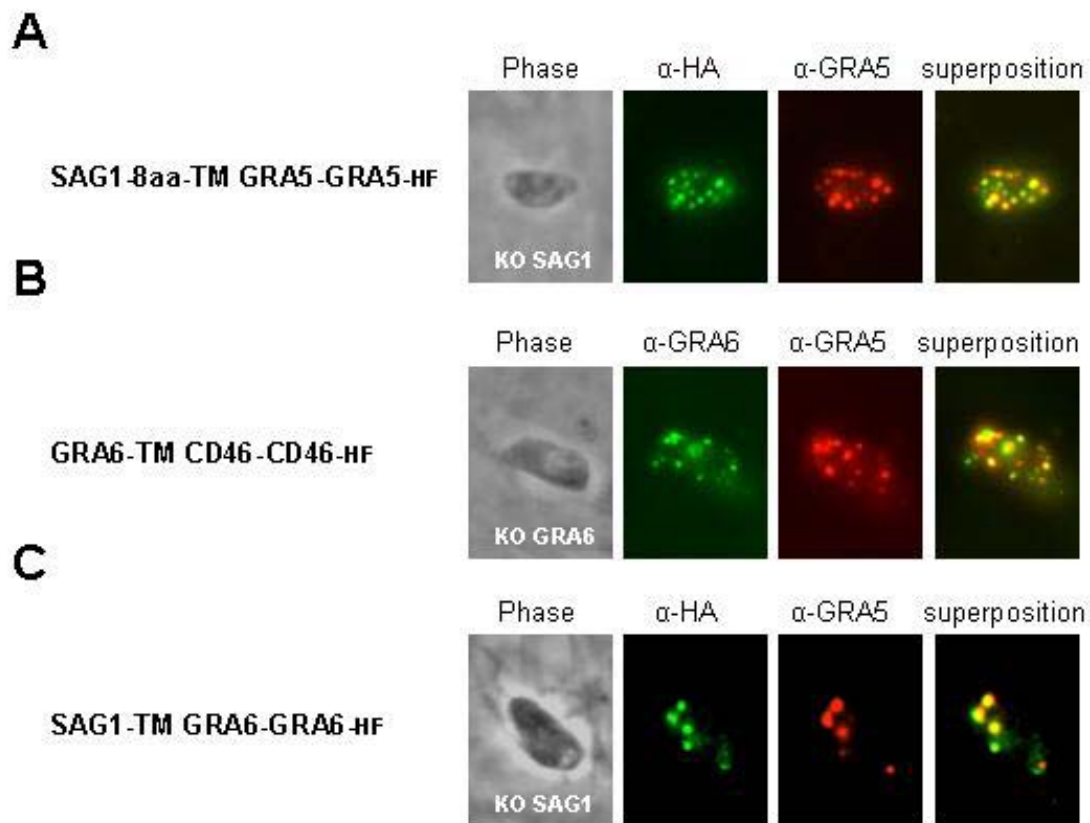


Fig. 26 : Adressage aux GD de SAG1-8aa-TM GRA5-GRA5-HF, GRA6-TM CD46-CD46-HF et SAG1-TM GRA6-GRA6-HF dans des parasites extracellulaires. Des parasites Δ *gra6* exprimant GRA6-TM CD46-CD46-HF ou des parasites Δ *sag1* exprimant les constructions dérivées de SAG1 sont perméabilisés au triton X-100, puis incubés avec le sérum α -GRA6 pour la détection de GRA6-TM CD46-CD46-HF ou le sérum α -HA pour la détection des chimères dérivées de SAG1. La co-détection de GRA3 (à l'aide du mAb α -GRA3) ou GRA5 (à l'aide du mAb α -GRA5) est présentée.

III- 3- Fusions GRA5/GRA6

Les protéines fusion utilisées dans cette étude étaient basées sur les protéines SAG1 et CD46, qui sont de taille beaucoup plus importante que les protéines GRAs. De plus, la protéine de mammifères CD46 est susceptible de présenter des modifications post-traductionnelles qui ne peuvent pas être réalisées chez le *Toxoplasme*, ce qui pourrait modifier ses propriétés de sécrétion. Pour confirmer les résultats obtenus dans un contexte plus physiologique, nous avons fusionné le domaine Nt de GRA5 avec le TM et Ct de GRA6 (construction GRA5-TM GRA6-GRA6-HF, Fig. 27A) et inversement le domaine Nt de GRA6 a été fusionné avec les domaines TM et Ct de GRA5 (construction GRA6-TM GRA5-GRA5-HF, Fig. 27A). Ces deux fusions ont été exprimées de façon stable dans des parasites $\Delta gra5$ et $\Delta gra6$, respectivement. Par immunofluorescence sur des cellules infectées, on observe que la fusion GRA5-TM GRA6-GRA6-HF est adressée à la MVP, alors que la fusion GRA6-TM GRA5-GRA5-HF est localisée dans l'espace de la vacuole. En raison du faible niveau d'expression des protéines chimères, il n'a pas été possible de réaliser d'analyses biochimiques sur les formes vacuolaires de ces fusions. Cependant, les propriétés d'adressage observées en immunofluorescence concordent avec les résultats obtenus jusqu'alors : le domaine Nt de GRA5 est suffisant pour adresser GRA6 à la MVP, tandis que le domaine Nt de GRA6 permet l'adressage de GRA5 aux membranes du RNM.

En résumé, nos résultats démontrent l'importance cruciale du domaine Nt des protéines GRAs transmembranaires (GRA5 et GRA6 dans cette étude) dans leurs propriétés de sécrétion. Ce domaine est impliqué non seulement dans la solubilisation de ces protéines au sein des GD, mais surtout au niveau de leur adressage post-sécrétoire sélectif dans la vacuole parasitophore.

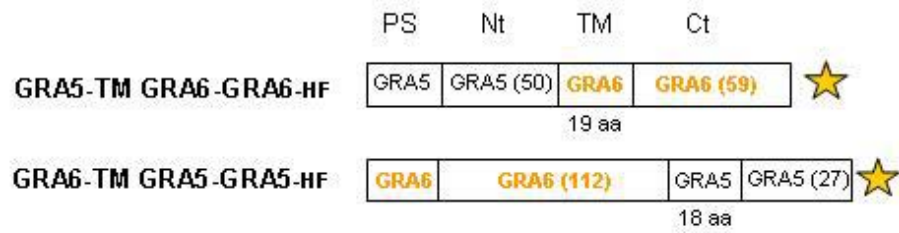
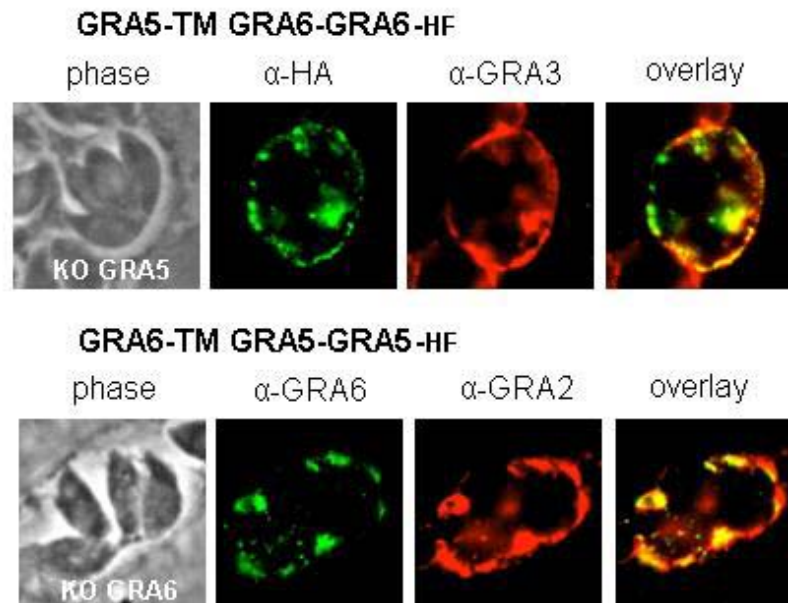
A**B**

Fig. 27 : Analyse par immunofluorescence des fusions GRA5-TM GRA6-GRA6-HF et GRA6-TM GRA5-GRA5-HF dans des parasites de la souche $\Delta gra5$ ou $\Delta gra6$, respectivement. Après perméabilisation des cellules infectées à la saponine, les protéines GRA5-TM GRA6-GRA6-HF et GRA6-TM GRA5-GRA5-HF sont détectées avec le sérum α -HA et α -GRA6 respectivement, tandis que GRA3 et GRA2 endogènes sont détectées avec les mAb α -GRA3 et α -GRA2.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la biogénèse des GD et de la VP de *T. gondii*. Les analyses moléculaires et biochimiques de ces deux compartiments sont rendues difficiles par l'absence de méthodologie permettant de les purifier.

A la fin de l'invasion, la VP est maturée en un compartiment métabolique fonctionnel suite à la sécrétion du contenu des GD. La VP mature possède donc une origine mixte, à la fois parasitaire et cellulaire : les lipides de la MVP proviennent majoritairement de la membrane plasmique de la cellule hôte, alors que la plupart des protéines membranaires sont exclues lors du passage à travers la jonction mobile. La MVP et les tubules du RNM sont donc principalement constitués de protéines d'origine parasitaire, dont les protéines GRAs. Parmi ces protéines, certaines sont insérées de façon stable dans les membranes de la VP. Le mécanisme par lequel des protéines transmembranaires sont sécrétées au-delà de la membrane plasmique du parasite et adressées spécifiquement aux différents compartiments de la VP est inconnu. Par l'expression de protéines chimériques dérivées de la protéine modèle GRA5, nous avons disséqué les déterminants moléculaires qui permettent le trafic des protéines GRAs TM au sein des GD parasites, puis leur insertion post-sécrétoire dans les membranes de la vacuole. Nous avons démontré que le domaine Nt de ces protéines est essentiel dans les processus de sécrétion et d'adressage membranaires particuliers de ces protéines.

I- Comparaison des deux systèmes d'expression Toxoplasme versus cellule de mammifère

La cellule de Toxoplasme présente un appareil de sécrétion hautement spécialisé, caractérisé par la présence d'un jeu de trois organites de sécrétion singuliers que sont les micronèmes, les rhoptries et les GD. A l'inverse, les cellules de mammifères HEK 293-T ne présentent pas de voie de sécrétion régulée. En l'absence de tout signal de tri, les protéines transmembranaires sont adressées à la membrane plasmique par la voie vésiculaire de sécrétion constitutive. La comparaison de ces deux systèmes d'expression a été réalisée par l'expression d'une protéine propre à un système dans l'autre système. Cette approche a permis de démontrer que le trafic particulier des protéines GRAs est inhérent au système sécrétoire de *T. gondii* et dépend des propriétés intrinsèques du domaine Nt de ces protéines.

I- 1- Les propriétés particulières de sécrétion des protéines GRAs sont propres au parasite

L'expression transitoire de la protéine GRA5 dans les cellules HEK 293-T suivie de l'étude sa localisation et de ses propriétés biochimiques a révélé que GRA5 se comporte comme une protéine intégrale de la membrane plasmique dans les cellules de mammifères. Comme le contrôle de protéine de surface CD46, elle adopte une topologie de type I : elle s'insère dans la membrane du RE avec son domaine Nt côté lumière du RE, et garde cette conformation tout au long de la voie de sécrétion, jusqu'à la fusion avec la membrane plasmique qui permet l'exposition du domaine Nt à l'extérieur de la cellule. Ces données ont été complétées par l'étude du comportement de la protéine GRA7 dans les cellules HEK : GRA7 adopte également une conformation transmembranaire dans ce système d'expression avec une topologie de type I. A l'inverse, la protéine soluble de toxoplasme GRA1 semble se comporter comme une protéine soluble cytoplasmique en cellules de mammifères, malgré la présence d'un peptide signal dans la séquence de GRA1. Le fort niveau d'expression de la protéine pourrait être responsable d'un phénomène de fuite vers le cytoplasme. L'éventuelle sécrétion de GRA1 dans le surnageant de culture des cellules HEK aurait pu être testée en

immunoblot afin de confirmer que le peptide signal de la protéine est fonctionnel dans ce type cellulaire.

Chez les eucaryotes, la voie constitutive de sécrétion qui permet l'adressage des protéines transmembranaires à la surface des cellules constitue la voie par défaut pour ces protéines. Il semble donc que GRA5 et GRA7 ne présentent aucun motif d'adressage ou de rétention qui soit reconnu par la machinerie de tri des cellules de mammifères, et suivent la voie de sécrétion par défaut jusqu'à la surface. GRA5 et GRA7 présentent des domaines TM de différentes longueurs (18 aa pour GRA5 et 22 aa pour GRA7). Malgré le court TM de GRA5, il semblerait que la protéine soit efficacement insérée dans les systèmes membranaires de la cellule dès le stade du RE.

Chez *T. gondii*, GRA5 est adressée à la voie des GD, au sein desquels elle est retrouvée à la fois sous forme soluble et agrégée (Lecordier *et al.*, 1999). Elle ne s'associe pas à la membrane des GD, comme le montrent les données de la microscopie électronique (Lecordier *et al.*, 1999). Dans les cellules de mammifères à sécrétion régulée, l'agrégation des protéines est l'un des mécanismes clé d'adressage aux granules de sécrétion régulés denses aux électrons (voir la revue de Dikeakos *et al.*, 2007). Il a été décrit que l'expression de protéines de granules de sécrétion permet l'apparition de vésicules cytoplasmiques contenant des agrégats, y compris dans des cellules qui ne possèdent pas de système de sécrétion régulée. C'est le cas de la sécrétogranine II ou du précurseur de la vasopressine exprimées dans les cellules HEK 293-T (Beuret *et al.*, 2004). Or, la résistance à l'urée observée pour GRA5 exprimée en cellules HEK 293-T semble indiquer que cette protéine ne forme pas d'agrégats dans ce système cellulaire. Les facteurs qui permettent l'agrégation de GRA5 dans les GD de *Toxoplasma* seraient donc propres au parasite.

Les mécanismes mis en place pourraient intervenir au niveau du RE en empêchant l'insertion des protéines GRAs TM dans la membrane. Cependant, les mécanismes du trafic dans le système sécrétoire précoce étant très conservés dans l'évolution, il serait plus vraisemblable que les protéines GRAs s'insèrent dans la membrane du RE chez le *Toxoplasme* comme dans les cellules de mammifères. Nos résultats concernant la localisation de surface de GRA5 en HEK 293-T confirment cette hypothèse. De plus, Karsten *et al.* ont pu déterminer une topologie de type I pour GRA4 exprimée *in vitro* dans un système de lysat de réticulocytes de lapin et de microsomes canins (Karsten *et al.*, 2004). Ces données laissent supposer que les

GRAs TM s'insèrent *in vivo* dans la membrane du RE, et que leur solubilisation interviendrait plus tardivement dans la voie de sécrétion du Toxoplasme (voir Fig. 30).

Afin de compléter les résultats obtenus dans les HEK 293-T, nous avons tenté d'exprimer GRA5 dans une lignée de cellules eucaryotes qui possède un système de sécrétion régulée. La lignée de cellules hypophysaires ATt20 (ATCC-1795) est la lignée de référence pour les études sur les voies de sécrétion eucaryotes endocrines et exocrines (Gumbiner *et al.*, 1982 ; Moore *et al.*, 1983). Ces expériences ont été réalisées en fin de thèse, or ces cellules ont tendance à former des paquets peu adhérents ce qui rend leur culture difficile. En raison de ces difficultés, les essais de transfection et d'immunofluorescence menés ont été peu concluants. Une meilleure maîtrise des techniques de culture de ces cellules particulières serait nécessaire à l'approfondissement de ces études.

I- 2- Vers l'identification d'une nouvelle voie pour l'adressage des protéines transmembranaires à la surface de *T. gondii*

Dans les cellules de mammifères, les protéines solubles et transmembranaires dépourvues de signal de tri suivent par défaut la voie vésiculaire de sécrétion constitutive. Celle-ci permet le transport des protéines à l'extérieur de la cellule ou leur adressage à la membrane plasmique, respectivement. Chez *T. gondii*, des travaux antérieurs avaient montré que les GD constituent la voie de sécrétion par défaut pour les protéines solubles (Karsten *et al.*, 1998 ; Striepen *et al.*, 2001). L'existence d'une voie par défaut pour les protéines transmembranaires reste à être démontrée.

Dans les parasites, les protéines CD46-TM CD46-CD46-HF et SAG1-TM CD46-CD46-HF empruntent une voie caractérisée en immunofluorescence par des structures ponctiformes réparties dans l'ensemble du cytoplasme, qui ne co-localisent pas avec les GD. Dans le cas de SAG1-TM CD46-CD46-HF, ces vésicules sont associées à l'adressage de la protéine à la membrane plasmique parasitaire avec une topologie de type I. Les études biochimiques réalisées sur des transformants stables montrent que, contrairement à ce qui est observé pour les protéines GRAs, l'association de la fusion aux membranes parasitaires est résistante au traitement par l'urée. Ces éléments indiquent que la protéine modèle de surface parasitaire

SAG1-TM CD46-CD46-HF s'insère dans les membranes de l'appareil de sécrétion du parasite. Elle emprunte une voie vésiculaire de sécrétion, distincte de la voie des GD, qui permet son adressage à la surface. Il existerait donc chez *T. gondii* une voie constitutive de sécrétion, par laquelle les protéines transmembranaires sont adressées par défaut à la membrane plasmique.

Dans le cas de CD46-TM CD46-CD46-HF, l'absence de marquage de surface observé pourrait être corrélé à l'absence de glycosylation de la protéine exprimée dans le parasite. En effet, CD46 présente de nombreux sites de O-glycosylation et 3 sites de N-glycosylation dans sa portion N-terminale (Ballard *et al.*, 1987). L'importance de ces modifications dans l'activité de modulation du complément a été démontrée (Liszewski *et al.*, 1998). Chez *Toxoplasma*, alors que de nombreux sites de glycosylation sont prédits dans les protéines parasitaires, très peu sont effectivement modifiés (Schwarz and Tomavo, 1993). La machinerie de glycosylation du parasite, bien que fonctionnelle, serait donc limitante. En particulier, les sucres N-liés semblent être très rarement ajoutés (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993). A la lumière de ces connaissances, on peut interpréter le marquage périnucléaire et vésiculaire obtenu pour CD46 dans le Toxoplasme comme résultant d'un engorgement des voies de sécrétion parasitaires par une protéine repliée de façon incorrecte. En faveur de cette hypothèse, il a été observé que toutes les fusions présentant les domaines TM et Ct de CD46 (domaines qui ne contiennent pas de sites prédits de glycosylation) sont correctement adressées à leur compartiment cible dans le parasite. L'expression dans le parasite de mutants de glycosylation de la protéine CD46 permettrait peut-être de faciliter le trafic de CD46 vers la surface.

Malgré l'absence de détection de CD46 à la surface parasitaire par immunofluorescence, le marquage de structures vésiculaires dans le cytoplasme des parasites exprimant CD46 ressemble au marquage intracellulaire obtenu pour SAG1-TM CD46-CD46-HF, et conforte l'hypothèse d'une sécrétion commune de ces deux protéines *via* une même voie de sécrétion.

Si elle existe vraiment, pourquoi la voie de sécrétion constitutive du parasite n'a-t-elle pas été identifiée auparavant ? Tout d'abord, il convient de noter que très peu de protéines transmembranaires de surface ont été décrites à ce jour. La majorité des protéines de surface parasitaires sont associées à la MPP *via* une ancre GPI, comme c'est le cas pour SAG1 par exemple (de Macedo *et al.*, 2003). Il semblerait que SAG1 soit délivrée à la surface avec une grande efficacité, ce qui empêche sa détection au niveau intracellulaire que ce soit en

immunofluorescence (résultats non présentés) ou en microscopie électronique (J-F Dubremetz, communication personnelle). De plus, les constructions SAG1-TM CD46-CD46-HF et CD46-TM CD46-CD46-HF sont clonées sous le contrôle des promoteurs GRA5 et GRA1 respectivement, qui sont des promoteurs forts, et le nombre de copies insérées dans le génome parasitaire n'est pas contrôlé. Ces deux fusions sont donc surexprimées dans le parasite, ce qui pourrait expliquer un ralentissement du turn-over de la voie de sécrétion constitutive et permettrait ainsi leur détection au niveau intracellulaire.

Dans leur globalité, ces expériences ont permis de démontrer l'existence, chez le parasite, d'une voie de sécrétion de type constitutif qui permettrait l'adressage des protéines transmembranaires à la surface.

II- Déterminants de l'adressage soluble de GRA5 aux GD

La comparaison des systèmes d'expression cellules de mammifères *versus* Toxoplasme a permis de démontrer l'existence chez *T. gondii* d'un mécanisme de tri des protéines transmembranaires destinées soit à la surface soit aux GD du parasite. La poursuite de ce travail visait à définir les déterminants moléculaires qui sont à la base de cette ségrégation.

I- 1- Les domaines Nt et TM de GRA5 sont impliqués dans l'adressage aux GD

Par l'utilisation de protéines chimériques dérivées de GRA5, nous avons démontré l'importance des domaines Nt et TM dans l'adressage aux GD. Une étude basée sur la protéine GRA4 avait montré que la longueur du domaine transmembranaire serait le facteur déterminant de l'adressage aux GD *versus* à la MPP *via* l'appareil de Golgi (Karsten *et al.*, 2004). Cette étude faisait intervenir des protéines de fusion présentant des domaines TM de différentes longueurs fusionnées en Nt avec la protéine soluble BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase).

Nos résultats ne contredisent pas ces données puisque les fusions SAG1-TM GRA5-GRA5-HF (TM de 18 aa) et SAG1-TM CD46-GRA5-HF (TM de 23 aa) sont adressées aux GD et à la MPP, respectivement. Cependant, l'adressage aux GD ne dépend pas seulement de la longueur du domaine TM puisque les fusions GRA5-TM CD46-GRA5 et GRA5-TM CD8-GRA5 sont toutes les deux adressées à la voie des GD, en dépit de leur domaine TM de 23 et 27 aa, respectivement. Ces données montrent que le domaine Nt de GRA5 joue un rôle prédominant lors de l'adressage de la protéine aux GD. Cette conclusion pourrait vraisemblablement s'appliquer à la protéine GRA4, mais ce résultat n'est pas apparu lors de l'étude de Karsten *et al.* puisqu'aucune des protéines de fusion utilisées ne présentait le domaine Nt de la protéine.

L'adressage soluble de GRA5 aux GD dépend donc d'au moins deux facteurs redondants présents dans le domaine TM et le domaine Nt de la protéine. La présence de plusieurs signaux de tri qui agissent en synergie au sein d'une même protéine a déjà été démontrée chez les mammifères : la pro-insuline, par exemple, contient un domaine de liaison à la protéine associée aux membranes des granules CPE (Cool and Loh, 1998), deux sites de clivage protéasiques constitués par une paire d'aa basiques (Steiner *et al.*, 1996), et la capacité à former des hexamères qui s'agrègent (Quinn *et al.*, 1991). Une telle redondance de signaux confère au système plus de fiabilité. Nos résultats impliquent que *Toxoplasma* aurait aussi développé des mécanismes de sécurité concernant l'adressage de ses protéines.

L'influence du domaine TM dépend-elle uniquement de la longueur de ce domaine ? Nos résultats de transfection transitoire indiquent que la fusion GRA5-TM CD46-GRA5 est partiellement adressée à la MPP en plus des GD au sein du même parasite, tandis que la fusion GRA5-TM CD8-GRA5 est uniquement localisée dans les GD. Cependant, le domaine TM de CD46 (23 aa) est plus court que celui de CD8 (27 aa), et l'on s'attendrait donc plutôt à ce que la fusion portant le domaine TM de CD8 soit partiellement localisée à la MPP, si la longueur du TM est le seul facteur déterminant cette localisation. Nous avons comparé les scores d'hydrophobicité des différents domaines TM utilisés dans nos fusions, ainsi que ceux calculés pour les domaines TM de quelques protéines parasitaires ou humaines connues (table I). Les valeurs obtenues sont comprises entre 25 et 70, et aucune homogénéité particulière n'est observée au sein des protéines GRAs ou des protéines humaines. Le score d'hydrophobicité du TM de CD46 est particulièrement élevé (68.2), ce qui pourrait expliquer

le double ciblage PPM et GD observé en transfection transitoire pour la fusion GRA5-TM CD46-GRA5.

Protéine	Séquence du TM	Longueur du TM	Score d'hydrophobicité
TgGRA5	AVGLAAAVVAVVSLRLL	18	43.3
TgGRA6	LIGAVVLAVSVAMLTAFLL	19	49.3
TgGRA3	NIPGYFVVINAILAAYYIRKVL	22	25.1
TgGRA7	VGTVLGFAALAAAAFLGMGLT	22	40.7
TgGRA8	LLFRTAVVAAMAAALITL	18	37.7
TgGAP50	FVRVVGITGLCIATIFLSLSVANG	24	42.2
hCD46	VWVIAVIVIAIVVGVAVICVVPY	23	68.2
hCD8	DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNH	27	35
hAQP1	TM 1 : FWRAVVAEFLATTLFVFISIGSALGFK	27	37.6
	TM 2 : VKVSLAFGLSIATLAQSV	18	25.8
	TM 3 : LMYIIAQCVGAIVATAILSGIT	22	42.3
	TM 4 : LGIEIIGTLQLVLCVLATT	19	35.3
hG3PP	TM1 :YRAFIFILTFLLYASFHLS	19	26.4
	TM 3 : RASTCGLMLLLAAPTLYIFSTI	22	29.1
	TM 4 : WSNVIFYMLMFADACALLFLIRL	22	33.3
HCV E2	YVLLFLLADARVCCLWMLLISQAEA	29	48.5

Tableau I : Séquence de différents domaines TM de protéines de *Toxoplasma*, de protéines humaines ou du HCV. La longueur de chaque TM est indiquée en acides aminés. Le score d'hydrophobicité est calculé à partir de l'échelle de Kyte et Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982). Les résidus du TM CD8 représentés en gras ne sont pas habituellement présents au sein des hélices TM. Tg, *Toxoplasma gondii*; h, human; HCV, Hepatitis C Virus; AQP1, Aquaporine 1; G3PP, Glycerol-3-phosphate permease.

Le domaine TM de CD8 contient plusieurs acides aminés peu représentés habituellement dans les hélices TM (représentés en gras dans la table I). Notamment, la présence d'un résidu proline est surprenante car ces résidus brisent habituellement les structures secondaires des protéines. Dans les hélices α TM, de tels résidus peuvent être tolérés lorsqu'ils sont présents du côté Nt de l'hélice, comme c'est le cas ici (G. von Heijne, 2007). La présence de deux glycines et d'une cystéine est également peu habituelle. En dépit de sa longueur, le domaine TM de CD8 pourrait ainsi permettre une solubilisation efficace de la protéine dans les GD dès les premiers stades d'expression en raison d'un nombre important de résidus qui déstabilisent l'insertion de ce domaine dans les membranes du RE.

I- 2- Mécanismes permettant la solubilisation de GRA5 dans les GD :

hypothèses

En transfection transitoire, les fusions GRA5-TM CD46-GRA5-HF et GRA5-TM CD46-CD46-HF sont adressées à la fois à la voie des GD et à la surface du parasite au sein d'un même parasite. Ces observations indiquent que l'adressage aux GD est un phénomène saturable, qui pourrait reposer sur des interactions soit de type protéines-protéines, soit protéines-lipides.

I- 2- 1- Solubilisation par interactions protéine-protéines

Chez les eucaryotes et les procaryotes, il existe plusieurs exemples de protéines transmembranaires dont la solubilisation est rendue possible par l'interaction du domaine TM avec un ou des éléments protéiques:

- Certaines protéines transmembranaires sont capables d'adopter une conformation soluble par repliement de leurs hélices hydrophobes à l'intérieur de la structure tertiaire protéique. Ce n'est que lors du contact avec la membrane-cible que la protéine est capable d'exposer ces domaines hydrophobes, par le biais d'un changement de conformation. Les facteurs de ce changement de conformation sont variés : certaines toxines bactériennes comme la toxine

diphthérique ou la colicine se dépliant dans un milieu de pH bas ou par contact avec des lipides négativement chargés (Parker and Pattus, 1993, Facey and Kuhn, 2004), tandis que l'interaction avec le GTP est nécessaire au déploiement de la GTPase Sar1 (Lee *et al.*, 2005). Le mécanisme de repliement de la colicine A est présenté sur la Fig. 28A.

- La formation de complexes de solubilisation peut également permettre d'isoler les domaines hydrophobes du milieu environnant. Des protéines dites chaperonnes sont spécialisées dans le repliement, l'assemblage, le transport et la dégradation de protéines transmembranaires. Par exemple, il a été montré *in vitro* que le complexe chaperonne bactérien GroEL peut solubiliser une protéine intégrale de membrane, la bactériorhodopsine (Deaton *et al.*, 2004) (Fig. 28B).

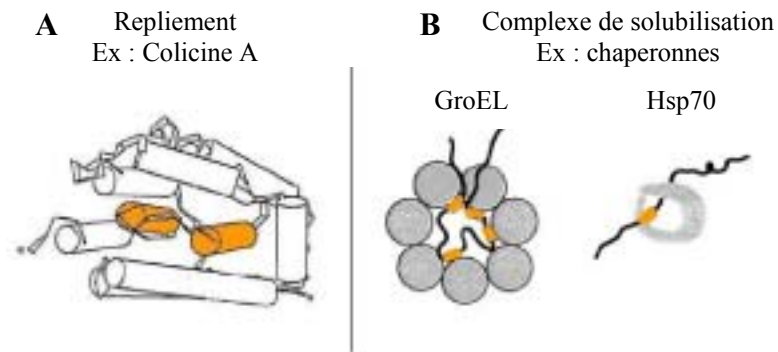


Fig. 28 : Formes de solubilisation de protéines à domaines TM. A- Mécanisme de solubilisation individuelle : repliement des hélices hydrophobes de la colicine A à l'intérieur de la structure tertiaire de la protéine. B- Solubilisation de protéines transmembranaires par les complexes protéiques chaperons bactérien GroEL et eucaryote Hsp70. Les segments hydrophobes sont représentés en orange. D'après Lakey *et al.*, 1992 ; Bukau and Horwich, 1998.

Les protéines GRAs TM sont de petites protéines et les prédictions indiquent que leur domaine Nt est non-structuré. Il semble donc peu vraisemblable que le domaine TM puisse être masqué par repliement à l'intérieur de la structure tertiaire. Par contre, des travaux récents réalisés au sein de notre laboratoire montrent que ces protéines établissent des interactions entre elles au sein des GD, constituant ainsi des complexes de haut poids moléculaire :

Par séparation isopycnique d'extraits solubles parasites, nous avons montré que les protéines GRAs TM (GRA3 à 9) sont retrouvées dans des fractions de haute densité (thèse de P. Ruffiot, juillet 2007).

La séparation des protéines GRAs par exclusion de taille sur colonne superose 6 montre que les protéines GRAs TM sont associées à des complexes de haut poids moléculaire (≥ 670 kDa) (Braun *et al.*, 2007).

La purification d'une forme étiquetée HA-FLAG de GRA5 par chromatographie d'affinité et l'analyse des protéines co-purifiées a permis de montrer qu'à l'intérieur des GD, GRA5 est présent sous forme de multimères et établit des interactions avec GRA3, 6 et 7 (Braun *et al.*, 2007).

GRA5 parasite interagit également avec une protéine de choc thermique, la protéine Tghsp90b (numéro d'accès DQ004747), qui pourrait permettre le masquage du domaine TM hydrophobe de la protéine (Braun *et al.*, 2007).

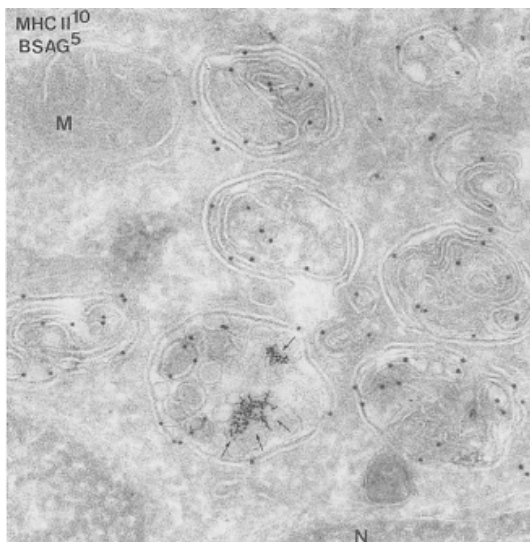
A la lumière de mes résultats de thèse, on pourrait proposer que les interactions présentées ci-dessus reposent sur le domaine TM et/ou le domaine Nt des protéines GRAs TM, ce qui expliquerait l'importance de ces domaines dans l'adressage soluble aux GD.

Chez les eucaryotes supérieurs, l'agrégation des protéines représente un mécanisme de tri vers les granules de sécrétion régulés qui concerne exclusivement les protéines solubles dans la lumière du trans-Golgi. Il semblerait donc que le Toxoplasme ait adapté à ses protéines transmembranaires un processus largement répandu dans l'évolution pour les protéines solubles. Si les GRAs TM forment effectivement des agrégats multiples au sein des GD, il se pourrait que les protéines GRAs solubles ou les protéines indicatrices solubles exprimées dans le parasite soient intégrées dans ces agrégats par interaction avec les GRAs TM, ce qui avait été interprété comme un adressage « par défaut » aux GD (Karsten *et al.*, 1998 ; Striepen *et al.*, 2001). En l'absence des GRAs TM, il se pourrait que l'on observe une délocalisation des GRAs solubles vers la voie de sécrétion constitutive parasite. En ce sens, et malgré les difficultés que cela suppose, l'étude du phénotype d'un mutant $\Delta gra5- \Delta gra3- \Delta gra6- \Delta gra7$ serait particulièrement intéressante.

I- 2- 2- Solubilisation par interactions protéine-lipides

A l'intérieur des GD, les protéines GRAs sont solubilisées *via* des liaisons hydrophobes, phénomène qui a été interprété comme reflétant l'agrégation de ces protéines. L'hypothèse d'une association des GRAs avec des structures lipidiques, trop petites pour être détectées en microscopie électronique, ne peut cependant pas être exclue. Ces structures pourraient correspondre à des microvésicules lipidiques ou à des petits micelles, en partie solubles à 100,000 x g. Chez les mammifères, l'existence de ce type de vésicules a déjà été reportée : les corps multivésiculaires présents dans les lymphocytes B et les cellules dendritiques contiennent des exosomes, petites vésicules lipidiques riches en molécules du CMH II, qui peuvent être exocytés pour permettre la reconnaissance de motifs antigéniques par les lymphocytes T (Fig. 29).

A



B

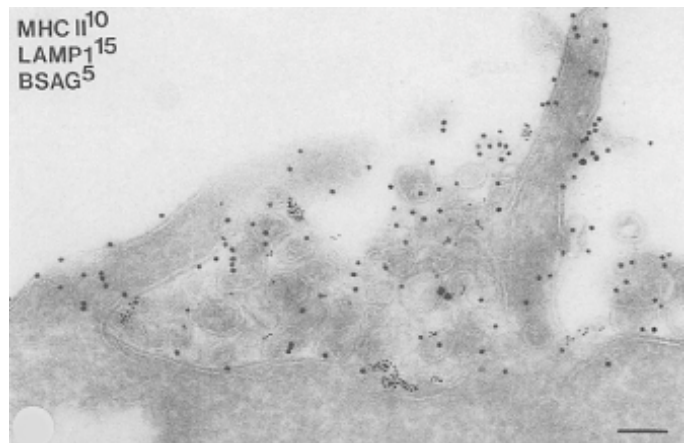


Fig. 29 : A- Corps multivésiculaires présents dans des lymphocytes B. Les flèches indiquent la présence de petites vésicules lipidiques à l'intérieur de ces structures. B- Exocytose des corps multivésiculaires et libération des vésicules à l'extérieur de la cellule. D'après Raposo *et al.*, 1996. Barre 0.1 μ m.

La sensibilité partielle des protéines GRAs parasites à l'urée contredit l'hypothèse de l'insertion stable de ces protéines au sein d'une bicouche lipidique à l'intérieur des GD. Cependant, il se pourrait que l'association lipidique des GRAs soit peu stable au sein de ce

type de vésicules, ce qui expliquerait les profils observés en fractionnement. Un modèle de formation de ces microvésicules est proposé sur la Fig. 30 : les protéines GRAs TM s'insèreraient de façon co-traductionnelle dans la membrane du RE, puis transiteraient à travers l'appareil précoce de sécrétion du parasite par bourgeonnement et fusion de vésicules, jusqu'à la sortie du trans-Golgi. A ce niveau, un mécanisme inconnu permettrait la formation et l'adressage aux GD de microvésicules contenant les GRAs TM, mécanisme qui pourrait impliquer les domaines Nt et/ou TM de ces protéines.

Les différents mécanismes permettant d'expliquer la solubilisation des protéines GRAs au sein des GD sont présentés sur la Fig. 30. Il ne s'agit pour l'instant que de d'hypothèses. En effet, en l'état actuel des données, le compartiment dans lequel s'effectue la ségrégation des protéines transmembranaires destinées à la surface *versus* celles qui sont adressées aux GD n'est pas identifié.

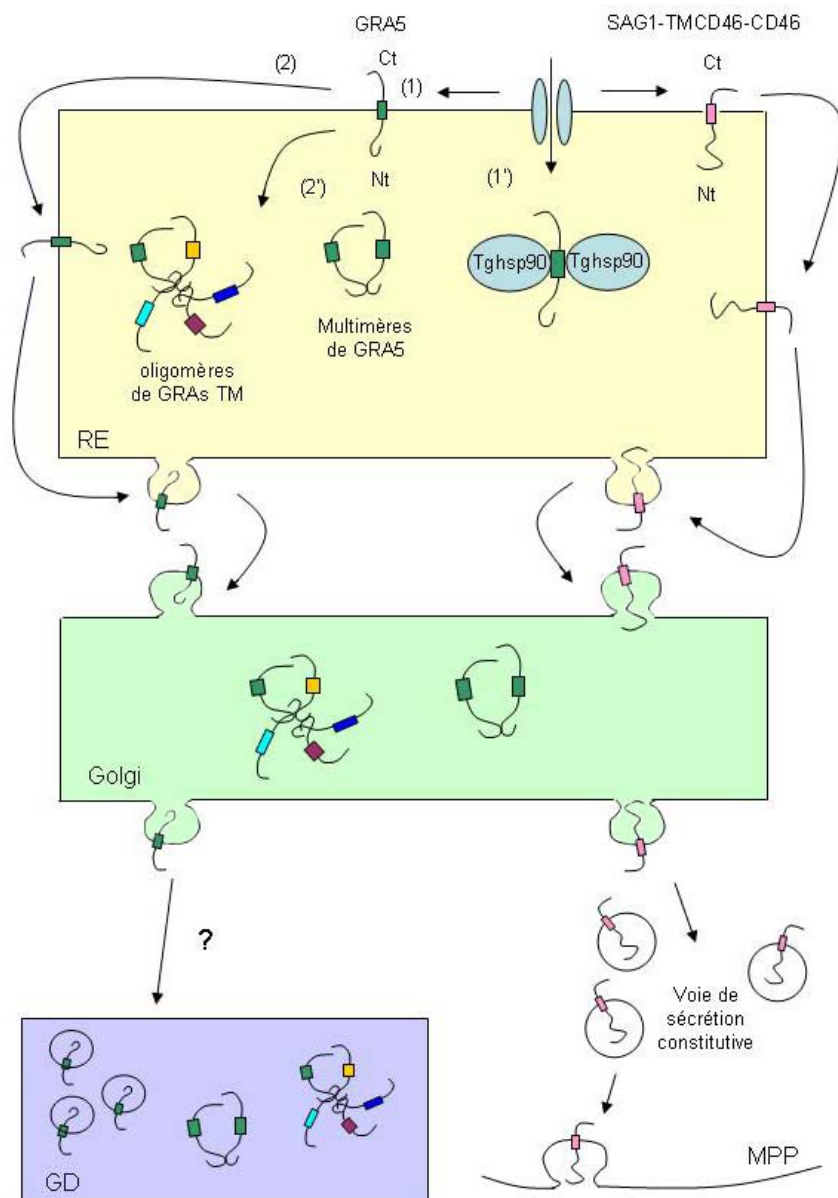


Fig. 30 : Modèles de solubilisation de GRA5 à l'intérieur du parasite. GRA5 entrerait dans la voie de sécrétion par l'intermédiaire d'un appareil de type translocon. En tant que protéine transmembranaire, il est probable qu'elle s'insère de façon co-traductionnelle dans la membrane du RE (1). Son trafic sous forme de protéine transmembranaire pourrait aboutir à la formation de microvésicules lipidiques stockées dans les GD (2). Selon une autre hypothèse, GRA5 serait solubilisée dans la lumière du RE, soit directement après synthèse (1') soit dans un second temps après insertion dans la membrane du RE (2'). Cette solubilisation pourrait s'effectuer par la formation de multimères de GRA5 ou par hétéro-

oligomérisation avec les autres GRAs TM. De plus, l'interaction avec Tghsp90b dans le RE permettrait de masquer le domaine TM de la protéine. A l'opposé, les protéines transmembranaires de la voie de sécrétion constitutive s'insèrent dans la membrane du RE et conservent leur conformation transmembranaire tout au long de la voie de sécrétion, jusqu'à la fusion avec la surface parasitaire. TM, transmembranaire ; Nt, segment N-terminal ; Ct, segment C-terminal ; GD, GD ; RE, réticulum endoplasmique ; MPP, membrane plasmique parasitaire.

III- Adressage spécifique des GRAs TM aux différents systèmes membranaires de la VP

La VP est constituée de plusieurs structures membranaires, et l'adressage spécifique des protéines GRAs à ces différents systèmes pose plusieurs questions non résolues : Par quel mécanisme ces protéines sécrétées présentent-elles une affinité pour les membranes après leur sécrétion ? Pourquoi certaines de ces protéines s'insèrent-elles dans ces membranes alors que d'autres s'y associent *via* des liaisons hydrogène ? Quelle est la base de la spécificité de l'adressage à la MVP *versus* au RNM ?

Nous avons apporté des éléments de réponse à ces questions par l'étude de l'adressage vacuolaire des protéines TM GRA6 et GRA5.

III- 1- Importance du domaine Nt dans ce processus

Suite à leur sécrétion soluble dans la VP, GRA5 et GRA6 adoptent une conformation de protéines transmembranaires dans la MVP et les membranes du RNM, respectivement. Nos résultats démontrent que le domaine Nt de ces deux protéines est nécessaire à leur association aux membranes cibles, puisque les fusions SAG1-TM GRA5-GRA5-HF et SAG1-TM GRA6-GRA6-HF restent solubles dans l'espace vacuolaire. A l'inverse, les fusions GRA5-TM CD46-CD46-HF et GRA6-TM CD46-CD46-HF sont respectivement adressées à la MVP et aux membranes du RNM, ce qui démontre que le domaine Nt de GRA5 ou GRA6 constitue un élément suffisant en soi pour médier l'association membranaire sélectif des protéines dans la VP.

Le mode d'association des fusions GRA5-TM CD46-CD46-HF et GRA6-TM CD46-CD46-HF n'est pas celui de protéines intégrales de membrane. En effet, l'association au HSP de ces deux protéines est partiellement résistante à l'urée seulement, tandis que le traitement du HSP au NP-40 ne solubilise qu'une fraction des protéines. Ces données indiquent que le domaine Nt de GRA5 et GRA6 ne serait pas suffisant pour l'insertion efficace des protéines dans leurs membranes respectives. Ce phénomène nécessiterait en plus la présence du TM et/ou du Ct des protéines GRAs pour se réaliser complètement. En effet, les fusions GRA5-TM CD46-GRA5 et GRA5-TM GRA5-CD46-HF s'insèrent de façon efficace dans la MVP, ce qui montre que le TM et le Ct de CD46 permettent individuellement une intégration membranaire dans le contexte de la protéine GRA5 endogène. On peut donc conclure que c'est la présence simultanée du TM et du Ct de CD46 qui constitue un élément déstabilisateur de l'insertion membranaire.

Les signaux de tri des protéines transmembranaires sont habituellement présents dans la queue Ct des protéines transmembranaires (Bonifacino and Traub, 2003 ; Dikeakos and Reudelhuber, 2007) ou dépendent de caractéristiques de leur domaine TM (Bretscher and Munro, 1993 ; Zaliauskiene *et al.*, 2000). Dans quelques cas, il a été démontré que le domaine Nt des protéines permet l'association spécifique des protéines avec des microdomaines des membranes cellulaires riches en cholestérol, auxquels sont associées la plupart des protéines ancrées par un GPI (rafts lipidiques). Par exemple, le domaine Nt de la protéine prion contient un domaine suffisant pour médier l'association aux rafts d'une version transmembranaire de la protéine (Walmsley *et al.*, 2003). De même, la partie juxtamembranaire de l'ectodomaine de l'EGFR permet la liaison de la protéine aux rafts (Yamabhai *et al.*, 2002). La possibilité que le domaine Nt de GRA5 contienne un tel signal d'adressage aux rafts est particulièrement intéressante quand on considère que la majorité des protéines de l'hôte résidentes de la MVP sont ancrées par un GPI, et donc potentiellement associées à des rafts lipidiques au sein de cette interface. Par liaison à ces domaines, GRA5 pourrait avoir un rôle particulier dans les interactions hôte/parasite.

Quelle est la nature du ou des signal(aux) d'adressage présent(s) dans le domaine Nt de GRA5 et GRA6 ? La recherche d'un signal commun aux domaines Nt de GRA3, 5, 7 et 8 (voir séquences en annexe) a été effectuée par l'utilisation de logiciels de type PSORT (<http://wolfpsort.org/>) ou MEME/BLAST (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>) mais n'a

pas donné de résultats probants. L'existence d'un signal de type séquentiel n'est pas pour autant exclue mais il s'agirait alors d'un signal original, non conservé dans l'évolution. L'autre alternative serait qu'un motif structural soit impliqué dans l'adressage post-sécrétoire des GRAs TM. La structure des protéines GRAs n'a pas pu être étudiée en raison de la difficulté à obtenir une grande quantité de matériel soluble à partir d'extraits parasitaires, et les prédictions de structure indiquent que ces protéines seraient majoritairement « non structurées ». Cependant, l'utilisation du logiciel de prédiction de structures secondaires GOR IV (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) a permis d'identifier la présence putative de petites hélices α contenant des résidus chargés dans les domaines Nt de GRA3, GRA5, GRA7. Or, de telles hélices ont été décrites comme permettant l'association périphérique aux membranes de protéines eucaryotes (Dikeakos *et al.*, 2007). Afin de tester l'hypothèse selon laquelle ces hélices seraient responsables de l'adressage sélectif à la MVP, nous avons délété toute la région impliquée dans la formation de cette hélice putative dans l'ORF de GRA5 (aa 39 à 45). Nous avons également inséré des résidus proline en Nt et Ct de cette région, en espérant briser cette hélice. L'insertion dans la MVP des protéines chimériques obtenues a été testée par perméabilisation de cellules infectées à la digitonine (résultats non montrés). Le marquage de la MVP a été obtenu dans tous les cas avec le mAb anti-GRA5, ce qui montre que la formation de cette courte hélice, si elle est effective, n'est pas impliquée dans les propriétés d'adressage post-sécrétoire de la protéine.

III- 2- Mécanisme(s) de l'insertion membranaire post-sécrétoire :

hypothèses

Certaines protéines membranaires connues échappent à la voie classique d'insertion cotraductionnelle. C'est le cas chez les eucaryotes de plusieurs protéines associées aux membranes des peroxysomes ou des mitochondries, de toxines bactériennes ou de protéines d'enveloppe de virus. Leur insertion membranaire post-traductionnelle est le plus souvent assistée par des cofacteurs protéiques de type translocon (Rayapuram and Subramani, 2006 ; Paschen and Neupert, 2001), mais elle peut également s'effectuer de manière spontanée (Hakansson *et al.*, 1996 ; Gallusser and Kuhn, 1990). En ce qui concerne l'insertion des protéines GRAs TM dans les membranes vacuolaires, l'un ou l'autre de ces mécanismes est

envisageable et sera discuté ci-dessous. L'insertion post-sécrétoire apparente de ces protéines pourrait également résulter de la fusion de microvésicules de transport avec les membranes cibles. Quelque soit le mécanisme impliqué, nos résultats démontrent l'importance du domaine Nt de ces protéines dans ces processus.

Les hypothèses mécanistiques envisagées pour expliquer l'insertion membranaire post-sécrétoire de GRA5 sont résumées sur la Fig. 31 :

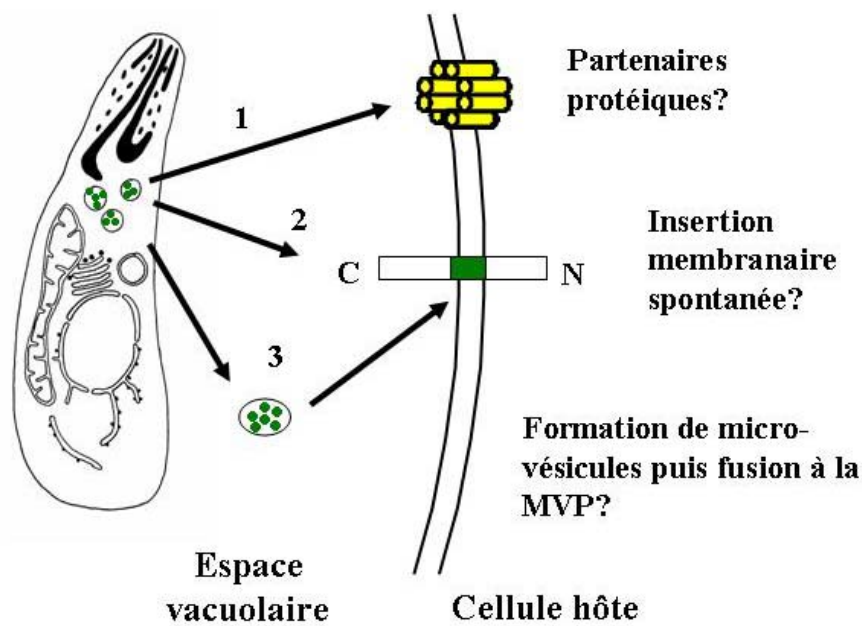


Fig. 31 : Présentation des mécanismes hypothétiques de l'insertion membranaire post-sécrétoire de GRA5. Ce phénomène pourrait reposer sur 1) des interactions de partenaires protéiques spécifiques avec le domaine Nt de GRA5 2) une insertion spontanée dans la MVP facilitée par le domaine Nt ou 3) la formation de microvésicules lipidiques à l'intérieur des GD qui fusionneraient avec la MVP après sécrétion.

III- 2- 1- Interaction du domaine Nt avec des partenaires protéiques

L'acheminement des protéines GRAs TM jusqu'à leur membrane-cible et leur insertion transmembranaire ultérieure pourrait être facilitée par liaison d'un ou de plusieurs facteurs protéiques spécifiques, qui constitueraient un appareil de type translocon. Des résultats récents indiquent que si les protéines GRAs TM établissent de nombreuses interactions entre elles au sein des GD, ces interactions ne sont pas maintenues dans la vacuole (Braun *et al.*, 2007). En effet, par chromatographie d'affinité à partir de la fraction membranaire de vacuoles issues de cellules infectées, on n'identifie qu'un seul partenaire pour GRA5 vacuolaire : GRA7. Cette diminution de l'état d'hétéro-oligomérisation des GRAs TM dans la vacuole pourrait permettre leur association membranaire en démasquant leur domaine TM. Cependant, ce processus à lui seul ne permet pas une insertion efficace des protéines puisque les mutants SAG1-TM GRA5-GRA5-HF et SAG1-TM GRA6-GRA6-HF sont complètement solubles dans l'espace vacuolaire. Il y aurait donc établissement de nouvelles interactions protéiques dans la vacuole qui feraient intervenir le domaine Nt de GRA5 et GRA6 afin de permettre leur insertion membranaire post-sécrétoire. En ce sens, il est intéressant de considérer que la VP constitue un espace enrichi par l'exocytose de nombreuses protéines parasitaires, dont un homologue de la cyclophiline qui pourrait participer au repliement des protéines (Carey *et al.*, 2000).

Des études permettant de comparer les partenaires respectifs des fusions GRA5-TM GRA5-GRA5-HF (insérée dans la MVP) et SAG1-TM GRA5-GRA5-HF (soluble dans la MVP) par chromatographie d'affinité ont été entreprises. Ces deux fusions, qui ne diffèrent que par la nature de leur domaine Nt, devraient présenter des propriétés d'association protéique différentes dans la VP si les interactions du domaine Nt de GRA5 sont bien le facteur déterminant de l'adressage de la protéine. Ces études sont rendues difficiles par la grande quantité de matériel vacuolaire nécessaire à l'analyse des partenaires par séquençage MS/MS.

Les protéines GRAs subissent certaines modifications post-traductionnelles qui pourraient être impliquées dans leur interaction avec des partenaires protéiques spécifiques. La O-glycosylation de GRA2, GRA4 et GRA6 a été démontrée (Achbarou *et al.*, 1991 ; Zinecker *et al.*, 1998 ; Travier *et al.*, non publié), et pourrait constituer une signature permettant le ciblage

spécifique de ces protéines vers les membranes du RNM. En ce qui concerne GRA6, tous les sites de O-glycosylation sont prédits dans le domaine Nt. La glycosylation effective d'un ou plusieurs de ces sites qui permettrait l'interaction avec des partenaires spécifiques dans la VP permettrait d'expliquer l'importance du domaine Nt de GRA6 dans son adressage post-sécrétoire. En plus de leur glycosylation, GRA2 et GRA6 sont phosphorylées après leur sécrétion dans la VP (Mercier and Sibley, non publié ; Labruyère *et al.*, 1999). A l'inverse, GRA1 et GRA5 ne sont pas marquées à l'ATP-[P³²] (Mercier and Sibley, non publié). Des sites de phosphorylation sont prédits dans le domaine Nt de GRA6. La liaison du domaine Nt de GRA6 à des partenaires protéiques spécifiques pourrait donc s'effectuer dans la VP grâce à cette étape de phosphorylation. Parmi les perspectives possibles de ma thèse, on pourrait essayer de muter certains des sites potentiels de glycosylation et de phosphorylation présents dans le domaine Nt de GRA6, et étudier les propriétés d'insertion membranaire des mutants obtenus.

III- 2- 2- Hypothèse de l'insertion spontanée dans les membranes de la VP

Si l'insertion membranaire post-sécrétoire des protéines s'effectue le plus souvent de manière assistée, il existe cependant des cas elle s'effectue de manière spontanée, sans participation d'aucun facteur protéique. Par exemple, une protéine d'enveloppe du phage M13 s'insère dans la membrane interne d'*E. Coli* via des interactions électrostatiques entre deux régions basiques situées aux deux extrémités de la protéine et les lipides membranaires négativement chargés (Gallusser and Kuhn, 1990). Chez *Yersinia*, la protéine YopB, sécrétée par le système sécrétoire de type III de la protéine, s'insère dans la membrane de la cellule-hôte et forme un pore qui permet le transfert d'autres Yops dans le cytoplasme de la cellule-hôte (Hakansson *et al.*, 1996). Les interactions qui permettent ces processus sont propres à chaque cas mais impliquent probablement toutes des changements conformationnels de la protéine.

Les travaux de thèse de P. Ruffiot et L. Travier indiquent que GRA2 purifiée à partir d'un lysat parasite présente une affinité pour les phosphoinositides. Cela avait également été démontré pour GRA7 à partir d'une forme recombinante exprimée chez *E. Coli* (Coppens *et al.*, 2006). Ces données ne concernent pas GRA5 mais laissent supposer que des observations similaires pourraient être réalisées pour cette protéine. Si GRA5 est capable de s'associer à

des lipides, cette propriété ne dépend pas de l'hélice α prédite dans le domaine Nt (cf paragraphe III- 1). Ces affinités spécifiques pour certains lipides pourraient reposer sur le segment Nt de ces protéines et faciliter un mécanisme d'insertion membranaire spontané.

Il serait intéressant de tester l'hypothèse d'une insertion spontanée de GRA5 dans des vésicules lipidiques artificielles, mais il faudrait pour cela disposer d'une forme purifiée de GRA5 qui soit fonctionnelle. Des tentatives de production de GRA5 recombinante en grande quantité chez *E. coli* se sont révélées infructueuses (Braun *et al.*, non publié).

III- 2- 3- Hypothèse de l'association des GRAs dans des microvésicules lipidiques solubles à 100,000 x g

L'hypothèse de l'insertion membranaire post-sécrétoire repose sur l'observation que les GRAs TM sont partiellement solubles à 100,000 x g dans l'espace de la vacuole (Labruyère *et al.*, 1999 ; Lecordier *et al.*, 1999). Cependant, si les protéines GRAs sont associées à l'intérieur des GD à des structures lipidiques de petite taille comme présenté dans le paragraphe I- 2- 2-, il se pourrait que l'exocytose de ces vésicules dans l'espace de la vacuole permette l'acheminement des GRAs TM jusqu'à leur membrane-cible par simple fusion membranaire (Fig.32). Selon ce modèle, une protéine qui s'insérerait dans la membrane du RE avec une topologie de type I conserverait cette topologie tout au long de la voie de sécrétion, jusqu'à la fusion avec les membranes du RNM ou la MVP. Dans ce cas, le domaine Nt de la protéine se retrouverait exposé dans le cytoplasme de la cellule-hôte, tandis que le domaine Ct resterait dans l'espace de la vacuole. Ce modèle est donc compatible avec la topologie observée pour GRA5 en cellules HEK et dans la MVP.

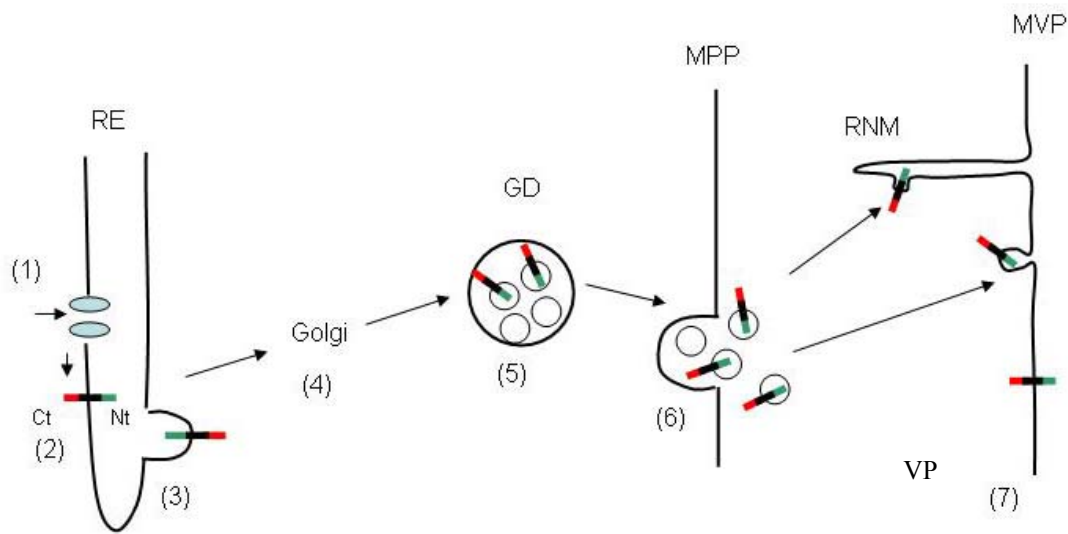


Fig. 32 : Modèle de trafic des GRAs TM par association à des microvésicules de transport. (1) Selon ce modèle, les protéines GRAs TM entrent dans la voie de sécrétion au niveau du RE *via* un appareil de type translocon puis (2) s'insèrent dans la membrane du RE avec une topologie définie. (3) Les microvésicules se forment par bourgeonnement au niveau du RE, transitent par l'appareil de Golgi (4), puis se trouvent stockées à l'intérieur des GD (5). (6) La fusion des GD avec la MPP permet la libération de ces vésicules dans l'espace de la vacuole, qui sont spécifiquement adressées aux membranes du RNM ou à la MVP par fusion membranaire (7). RE, réticulum endoplasmique ; GD, granules denses ; MPP, membrane plasmique du parasite ; RNM, réseau de nanotubules membranaires ; MVP, membrane de la vacuole parasitophore ; VP, vacuole parasitophore.

A l'encontre de cette hypothèse, l'observation par microscopie électronique du matériel sécrété dans la vacuole ne permet pas la mise en évidence de vésicules de transport (de Souza, 2006). De plus, il faudrait imaginer pour expliquer la solubilité apparente des GRAs dans la vacuole que ces structures lipidiques soient suffisamment petites pour être solubles à 100,000 x g après fractionnement de cellules infectées. Pour comparaison, les exosomes identifiés chez les cellules eucaryotes sédimentent à 70,000 x g (Raposo *et al.*, 1996). Si des éléments venaient confirmer l'hypothèse de la fusion de petites vésicules avec les membranes de la VP, il faudrait envisager un rôle particulier du domaine Nt de GRA5 et GRA6 dans l'interaction avec ces petites vésicules et l'adressage aux membranes de la VP.

CONCLUSIONS GENERALES

Dans leur ensemble, nos résultats démontrent que :

- Les propriétés de sécrétion particulières des protéines GRAs sont propres au parasite, et reposent sur des caractéristiques intrinsèques de ces protéines.
- L'adressage soluble de GRA5 à la voie des GD repose non seulement sur la nature de son domaine TM, mais surtout sur un ou des signaux présents dans le domaine Nt.
- L'adressage post-sécrétoire sélectif de GRA5 à la MVP et de GRA6 aux membranes du RNM est déterminé par le domaine Nt de ces protéines.

Ces résultats permettent de compléter les connaissances actuelles quant aux mécanismes de tri existants chez *T. gondii* (Fig. 33). Ils vont à l'encontre de l'idée largement répandue selon laquelle les mécanismes d'adressage des protéines transmembranaires dépendraient de signaux présents dans la queue Ct et/ou de caractéristiques de leur domaine TM. De plus, ils offrent de nouvelles perspectives dans le domaine des interactions protéines-membranes au cours de l'insertion membranaire post-traductionnelle des protéines.

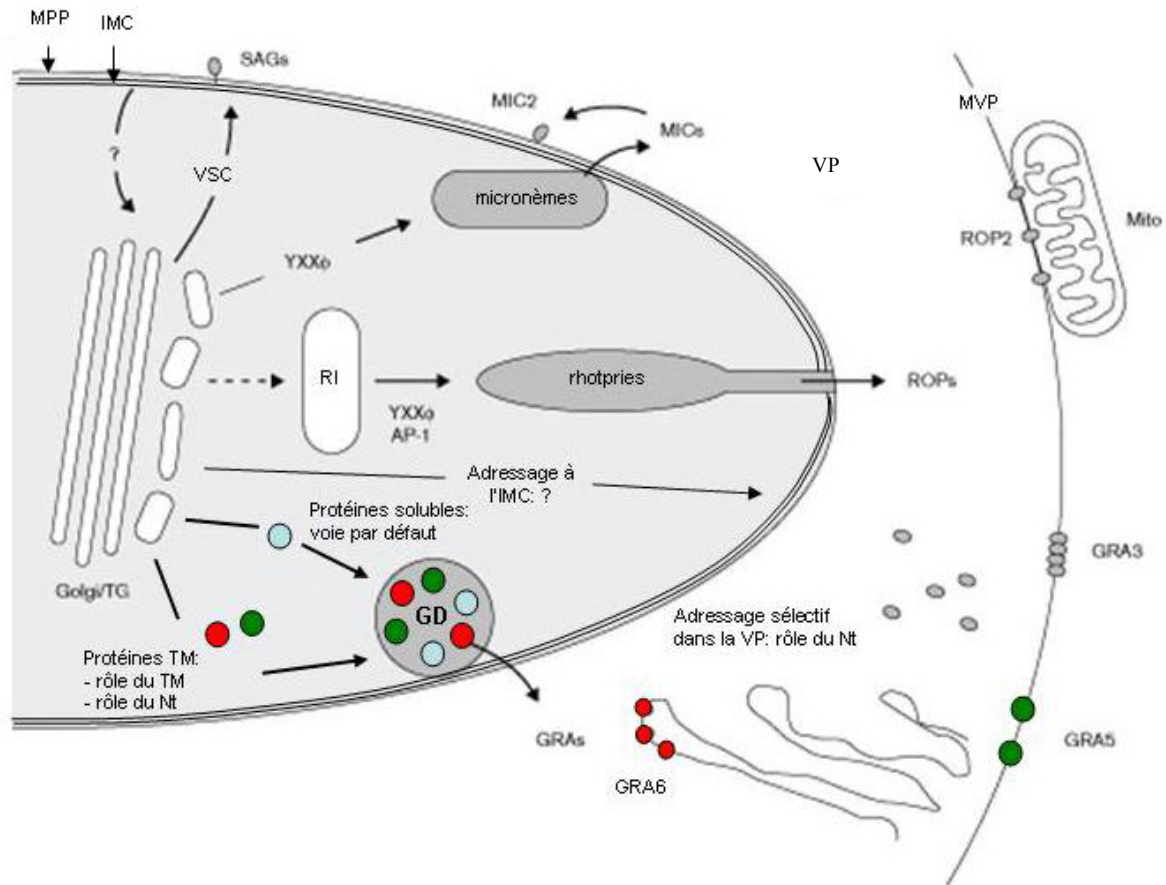


Fig. 33 : Mécanismes de sécrétion connus chez *T. gondii*. Les protéines destinées à être sécrétées sont triées au niveau du trans-Golgi (TG). Celles qui sont destinées à la surface empruntent les vésicules de la voie de sécrétion constitutive (VSC). L'adressage des protéines aux rhoptries (par l'intermédiaire des rhoptries immatures [RI]) et aux micronèmes nécessite la présence de signaux d'adressage de type tyrosine (YXXΦ). Les mécanismes déterminants l'adressage des protéines aux complexe membranaire interne (IMC) sont inconnus. Bien que certaines protéines solubles soient adressées par défaut à la voie des GD, l'adressage des protéines GRAs TM aux GD dépend de signaux présents dans leurs domaines TM et Nt. Après sécrétion, les protéines GRAs TM sont ciblées à leurs compartiments membranaires respectifs sur la base de signaux présents dans le domaine Nt. Adapté à partir de Kaasch and Joiner, 2000.

ANNEXE

Séquence des domaines Nt des protéines GRAs TM (du premier aa après le PS jusqu'au dernier aa avant le TM):

Nt GRA5 :

GSTRD VGSGGDDSEG ARGREQQQVQ QHEQNEDRSL FERGAAVTG HPVRT

Nt GRA3 :

EPVTGVG EAGVSPVNEA GESYSSATSG VQEATAPGAV LLDAIDAESD
KVDNQAEGGE RMKKVEEELS LLRRELYDRT DRPGLKRAVI LSLATSAAIG
GRMVSRTL RD

Nt GRA7 :

ATAS DDELMRIRN SDFFDGQAPV DSLRPTNAGV DSKGTDDHLT TSMDKASVES
QLPRREPLET EPDEQEEVHF RKRGVRSDAE VTDDNIYEEH TDRKVVPRKS
EGKRSFKDLL KKLALPAVGM GASYFAADRL VPELTEEQQR GDEPLTTGQN

Nt GRA8 :

MNGPLSY HPSSYGASYP NPSNPLHGMP KPENPVRPP PGFHPSVIPN PPYPLGTPAG
MPQPEVPLQ HPPPTGSPPA AAPQPPYPVG TPVMPQPEI PVHRPPPPGF
RPEVAPVPPY PVGTPTGMPQ PEIPAVHHPF PYVTTTTTAA PRVLVYKIPY
GGAAPPRAPP VPPRMGPS DI STHVRGAIRR QPGTTTTTTS RK

Nt GRA6 :

AVAADSGGVK QTPSETGSSG GQQEAVGTTE DYVNSSAMGG GQGDSSAEDD
TTSEAAEGDV DFPVLANEG KSEARGPSLE ERIEEQGTRR RYSSVQEPQA
KVPSKRTQKR HR

MATERIEL ET METHODES

I- Techniques de biologie moléculaire

La réalisation de ce projet a nécessité la construction d'un certain nombre de vecteurs plasmidiques en vue de la transfection soit dans les parasites soit dans les cellules de mammifères (tableau II).

Plasmides transfectés dans les parasites	Vecteur de clonage
CD46	pBluescript KS ⁺
CD46-TM CD46-CD46-HF	pMAH14
SAG1-TM CD46-CD46-HF	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
(PS CD46)-GRA5-TM GRA5-GRA5-HF	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
(PS GRA5)-SAG1-TM CD46-CD46-HF	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
SAG1-TM CD46-GRA5-HF	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
SAG1-TM GRA5-GRA5-HF	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
GRA5-TM CD8-GRA5 ^a	pmini/ <i>HXGPRT</i>
GRA5-TM CD46-GRA5	pmini/ <i>HXGPRT</i>
GRA5-TM CD46-GRA5-HF	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
GRA5-TM CD46-CD46-HF	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
SAG1-8aa-TM GRA5-GRA5-HF	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
GRA6-TM CD46-CD46	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
SAG1-TM GRA6-GRA6-HF	pMAH4 5' <i>GRA5</i> 3' <i>GRA5</i>
Plasmides transfectés dans les parasites	Vecteur de clonage
GRA5-H	pcDNA3.1
GRA5-HF	pcDNA3.1
GRA7-H	pcDNA3.1
CD46-H	pcDNA3.1
GRA1-H	pcDNA3.1
MLO2-F ^b	inconnu

Tableau II : Liste des constructions plasmidiques réalisées dans le cadre de ce projet.

^a ce plasmide a été construit au laboratoire par le Dr L.Braun. ^b ce plasmide a été construit par le Dr M. A. Hakimi. PS ; Peptide Signal, TM ; Transmembrane, H ; étiquette HA, F ; étiquette FLAG. Les différents vecteurs utilisés sont décrits ci-dessous.

I-1- Vecteurs utilisés

I-1-1- Vecteurs de clonage

- Vecteur pBluescript KS⁺ (stratagen)
- Vecteur pMAH4 issu d'une matrice pBluescript KS⁺ portant la double étiquette HA-FLAG permettant la réalisation de fusion traductionnelles (Saksouk *et al.*, 2005)
- Vecteur pMAH14 dérivé 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)
- Vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen Life Sciences) qui contient le promoteur du CMV permettant l'expression en cellules de mammifères.

I-1-2- Vecteurs matrices

- Vecteur portant le clone génomique de GRA5 (pUC18/GRA5 ; Lecordier *et al.*, 1993)
- Vecteur portant le clone génomique de GRA6 (pUC18/G1 ; Lecordier *et al.*, 1995)
- Vecteur portant l'ORF de SAG1 (pUC19/p30 clone 28 ; Moleon *et al.*, 1994)
- Vecteur portant l'ORF de CD46 (pKS/CD46, produit pour ce travail à partir d'un mélange d'ADN complémentaires de cellules de type testiculaire et de cellules HeLa)
- Vecteur portant l'ORF de CD8 (pTMI/CD8, don du Dr J. Dubuisson, Institut Pasteur, Lille)
- Vecteur portant l'ORF de GRA1 (Topo/GRA1 produit au laboratoire)
- Vecteur portant l'ORF de GRA7 (pMAH14/GRA7 produit pour ce travail par RT-PCR à partir d'ARN totaux de tachyzoïtes)

I-1-3- Vecteurs de co-transfection

- Vecteur pmini/*HXGPRT* porteur du gène de sélection *HXGPRT* (don de D. Roos ; Donald *et al.*, 1996)
- Vecteur SK⁻/TUB5/bleo/SAG1 (don de D. Soldati)

I-2- Stratégie de clonage

Les amorces utilisées (Tableau III) ont été dessinées à partir des séquences publiées de *GRA5* (Lecordier *et al.*, 1993), *GRA6* (Lecordier *et al.*, 1995), *GRA1* (Cesbron-Delauw *et al.* 1989), *CD8* (Littman *et al.*, 1985), *CD46* (Lublin *et al.*, 1988) et *SAG1* (Nagel *et al.*, 1988). Toutes les constructions réalisées ont été vérifiées par séquençage (Génome express, Meylan, France et GATC-Biotech, Constance, Allemagne). La technique de clonage utilisée repose sur l'hybridation directe des fragments de PCR successifs, ce qui présente l'avantage d'une certaine rapidité puisqu'elle fait intervenir peu d'étapes de clonage intermédiaires. Elle permet également de joindre des fragments de PCR distincts sans introduire d'acides aminés supplémentaires dans la séquence protéique. Cette technique est illustrée dans le cas de GRA5-TM CD46-GRA5 sur la figure 34.

1-2-1- Vecteurs destinés à être transfectés dans les parasites

Le gène *CD46* est d'abord amplifié par PCR à partir d'une banque composée d'un mélange d'ADN complémentaires de cellules de type testiculaire et de cellules HeLa puis cloné dans un vecteur pBluescript KS⁺. Ce plasmide est utilisé comme matrice pour l'amplification de *CD46* avant clonage dans le vecteur pMAH14 dans les sites *SmaI* et *EcoRI*.

Sauf dans le cas de *CD46*, les fusions plasmidiques destinées à être transfectées chez *Toxoplasma* sont clonées sous le contrôle des régions de régulation du gène *GRA5* (promoteur, 5' et 3' NTR).

En ce qui concerne les fusions GRA5-TM CD8-GRA5 et GRA5-TM CD46-GRA5, des fragments spécifiques de *GRA5*, *CD8* ou *CD46* sont amplifiés à partir des plasmides pUC18/G5, pTMI/CD8 ou pKS/CD46 respectivement. Par hybridation des différents fragments PCR amplifiés, on obtient les fragments complets 5' *GRA5*- GRA5-TM CD8-GRA5- 3' *GRA5* et 5' *GRA5* -GRA5-TM CD46-GRA5- 3' *GRA5* qui sont alors clonés dans les sites *BamHI*- *NotI* du vecteur pmini/*HXGPRT* (voir Figure 34 pour GRA5-TM CD46-GRA5). Pour toutes les autres constructions, les régions régulatrices de *GRA5* (promoteur, 5' - et 3'-NTR) sont amplifiées dans un premier temps à partir du clone pUC18/G5 puis clonées dans le vecteur pMAH4. On obtient ainsi le vecteur pMAH4 5'*GRA5* 3'*GRA5*. Les amorces

choisies pour amplifier la région 5'NTR de *GRA5* sont dessinées de façon à inclure le promoteur de *GRA5*, la partie 5'NTR, le codon initiateur et les deux codons adjacents de l'ORF de *GRA5*. Des fragments spécifiques de *GRA5*, *GRA6*, *SAG1* ou *CD46* ORF sont alors

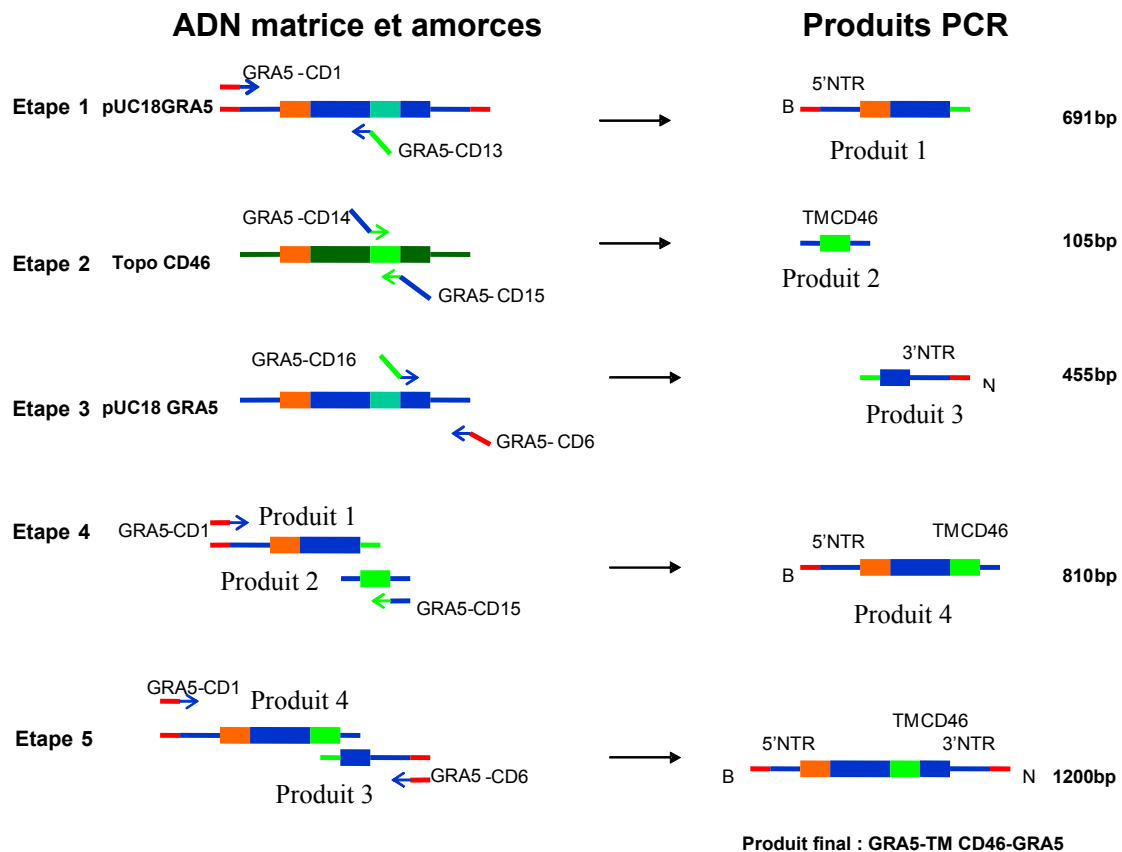


Fig. 34 : Représentation schématique de la construction GRA5-TM CD46-GRA5 par PCR. Les traits épais représentent les régions codantes de *GRA5* ou de *CD46*, tandis que les traits fins correspondent aux régions 5' et 3' NTR. Les amorces ont été dessinées deux à deux pour amplifier le domaine TM de CD46 et les régions codantes de *GRA5* sans son TM (étapes 1-3). Les produits sont alors purifiés par extraction sur gel. Les amorces possèdent des régions complémentaires avec l'extrémité de la portion adjacente d'ADN (les régions de même couleur sont complémentaires), ce qui permet l'hybridation et l'élongation du produit GRA5-TM CD46-GRA5 au cours des étapes 4 et 5.

Les flèches horizontales représentent les régions d'hybridation des amorces, tandis que les bases flottantes sont représentées en diagonale. Des sites de restriction ont été introduits à chaque extrémité de la construction (traits rouges fins). **B**, *Bam*H1; **N**, *Not*I.

amplifiés à partir des vecteurs pUC18/G5, pUC18/G1 *Pst*I, pUC19/p30 clone 28, ou pKS/CD46 respectivement. Les produits d'amplification complets obtenus par hybridation successive des fragments adjacents sont alors clonés dans les sites *Sma*I et *Eco*RI du vecteur pMAH4 5'*GRA5* 3'*GRA5*. De cette façon, toutes les fusions obtenues par cette technique sont clonées en phase d'une part avec le codon initiateur et les deux premiers acides aminés de *GRA5*, et d'autre part avec l'étiquette HA-FLAG C-terminale.

1-2-2- Vecteurs destinés à être transfectés dans les cellules de mammifère

Les regions codantes de *GRA5*, *GRA1* et *CD46* sont clonées en phase avec l'étiquette HA-FLAG C-terminale du vecteur pMAH4. Ces vecteurs servent de matrice à l'amplification de *GRA5*-H, *GRA5*-HF, *GRA1*-H et *CD46*-H. Après clivage par les enzymes *Bam*HI et *Xho*I, les fragments PCR obtenus sont clonés dans le vecteur pcDNA3.1 qui contient le promoteur fort du Cytomegalovirus (CMV), ce qui permet l'expression en cellules de mammifères.

En ce qui concerne le plasmide *GRA7*-H, l'ORF de *GRA7* a d'abord été amplifiée par RT-PCR à partir d'ARN totaux de tachyzoïtes. Le clonage du produit PCR obtenu dans le vecteur pMAH4 permet l'amplification ultérieure de la construction *GRA7*-H avant clonage en pcDNA3.1.

Le vecteur MLO2-F a été produit par le Dr M. A. Hakimi.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce de 5' vers 3'	TM (°C)	Longueur du fragment amplifié (pb)
Constructions à transférer dans le parasite			
CD46-TM CD46-CD46-HF			1165
Amplification de l'ORF complète de CD46:			1298
CD46-R	CGGAATTCGCCACAGTTGCACTCATGAGAG (site <i>EcoRI</i>)	68	
CD46-F	CGGGGTACCTCTGCTTTCCTCCGGAGAAATAAC (site <i>KpnI</i>)	70	
Amplification de CD46 avant clonage dans le vecteur pKS ⁺ modifié :			
CD46-HF1	TCCCCGGGGAGCCTCCCGGCCGCC (site <i>SmaI</i>)	60	
CD46-HF2	CGGAATTCGCCTCTCTGCTCTGCTGG (site <i>EcoRI</i>)	60	
Amplification des parties 5' et 3' NTR de GRA5:			
Amplification du 5' UTR:			884
GRA5-HF1	CGGGATCCTGGTTCTCTTACACGTTGCAA (site <i>BamHI</i>)	58	
GRA5-HF2	TCCCCGGGAGACGCCATTTGTTACTTCAC (site <i>SmaI</i>)	60	
Amplification du 3' NTR:			394
GRA5-HF3	CCCGCTCGAGGGGGCACTGTGTTGCTCG (site <i>XhoI</i>)	60	
GRA5-HF4	GGGGTACCGCGCCTTGTGTGCGAATCA (site <i>KpnI</i>)	60	
SAG1-TM CD46-CD46-HF			1029
Amplification du Nt SAG1:			861
SAG1-HF1	TCCCCGGGTTTCCGAAGGCAGTGAAGGCAGTGAGACGC (site <i>SmaI</i>)	58	
SAG1-HF3	TCACAGCAATGACCCAAACTGCAGCCCCGGCAAATC	60	
Amplification de TM CD46+Ct CD46:			168
CD46-HF16	GAGTTTGCCGGGGCTGCAGTTGGGTCATTGCTGTGATTG	64	
CD46-HF2		60	
(PS CD46)-GRA5-TM GRA5-GRA5-HF			417

Amplification du PS CD46:		125
CD46-HF1		60
CD46-HF14	CTACGTCACGCGTTGAACCTGTTGGTGGCTCCTCAC	54
Amplification de (Δ PS)-GRA5-TM GRA5-GRA5:		292
GRA5-HF14	GTGAGGAGCCACCAACAGGTTCAACGCGTGACGTAG	54
GRA5-HF6	CGGAATTCCTCTTCCTCGGCAACTTCTT (site <i>EcoRI</i>)	60
(PS GRA5)-SAG1-TM CD46-CD46-HF		1035
Amplification de 5'UTR+PS GRA5:		968
GRA5-HF1		58
GRA5-HF13	TCCCCGGGTACGTCACGCGTTGAACC (site <i>SmaI</i>)	56
Amplification de (Δ PS)-SAG1-TM CD46-CD46 from SAG1-TM CD46-CD46-HF:		943
SAG1-HF6	TCCCCGGGTCGGATCCCCCTTCTTGTG (site <i>SmaI</i>)	60
CD46-HF2		60
GRA5-TM GRA5-CD46-HF		330
Amplification du Nt GRA5+TM GRA5:		224
GRA5-HF5	TCCCCGGGGTAAAACGCGTCGTTGTGG (site <i>SmaI</i>)	58
GRA5-HF12	CTTCCTCCTTTGAAGATATCTCAACAATCGCAGTAGTGAC	56
Amplification de Ct CD46:		106
CD46-HF11	GTCACTACTGCGATTGTTGAGATATCTTCAAAGGAGGAAG	58
CD46-HF2		60
SAG1-TM CD46-GRA5-HF		1011
Amplification du Nt SAG1: SAG1-HF1 + SAG1-HF3		861
Amplification du TM CD46: CD46-HF16 + GRA5-CD15		69
Amplification de Ct GRA5:		81
GRA5-CD16	TAATTTGTGTTGTCCCGTACAAAAGGAGGAGGAGAAGACGCG	58
GRA5-HF6		60
SAG1-TM GRA5-GRA5-HF		995
Amplification du Nt SAG1:		861
SAG1-HF1		58
SAG1-HF5	CTGCAGCAAGTCCCCTGCTGCAGCCCCGGCAAATC	60

Amplification de TM GRA5 + Ct GRA5:		134
GRA5-HF16	GAGTTTGCCGGGGCTGCAGCAGTGGGACTTGCTGCAG	62
GRA5-HF6		60
GRA5-TM CD46-GRA5		1208
Amplification du Nt GRA5:		685
GRA5-CD1	CGGGATCCAGCCAGTACTTCAAGATG (site BamHI)	52
GRA5-CD13	CACAGCAATGACCCAAACAGTCCTCACTGGATGTC	52
Amplification du TM CD46:		69
GRA5-CD14	GACATCCAGTGAGGACTGTTTGGGGTCATTGCTGTG	54
GRA5-CD15	CGCGTCTTCTCCTCCTTTTGTACGGGACAACACAAATTA	56
Amplification du Ct GRA5:		454
GRA5-CD16		58
GRA5-CD6	ATAGTTTAGCGGCCGCTTGTGTGCGAATCAGG (site NotI)	48
GRA5-TM CD46-GRA5-HF		1307
Amplification de GRA5-TM CD46-GRA5: GRA5-HF5+GRA5-HF6		
GRA5-TM CD8-GRA5		1219
Amplification du Nt GRA5:		685
GRA5-CD1	CGGGATCCAGCCAGTACTTCAAGATG (site EcoRI)	52
GRA5-CD2	CGCCAGATGTAGATATCAGTCCTCACTGGATGTC	52
Amplification du TM CD8:		80
GRA5-CD3	GACATCCAGTGAGGACTGATATCTACATCTGGGCG	54
GRA5-CD4	CGGTCTTCTCCTCCTTTTGTGGTTGCAGTAAAGGG	52
Amplification du Ct GRA5:		454
GRA5-CD5	CCTTTACTGCAACCACAAAAGGAGGAGAAGACGC	54
GRA5-CD6	ATAGTTTAGCGGCCGCTTGTGTGCGAATCAGG (site NotI)	48
GRA5-TM CD46-CD46-HF		389
Amplification du Nt GRA5: GRA5-HF5+GRA5-CD13		221
Amplification de TM CD46 + Ct CD46: GRA5-CD14 + CD46-HF2		168
SAG1-8aa-TM GRA5-GRA5-HF		1019
Amplification du Nt SAG1:		861
SAG1-HF1		58

SAG1-HF4	CACTGGATGTCCAGTCACTGCAGCCCCGGCAA ACTC	60	
Amplification de 8aa-TM GRA5-Ct GRA5:			158
G5-HF15	GAGTTTGCCGGGGCTGCAGT ACTGGACATCCAGTGAG	62	
G5-HF6		60	
GRA6-TM CD46-CD46-HF			631
Amplification du Nt GRA6:			463
GRA6-HF1	TCCCCGGGG GCACACGGTGGCATCCATC (site <i>SmaI</i>)	62	
GRA6-HF2	CACAGCAATGACCCAAACTCTGTGGCGTTTCTGTGTTC	60	
Amplification de TM CD46 + Ct CD46:			168
CD46-HF19	GAACACAGAAACGCCACAGAGTTTGGGTCATTGCTGTG	54	
CD46-HF2		60	
SAG1-TM GRA6-GRA6-HF			1094
Amplification du Nt SAG1:			861
SAG1-HF1		58	
SAG1-HF9	CACCACAGCACCAATGAGTGCAGCCCCGGCAA ACTC	60	
Amplification de TM GRA6+Ct GRA6:			233
GRA6-HF4	GAGTTTGCCGGGGCTGCACTCATTGGTGCTGTGGTG	56	
GRA6-HF5	CGGAATTCATAATCAAACACATTCACACG (site <i>EcoRI</i>)	56	
Constructions à transférer en cellules HEK			
GRA5-H et GRA5-HF			
Amplification de GRA5:			393
pcG5.2	CGGGATCCCGATTTTCGTGAAGTAACAAAATG (site <i>BamHI</i>)	64	
GRA5-HF6		60	
Amplification de GRA5-H:			429
pcG5.2		64	
CD46-HA4	CCGCTCGAGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG (site <i>XhoI</i>)	66	
Amplification de GRA5-HF:			492
pcG5.2		64	
GRA5-FLAG	CCGCTCGAGTTACTTGTCTGTCATCGTCTTTG (site <i>XhoI</i>)	62	
GRA7-H			
Amplification de GRA7:			926

pcG7.1	CGGGATCC CTGCGGCGTCTCATTTC AAAATG (site <i>Bam</i> HI)	72	
pcG7.2	CCGGAATTC CTGGCGGGCATCCTCCCCATC (site <i>Eco</i> RI)	72	
Amplification de GRA7-H:			962
pcG7.1		72	
pcG7.3	CCCCGGATATC TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG (site <i>Eco</i> RV)	66	
CD46-H			
Amplification de CD46:			1167
CD46-HA3	GGGGTACCTCTTCCGCGCCGCGCATGGAGCCTCCCGGCCGC (site <i>Kpn</i> I)	56	
CD46-HF2		60	
Amplification de CD46-H:			1203
CD46-HA3+CD46-HA4			
GRA1-H			
Amplification de GRA1			569
pcG1-1	CGGGATCC ATGGTGC GTGTGAGCGCTATTG (site <i>Bam</i> HI)	68	
pcG1-2	CCGGAATTC CTCTCTCTCTCTGTTAGGAAC (site <i>Eco</i> RI)	66	
Amplification de GRA1-H: pcG1-1 + CD46-HA4			605

Tableau III : Séquence des amorces utilisées pour les PCR. La longueur de chaque fragment PCR est donnée en paires de bases (pb). La température d'hybridation de chaque réaction de PCR est indiquée (TM). La signification des couleurs utilisées est indiquée ci-dessous :

XYZ : régions d'appariement avec le gène *GRA5*

XYZ : régions d'appariement avec le gène *CD8*

XYZ : régions d'appariement avec le gène *CD46*

XYZ : régions d'appariement avec le gène *SAG1*

XYZ : régions d'appariement avec le gène *GRA6*

XYZ : régions d'appariement avec le gène *GRA1*

XYZ : régions d'appariement avec le gène *GRA7*

XYZ : Sites de restriction incorporés dans les amorces.

II- Techniques de biologie cellulaire

II-1 Culture des parasites et des cellules

T. gondii est un parasite intracellulaire obligatoire qui en laboratoire peut être propagé sous sa forme proliférative tachyzoïte, par passages successifs en cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts, ATCC-CRL 1634) ou HeLa (Human Epithelial cells ; ATCC-CLL 2). Ces cellules sont cultivées à 37°C, sous 5% CO₂, en milieu D10 : Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM, GibcoBRL), additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de glutamine, 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/µL de streptomycine. Lorsque le tapis cellulaire est confluent, les parasites sont déposés à raison d'un parasite par cellule. La culture est maintenue jusqu'à la lyse des cellules. Les souches de parasites utilisées sont les suivantes :

- RH, ATCC-50174 (Frenkel, 1953)
- RH *hxgprt* (Donald *et al.*, 1996)
- Δ*gra5* (RH *hxgprt*) (Mercier *et al.*, 2001)
- Δ*gra6* (RH *hxgprt*) (Mercier *et al.*, 2002)
- Δ*sag1* (Rachinel *et al.*, 2004)
- Δ*gra5*+GRA5-HF c128 (Braun *et al.*, 2007)

Les cellules HEK 293-T (ATCC-CRL 11268) sont également maintenues en D10.

II-2- Transfection, sélection et clonage de *T. gondii*

II-2-1- Transfection des parasites

La transfection est réalisée dans les parasites extracellulaires, filtrés à l'aide d'une membrane nucléopore de 3 µm de diamètre, centrifugés et lavés en cytomix (un milieu dont la composition est proche de celle du cytosol). Après comptage en hématimètre de Thomas, 8.10⁷ parasites sont mis en présence de 75 µg de l'ADN plasmidique 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 2000V, 50 µF, 25 Ω, à l'aide de l'électroporateur ECM 630 (BTX), puis mis en culture sur un tapis cellulaire de HFF (Soldati and Boothroyd, 1993). Pour analyser l'expression transitoire des protéines, les parasites sont cultivés sur des lamelles

recouvertes de cellules HFF pendant 24 h à 37°C, 5% CO₂ avant analyse par immunofluorescence. Les transfections réalisées dans les différentes souches parasitaires sont répertoriées dans le tableau IV.

II-2-2- sélection et obtention de transformants stables

En vue d'obtenir des transformants stables, les parasites sont cultivés sans pression sélective pendant 2 jours, puis ceux qui ont intégré le plasmide portant les gènes de résistance sont sélectionnés par application de la drogue appropriée. Dans les cas de co-transfection, l'incorporation de ce plasmide est moins probable que celle du plasmide d'intérêt, ce qui permet de sélectionner par cette méthode les parasites qui ont également intégré le plasmide d'intérêt.

- Les parasites dérivés de la souche $\Delta sag1$ sont sélectionnés par la phléomycine après co-transfection du plasmide SK⁻/TUB5/bleo/SAG1. Le gène bleo, issu du transposon 5 bactérien, permet de résister à la phléomycine qui est un intercalant létal de l'ADN (Messina *et al.*, 1995). La sélection est réalisée lors du traitement des parasites extracellulaires repris à 10⁷ toxoplasmes/mL dans 50 µg/mL de phléomycine. Cette sélection s'opère lors de trois passages successifs.

Plasmide portant le gène d'intérêt	Plasmide co-transfecté	Souche parasitaire transfectée	sélection
CD46-TM CD46-CD46-HF	pmini/ <i>HXGPRT</i>	RH <i>hxgprt</i>	Acide mycophénolique+xanthine
SAG1-TM CD46-CD46-HF	SK ⁻ /TUB5/bleo/SAG1	Δ <i>sagl</i>	Phléomycine
(PS CD46)-GRA5-TM GRA5-GRA5-HF	-	Δ <i>gra5</i> (RH <i>hxgprt</i> ⁻)	-
(PS GRA5)-SAG1-TM CD46-CD46-HF	-	Δ <i>sagl</i>	-
GRA5-TM GRA5-CD46-HF	pmini/ <i>HXGPRT</i>	Δ <i>gra5</i> (RH <i>hxgprt</i> ⁻)	Acide mycophénolique+xanthine
SAG1-TM CD46-GRA5-HF	SK ⁻ /TUB5/bleo/SAG1	Δ <i>sagl</i>	Phléomycine
SAG1-TM GRA5-GRA5-HF	SK ⁻ /TUB5/bleo/SAG1	Δ <i>sagl</i>	Phléomycine
GRA5-TM CD46-GRA5*	-	Δ <i>gra5</i> (RH <i>hxgprt</i> ⁻)	Acide mycophénolique+xanthine
GRA5-TM CD8-GRA5*	-	Δ <i>gra5</i> (RH <i>hxgprt</i> ⁻)	Acide mycophénolique+xanthine
GRA5-TM CD46-GRA5-HF	-	Δ <i>gra5</i> (RH <i>hxgprt</i> ⁻)	-
GRA5-TM CD46-CD46-HF	pmini/ <i>HXGPRT</i>	Δ <i>gra5</i> (RH <i>hxgprt</i> ⁻)	Acide mycophénolique+xanthine
SAG1-8aa-TM GRA5-GRA5-HF	SK ⁻ /TUB5/bleo/SAG1	Δ <i>sagl</i>	Phléomycine
GRA6-TM CD46-CD46-HF	pmini/ <i>HXGPRT</i>	Δ <i>gra6</i> (RH <i>hxgprt</i> ⁻)	Acide mycophénolique+xanthine
SAG1-TM GRA6-GRA6-HF	SK ⁻ /TUB5/bleo/SAG1	Δ <i>sagl</i>	Phléomycine

Tableau IV : Souches recombinantes parasitaires construites. Pour certaines souches, l'expression transitoire des protéines est étudiée (cas indiqués par l'absence de sélection). La sélection des parasites permet l'obtention de lignées stables. Cette sélection est permise par la co-transfection d'un plasmide porteur d'un gène de résistance à la drogue utilisée, ou par l'intégration directe sur le plasmide transfecté de ce gène (cas indiqués par une astérisque).

- Les parasites dérivés des souches RH *hxgprt*⁻, Δ *gra5* (RH *hxgprt*⁻) et Δ *gra6* (RH *hxgprt*⁻) sont sélectionnés grâce à la co-transfection du plasmide pmini/*HXGPRT* sous l'action conjuguée de la xanthine à 50 µg/mL et de l'acide mycophénolique à 25 µg/mL (Donald *et al.*, 1996). En effet, ces parasites sont incapables d'exprimer l'enzyme hypoxanthine-xanthine-phosphoribosyl-transférase (*HXGPRT*), qui est impliquée dans le métabolisme des purines. En présence d'acide mycophénolique, seuls les parasites qui ont intégré un plasmide contenant le gène *HXGPRT* sont capables de survivre en synthétisant les purines à partir de la xanthine (Figure 35).

La pression de sélection est maintenue dans le milieu de culture jusqu'au clonage.

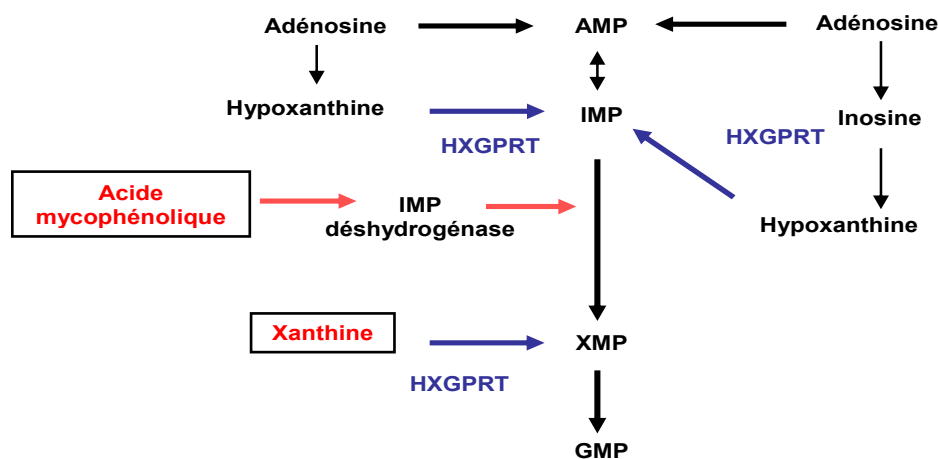


Fig. 35 : Métabolisme des purines chez *T. gondii*. La sélection des parasites transfectés fait appel au système xanthine-acide mycophénolique. L'acide mycophénolique bloque la seule voie de production de GMP chez les parasites délétés pour le gène *HXGPRT*. Les parasites ayant acquis une copie exogène du gène sont capables de synthétiser les purines à partir de la xanthine fournie dans le milieu. AMP, adénosine monophosphate ; GMP, guanosine monophosphate ; XMP, xanthine monophosphate ; *HXGPRT*, Hypoxanthine xanthine guanine phosphoribosyl transférase.

II-2-3- Clonage des parasites sélectionnés

Les parasites sélectionnés sont centrifugés, comptés, repris à 10^8 toxoplasmes/mL en DMEM et dilués par entraînement afin d'obtenir 1 ou 2 parasites par puits dans des plaques de 96

puits contenant des cellules HFF confluentes. Les plaques sont incubées pendant 5 jours puis observées à faible grossissement (x2,5) de façon à sélectionner les puits où il ne s'est développé qu'une seule plage de lyse. Quand les plages de lyse se sont suffisamment développées, les clones sont transférés en plaques de 24 puits et amplifiés. Un schéma représentant les différentes étapes de la transfection jusqu'à l'obtention de transformants stables est proposé sur la figure 36.

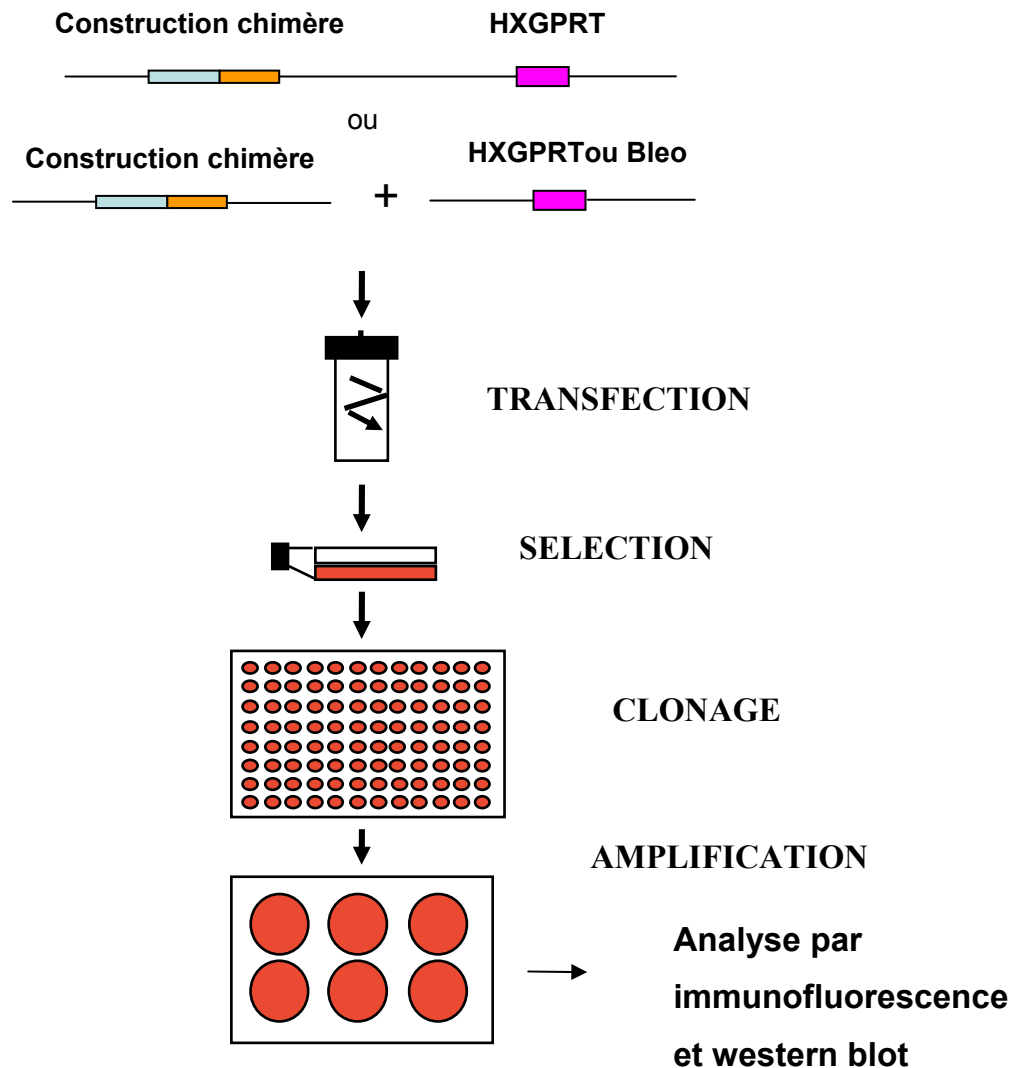


Fig. 36: Transfection de *T.gondii*. Des tachyzoïtes HX^r sont transfectés par électroporation et utilisés pour infecter des cellules HFF en culture. En présence de la drogue appropriée, les parasites qui ne possèdent pas le gène de résistance sont éliminés. Les toxoplasmes transfectés sont clonés par dilution limite en plaques 96 puits puis amplifiés en plaques 24 puits avant analyse.

II-3- Transfection transitoire des cellules de mammifères HEK 293-T

L'expression de GRA5, GRA7 et GRA1 dans les cellules de mammifères a été étudiée dans les cellules HEK 293-T (Human Embryonic Kidney). Après traitement à la trypsine 0,01%, les cellules sont resuspendues en milieu complet. Pour les analyses par immunofluorescence, les cellules sont déposées dans des plaques de 24 puits préalablement traitées à la polyornithine 2.5 µg/mL (afin de favoriser l'adhérence des cellules dans les puits). Après 24h de culture à 37°C sous 5% CO₂, les cellules sont transfectées avec 1.25 µg d'ADN par la méthode de précipitation au calcium-phosphate (Sambrook and Russell, 2001). Les cellules sont fixées 36 h après. Pour les analyses biochimiques effectuées à partir des HEK, les cellules sont mises à pousser dans des bouteilles de 180 cm². La transfection s'effectue par la même méthode et le profil de solubilité des protéines est analysé par fractionnement cellulaire comme décrit ci-dessous.

III- Analyse de l'expression des protéines chimères

III-1- Analyses informatiques

Les logiciels TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) et TMPRED (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) disponibles à partir du serveur ExPasy proteomics ont été utilisés pour prédire la topologie des protéines GRA dans les cellules HEK 293-T.

Les scores d'hydrophobicité de différents domaines TM ont été calculés à partir de l'échelle de Kyte et Doolittle (<http://gcat.davidson.edu/rakarnik/aminoacidscores.htm>).

La recherche de signaux d'adressage présents dans la séquence des protéines GRAs a été effectuée par utilisation des programmes PSORT (<http://wolfsort.org/>) et MEME/BLAST (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>). Les structures secondaires des protéines GRAs ont été prédites entre autres par utilisation du logiciel de prédiction GOR IV (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html).

III-2- Immunofluorescence (IF)

Des cellules HFF sont cultivées jusqu'à confluence sur des lamelles de verre en plaques 24 puits et infectées par une suspension parasitaire pendant une nuit, puis fixées au formaldéhyde 5% pendant 20 min. La perméabilisation des cellules est nécessaire pour permettre le marquage des différentes structures. Le traitement au triton X-100 0,1% conduit à une perméabilisation totale de la cellule infectée, tandis que la saponine 0,002% permet une perméabilisation sélective de la membrane de la cellule hôte et de la membrane vacuolaire (Sibley *et al.*, 1995). L'effet de la saponine étant réversible, elle doit être maintenue pendant tout le processus de marquage. Les parasites extracellulaires sont fixés après adhésion pendant 30 min à 37 °C sur des lamelles de HFF, puis perméabilisés au triton X-100 0.1%. Les lamelles de cellules HEK 293-T sont soit perméabilisées au triton X-100 0.1% soit traitées directement, sans fixation ni perméabilisation, dans le cadre des études de topologie.

Les lamelles sont ensuite saturées en SVF 5% et sérum de chèvre 5%. La protéine recherchée est détectée par incubation des lamelles avec un anticorps primaire spécifique puis avec un anticorps secondaire de chèvre de type Alexa (Invitrogen, Molecular Probes) (tableau 4). Les lamelles sont montées sur lame à l'aide du kit Prolong Antifade (Molecular Probes) et observées en épifluorescence au grossissement x100 à l'aide d'un microscope Axioplan 2 (Zeiss). Les photographies sont réalisées à l'aide d'une caméra AxioCam MRm (Zeiss) couplée au logiciel d'acquisition axiovision 4.5, et traitées grâce au logiciel Adobe photoshop 6.0.

III-3- Techniques de fractionnement cellulaire

III-3-1- Fractionnement cellulaire de parasites extracellulaires

Afin d'analyser les propriétés biochimiques des protéines fusion à l'intérieur du parasite, des parasites extracellulaires sont traités comme décrit précédemment (Lecordier *et al.*, 1999). Les parasites obtenus par lyse de cellules Hela sont comptés, puis resuspendus en PBS sans calcium et magnésium contenant 1 mM d'EGTA et des inhibiteurs de protéases, (« Protease Inhibitor Cocktail », Roche Diagnostics) pour obtenir une concentration d'environ 10^8 parasites.mL⁻¹. Les parasites sont lysés par trois cycles de congélation/décongélation (azote

liquide/bain-marie à 37°C). Une extraction au triton (Bordier, 1981) est réalisée sur une partie du lysat parasitaire obtenu afin de séparer la fraction insoluble (I) de la phase détergent (D) et de la phase aqueuse (A). Le reste du lysat parasitaire est centrifugé 10 min à basse vitesse à 4°C, ce qui permet l'obtention du LSP (Low speed Pellet). Le surnageant obtenu (LSS ; Low Speed Supernatant) est divisé en fraction soluble (HSS ; High Speed Supernatant) et insoluble (HSP ; High Speed Pellet) par une centrifugation à haute vitesse (1.5 h à 100000 x g à 4°C). Pour analyser les protéines non relarguées par le cycle de congélation/décongélation, la fraction LSP contenant les débris parasitaires est resuspendue en Tris 50 mM [pH 8.0] et traitée avec différents agents dénaturants (urée 6 M, Nonidet P-40 [NP-40] 1%) pendant 30 min à 4 °C. Les fractions solubles et membranaires sont ensuite séparées par centrifugation à haute-vitesse (1.5 h à 100000 x g à 4°C). Les différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE puis immunoblot.

III-3-2- Fractionnement de cellules infectées

Les formes vacuolaires des protéines de fusion sont analysées à partir de cellules HFF infectées sur la nuit comme décrit précédemment (Sibley *et al.*, 1995). Les cellules sont lavées en PBS afin d'éliminer les parasites extracellulaires, puis décollées mécaniquement à l'aide d'un grattoir. Après lyse des cellules par passage à travers une aiguille 27 g, les parasites intacts et les déchets cellulaires sont éliminés par centrifugation à 2500 x g pendant 10 min. La fraction soluble vacuolaire (HSS pour High Speed Supernatant) est séparée de la fraction membranaire (HSP pour high Speed Pellet) par ultracentrifugation à 100,000 x g. Dans certains cas, les protéines fusions sont trouvées associées à cette fraction membranaire. La nature de cette association est alors déterminée par traitement du HSP à l'urée 6 M et au NP-40 0.1% pendant 30 min à 4°C. Les protéines solubilisées par ces traitements (S) sont séparés des résidus membranaires (P) au cours d'une deuxième étape d'ultracentrifugation.

III-3-3- Fractionnement des cellules HEK 293-T

Afin d'analyser les propriétés de solubilité des protéines GRA en cellules de mammifères, la procédure de fractionnement des cellules infectées a été adaptée aux cellules HEK. Les cellules sont collectées 36 h après transfection, resuspendues en PBS, et lysées par passage à travers une seringue 22 g. Après élimination des noyaux et des débris cellulaires par centrifugation 10 min à 1000 x g, le surnageant est centrifugé pendant 30 min à 130,000 x g. On obtient ainsi une fraction ultrasoluble (HSS) et un culot membranaire obtenu (HSP) qui est

resuspendu en PBS et traité par différents agents (NaCl 1M, carbonate de sodium 0.1 M [pH 11.3], urée 6 M ou NP-40 1%). Après une incubation de 30 min sur la glace, les échantillons sont centrifugés à 130,000 x g pendant 30 min pour séparer les protéines solubilisées (S) des résidus (P).

Dans toutes les expériences de fractionnements présentées, les surnageants obtenus après traitement au tris, à l'urée ou au carbonate de sodium sont précipités à l'acide trichloracétique 1 % alors que les surnageants obtenus après traitement au NaCl ou au NP-40 sont précipités par deux volumes d'acétone. Ces expériences ont été répétées trois fois pour vérifier la reproductibilité des résultats.

III-4- Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE et détection des protéines par immunoblot

Les culots protéiques obtenus sont resuspendus dans un tampon dénaturant (Laemmli, 1970) puis dénaturés 5 min à 90°C. Les échantillons sont alors séparés sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (13% d'acrylamide). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, Amersham). La membrane est saturée dans une solution de lait à 5% en PBS, puis les protéines sont mises en évidence par incubation avec un anticorps primaire spécifique (tableau V) suivie par une autre incubation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Jackson Immuno Research) (tableau VI). La révélation est réalisée par chimioluminescence (Pierce Chemical, Rockford, IL).

Type d'anticorps	Anticorps	Cible	PM apparent (kDa)	Dilution IF	Dilution immunoblot	Référence
Anticorps monoclonaux	TG17-113	GRA5	21	1/500	1/5000	Charif <i>et al.</i> , 1990
	TG 05-54	SAG1	30	1/500	-	Rodriguez <i>et al.</i> , 1985
	TG17-43	GRA1	27	-	1/20000	Charif <i>et al.</i> , 1990
	TG 17-179	GRA2	28	1/500	-	Charif <i>et al.</i> , 1990
	TG2H11-D1	GRA3	30	-	1/10000	Achbarou <i>et al.</i> , 1991
	BATO214	GRA7	29	1/500	-	Jacobs <i>et al.</i> , 1998
	Bio M2 anti-FLAG	Etiquette FLAG	-	1/500	1/1000	Sigma-Aldrich
	TRA2-10	CD46	80	1/500	-	Andrews <i>et al.</i> , 1985
Anticorps polyclonaux	Sérum de lapin	GRA3	30	1/500	-	Don de JF Dubremetz
	Sérum de lapin	GRA6	32	1/500	1/10000	Labruyère <i>et al.</i> , 1999
	Sérum de souris	GRA5	21	1/500	-	Lecordier <i>et al.</i> , 1999
	Sérum de lapin	Etiquette HA	-	1/1000	1/3000	Produit au LAPM par le Dr M. A. Hakimi
	Sérum de lapin	CD46	80	-	1/7000	Liszewski <i>et al.</i> , 1996

Tableau V : Liste des anticorps primaires utilisés. IF, Immunofluorescence ; PM, Poids moléculaire ; -, non appliqué.

Anticorps	Type d'anticorps	Dilution IF	Dilution immunoblot	Provenance
Alexa Fluor [®] 488-sérum de chèvre	anti-IgG (H+L) de souris	1/500	-	Molecular Probes
Alexa Fluor [®] 594- sérum de chèvre	anti-IgG (H+L) de lapin	1/500	-	Molecular Probes
Alexa Fluor [®] 488-sérum de chèvre	anti-IgG (H+L) de lapin	1/500	-	Molecular Probes
Alexa Fluor [®] 594- sérum de chèvre	anti-IgG (H+L) de souris	1/500	-	Molecular Probes
Sérum de chèvre-péroxydase	anti-IgG (H+L) de souris	-	1/10000	Jackson Immuno Research
Sérum de chèvre-péroxydase	anti-IgG (H+L) de lapin	-	1/15000	Jackson Immuno Research

Tableau VI : Liste des anticorps secondaires utilisés. IF, immunofluorescence ; -, non appliqué.

BIBLIOGRAPHIE

- Achbarou, A., O. Mercereau-Puijalon, A. Sadak, B. Fortier, M. A. Leriche, D. Camus and J. F. Dubremetz (1991). "Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*." Parasitology **103 Pt 3**: 321-9.
- Adjogble, K. D., C. Mercier, J. F. Dubremetz, C. Hucke, C. R. Mackenzie, M. F. Cesbron-Delauw and W. Daubener (2004). "GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes." Int J Parasitol **34**(11): 1255-64.
- Ahn, H. J., S. Kim and H. W. Nam (2005). "Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*." Biochem Biophys Res Commun **331**(2): 614-20.
- Aikawa, M., L. H. Miller, J. Johnson and J. Rabbege (1978). "Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite." J Cell Biol **77**(1): 72-82.
- Ajioka, J. W., J. C. Boothroyd, B. P. Brunk, A. Hehl, L. Hillier, I. D. Manger, M. Marra, G. C. Overton, D. S. Roos, K. L. Wan, R. Waterston and L. D. Sibley (1998). "Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa." Genome Res **8**(1): 18-28.
- Ajzenberg, D., A. L. Banuls, C. Su, A. Dumetre, M. Demar, B. Carme and M. L. Darde (2004). "Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **34**(10): 1185-96.
- Alexander, D. L., J. Mital, G. E. Ward, P. Bradley and J. C. Boothroyd (2005). "Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles." PLoS Pathog **1**(2): e17.
- Andrews, P. W., B. B. Knowles, M. Parkar, B. Pym, K. Stanley and P. N. Goodfellow (1985). "A human cell-surface antigen defined by a monoclonal antibody and controlled by a gene on human chromosome 1." Ann Hum Genet **49**(Pt 1): 31-9.
- Antoine, J. C., E. Prina, T. Lang and N. Courret (1998). "The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages." Trends Microbiol **6**(10): 392-401.

- Arvan, P. and D. Castle (1998). "Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward." Biochem J **332** (Pt 3): 593-610.
- Asai, T., S. Miura, L. D. Sibley, H. Okabayashi and T. Takeuchi (1995). "Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **270**(19): 11391-7.
- Baldi, D. L., K. T. Andrews, R. F. Waller, D. S. Roos, R. F. Howard, B. S. Crabb and A. F. Cowman (2000). "RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Embo J **19**(11): 2435-43.
- Ballard, L. L., N. S. Bora, G. H. Yu, and J. P. Atkinson (1987). Biosynthesis and glycosylation of membrane cofactor protein (MCP or gp-45-70). Fed Proc **46**:773.
- Beckers, C. J., J. F. Dubremetz, O. Mercereau-Puijalon and K. A. Joiner (1994). "The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm." J Cell Biol **127**(4): 947-61.
- Bermudes, D., J. F. Dubremetz, A. Achbarou and K. A. Joiner (1994a). "Cloning of a cDNA encoding the dense granule protein GRA3 from *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **68**(2): 247-57.
- Bermudes, D., K. R. Peck, M. A. Afifi, C. J. Beckers and K. A. Joiner (1994b). "Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **269**(46): 29252-60.
- Binder, E. M. and K. Kim (2004). "Location, location, location: trafficking and function of secreted proteases of *Toxoplasma* and *Plasmodium*." Traffic **5**(12): 914-24.
- Bisanz, C., O. Bastien, D. Grando, J. Jouhet, E. Marechal and M. F. Cesbron-Delauw (2006). "*Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors." Biochem J **394**(Pt 1): 197-205.
- Black, M. W. and J. C. Boothroyd (2000). "Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*." Microbiol Mol Biol Rev **64**(3): 607-23.
- Blackman, M. J. and L. H. Bannister (2001). "Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation." Mol Biochem Parasitol **117**(1): 11-25.
- Blader, I. J., I. D. Manger and J. C. Boothroyd (2001). "Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells." J Biol Chem **276**(26): 24223-31.

- Bonhomme, A., G. T. Maine, A. Beorchia, H. Burlet, D. Aubert, I. Villena, J. Hunt, L. Chovan, L. Howard, S. Brojanac, M. Sheu, J. Tyner, M. Pluot and J. M. Pinon (1998). "Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*." J Histochem Cytochem **46**(12): 1411-22.
- Bonifacino, J. S., P. Cosson, N. Shah and R. D. Klausner (1991). "Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum." Embo J **10**(10): 2783-93.
- Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annu Rev Biochem **72**: 395-447.
- Bordier, C. (1981). "Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution." J Biol Chem **256**(4): 1604-7.
- Bradley, P. J. and J. C. Boothroyd (1999). "Identification of the pro-mature processing site of *Toxoplasma* ROP1 by mass spectrometry." Mol Biochem Parasitol **100**(1): 103-9.
- Bradley, P. J. and J. C. Boothroyd (2001). "The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal." Int J Parasitol **31**(11): 1177-86.
- Bradley, P. J., C. Ward, S. J. Cheng, D. L. Alexander, S. Collier, G. H. Coombs, J. D. Dunn, D. J. Ferguson, S. J. Sanderson, J. M. Wastling and J. C. Boothroyd (2005). "Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **280**(40): 34245-58.
- Braun, L., L. Travier, S. Kieffer, K. Musset, J. Garin, C. Mercier, and M. F. Cesbron-Delauw. Purification of *Toxoplasma* dense granule proteins reveals that they are in complexes throughout the secretory pathway. Mol and Biochem Parasitol *In press*.
- Bretscher, M. S. and S. Munro (1993). "Cholesterol and the Golgi apparatus." Science **261**(5126): 1280-1.
- Brossier, F., T. J. Jewett, J. L. Lovett and L. D. Sibley (2003). "C-terminal processing of the *toxoplasma* protein MIC2 is essential for invasion into host cells." J Biol Chem **278**(8): 6229-34.
- Brossier, F. and L. David Sibley (2005). "*Toxoplasma gondii*: microneme protein MIC2." Int J Biochem Cell Biol **37**(11): 2266-72.
- Brossier, F., T. J. Jewett, L. D. Sibley and S. Urban (2005). "A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4146-51.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." Cell **92**(3): 351-66.

- Buxton, D. (1998). "Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances." Vet Res **29**(3-4): 289-310.
- Buxton, D. and E. A. Innes (1995). "A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis." Parasitology **110** Suppl: S11-6.
- Carey, K. L., C. G. Donahue and G. E. Ward (2000). "Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **105**(1): 25-37.
- Carey, K. L., A. M. Jongco, K. Kim and G. E. Ward (2004). "The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells." Eukaryot Cell **3**(5): 1320-30.
- Carruthers, V. B. and L. D. Sibley (1997). "Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts." Eur J Cell Biol **73**(2): 114-23.
- Carruthers, V. B., O. K. Giddings and L. D. Sibley (1999). "Secretion of micronemal proteins is associated with *toxoplasma* invasion of host cells." Cell Microbiol **1**(3): 225-35.
- Carruthers, V. B. and L. D. Sibley (1999). "Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*." Mol Microbiol **31**(2): 421-8.
- Carruthers, V. B. (2006). "Proteolysis and *Toxoplasma* invasion." Int J Parasitol **36**(5): 595-600.
- Cerede, O., J. F. Dubremetz, D. Bout and M. Lebrun (2002). "The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin." Embo J **21**(11): 2526-36.
- Cérède, O. (2003). Etude des mécanismes moléculaires de l'invasion des cellules hôtes par *Toxoplasma gondii* : rôle des protéines de micronèmes. Thèse de l'université François Rabelais de Tours soutenue le 30 octobre 2003.
- Cerede, O., J. F. Dubremetz, M. Soete, D. Deslee, H. Vial, D. Bout and M. Lebrun (2005). "Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence." J Exp Med **201**(3): 453-63.
- Cesbron-Delauw, M. F., B. Guy, G. Torpier, R. J. Pierce, G. Lenzen, J. Y. Cesbron, H. Charif, P. Lepage, F. Darcy, J. P. Lecocq and et al. (1989). "Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(19): 7537-41.
- Chardin, P. and F. McCormick (1999). "Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive." Cell **97**(2): 153-5.

- Charif, H., F. Darcy, G. Torpier, M. F. Cesbron-Delauw and A. Capron (1990). "*Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites." Exp Parasitol **71**(1): 114-24.
- Chaturvedi, S., H. Qi, D. Coleman, A. Rodriguez, P. I. Hanson, B. Striepen, D. S. Roos and K. A. Joiner (1999). "Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery." J Biol Chem **274**(4): 2424-31.
- Cintra, W. M. and W. De Souza (1985). "Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy of detergent extracted tachyzoites of *Toxoplasma gondii*." J Submicrosc Cytol **17**(4): 503-8.
- Coller, S., Saeij, J.P. and Boothroyd, J.C. (2005). A novel protein kinase in the *Toxoplasma* rhoptries: a key mediator of host cell responses. *Molecular Parasitology Meeting XVI*, Woods'hole, USA.
- Cool, D. R. and Y. P. Loh (1998). "Carboxypeptidase E is a sorting receptor for prohormones: binding and kinetic studies." Mol Cell Endocrinol **139**(1-2): 7-13.
- Coppens, I., M. Andries, J. L. Liu and M. F. Cesbron-Delauw (1999). "Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis." Eur J Cell Biol **78**(7): 463-72.
- Coppens, I., A. P. Sinai and K. A. Joiner (2000). "*Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition." J Cell Biol **149**(1): 167-80.
- Coppens, I. and K. A. Joiner (2003). "Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge." Mol Biol Cell **14**(9): 3804-20.
- Coppens, I. and O. Vielemeyer (2005). "Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities." Int J Parasitol **35**(6): 597-615.
- Coppens, I., J. D. Dunn, J. D. Romano, M. Pypaert, H. Zhang, J. C. Boothroyd and K. A. Joiner (2006). "*Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space." Cell **125**(2): 261-74.
- Dannies, P. S. (2001). "Concentrating hormones into secretory granules: layers of control." Mol Cell Endocrinol **177**(1-2): 87-93.
- de Macedo, C. S., H. Shams-Eldin, T. K. Smith, R. T. Schwarz and N. Azzouz (2003). "Inhibitors of glycosyl-phosphatidylinositol anchor biosynthesis." Biochimie **85**(3-4): 465-72.

- De Souza, W. (2006). Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An Acad Bras Cienc* **78**(2): 271-291.
- Di Cristina, M., R. Spaccapelo, D. Soldati, F. Bistoni and A. Crisanti (2000). "Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*." *Mol Cell Biol* **20**(19): 7332-41.
- Dikeakos, J. D. and T. L. Reudelhuber (2007). "Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out." *J Cell Biol* **177**(2): 191-6.
- Dikeakos, J. D., M. J. Lacombe, C. Mercure, M. Mireuta and T. L. Reudelhuber (2007). "A hydrophobic patch in a charged alpha-helix is sufficient to target proteins to dense core secretory granules." *J Biol Chem* **282**(2): 1136-43.
- Dobrowolski, J. M. and L. D. Sibley (1996). "*Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite." *Cell* **84**(6): 933-9.
- Dobrowolski, J. M., V. B. Carruthers and L. D. Sibley (1997). "Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*." *Mol Microbiol* **26**(1): 163-73.
- Donald, R. G., D. Carter, B. Ullman and D. S. Roos (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**(24): 14010-9.
- Donald, R. G., J. Allocco, S. B. Singh, B. Nare, S. P. Salowe, J. Wiltsie and P. A. Liberator (2002). "*Toxoplasma gondii* cyclic GMP-dependent kinase: chemotherapeutic targeting of an essential parasite protein kinase." *Eukaryot Cell* **1**(3): 317-28.
- Dowse, T. J. and D. Soldati (2005). "Rhomboid-like proteins in Apicomplexa: phylogeny and nomenclature." *Trends Parasitol* **21**(6): 254-8.
- Dubey, J. P., D. S. Lindsay and C. A. Speer (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts." *Clin Microbiol Rev* **11**(2): 267-99.
- Dubremetz, J. F., A. Achbarou, D. Bermudes and K. A. Joiner (1993). "Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction." *Parasitol Res* **79**(5): 402-8.
- Dubremetz, J. F. (1998). "Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*." *Trends Microbiol* **6**(1): 27-30.
- Dubremetz, J. F., N. Garcia-Reguet, V. Conseil and M. N. Fourmaux (1998). "Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa." *Int J Parasitol* **28**(7): 1007-13.

- Dubremetz, J. F. (2007). "Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction." Cell Microbiol **9**(4): 841-8.
- El Hajj, H., E. Demey, J. Poncet, M. Lebrun, B. Wu, N. Galeotti, M. N. Fourmaux, O. Mercereau-Puijalon, H. Vial, G. Labesse and J. F. Dubremetz (2006). "The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling." Proteomics **6**(21): 5773-84.
- El Hajj, H., M. Lebrun, M. N. Fourmaux, H. Vial and J. F. Dubremetz (2007a). "Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane." Cell Microbiol **9**(1): 54-64.
- El Hajj, H., M. Lebrun, S. T. Arold, H. Vial, G. Labesse and J. F. Dubremetz (2007b). "ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*." PLoS Pathog **3**(2): e14.
- Facey, S. J. and A. Kuhn (2004). "Membrane integration of E. coli model membrane proteins." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 55-66.
- Finlay, B. B. and P. Cossart (1997). "Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens." Science **276**(5313): 718-25.
- Fischer, H. G., S. Stachelhaus, M. Sahm, H. E. Meyer and G. Reichmann (1998). "GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells." Mol Biochem Parasitol **91**(2): 251-62.
- Fourmaux, M. N., A. Achbarou, O. Mercereau-Puijalon, C. Biderre, I. Briche, A. Loyens, C. Odberg-Ferragut, D. Camus and J. F. Dubremetz (1996). "The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface." Mol Biochem Parasitol **83**(2): 201-10.
- Foussard, F., M. A. Leriche and J. F. Dubremetz (1991). "Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries." Parasitology **102 Pt 3**: 367-70.
- Frenkel, J. K. (1953). "Host, strain and treatment variation as factors in the pathogenesis of toxoplasmosis." Am J Trop Med Hyg **2**(3): 390-415.
- Gallusser, A. and A. Kuhn (1990). "Initial steps in protein membrane insertion. Bacteriophage M13 procoat protein binds to the membrane surface by electrostatic interaction." Embo J **9**(9): 2723-9.
- Garcia-Réguet, N., M. Lebrun, M. N. Fourmaux, O. Mercereau-Puijalon, T. Mann, C. J. Beckers, B. Samyn, J. Van Beeumen, D. Bout and J. F. Dubremetz (2000). "The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to

- both the surface of the host cells and the surface of the parasite." Cell Microbiol **2**(4): 353-64.
- Gilbert, L.A., Sohn, S.C., Boothroyd, J.C. and Bradley, P. (2005). Host-pathogen interaction in *Toxoplasma*: a rhoptry-derived protein 2C-like protein targeted to the host cell nucleus. *Molecular parasitology meeting XVI*, Woods'hole, USA.
- Gumbiner, B. and R. B. Kelly (1982). "Two distinct intracellular pathways transport secretory and membrane glycoproteins to the surface of pituitary tumor cells." Cell **28**(1): 51-9.
- Hager, K. M., B. Striepen, L. G. Tilney and D. S. Roos (1999). "The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*." J Cell Sci **112 (Pt 16)**: 2631-8.
- Hakansson, S., K. Schesser, C. Persson, E. E. Galyov, R. Rosqvist, F. Homble and H. Wolf-Watz (1996). "The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity." Embo J **15**(21): 5812-23.
- Hakansson, S., A. J. Charron and L. D. Sibley (2001). "*Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole." Embo J **20**(12): 3132-44.
- Halonen, S. K. and E. Weidner (1994). "Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments." J Eukaryot Microbiol **41**(1): 65-71.
- Harper, J. M., M. H. Huynh, I. Coppens, F. Parussini, S. Moreno and V. B. Carruthers (2006). "A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex." Mol Biol Cell **17**(10): 4551-63.
- He, C.Y., M. K. Shaw, C. H. Pletcher, B. Striepen, L. G. Tilney and D. S. Roos (2001). "A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." EMBO J **20**(3): 330-9.
- He, X. L., M. E. Grigg, J. C. Boothroyd and K. C. Garcia (2002). "Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily." Nat Struct Biol **9**(8): 606-11.
- Hehl, A. B., C. Lekutis, M. E. Grigg, P. J. Bradley, J. F. Dubremetz, E. Ortega-Barria and J. C. Boothroyd (2000). "*Toxoplasma gondii* homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells." Infect Immun **68**(12): 7078-86.

- Henriquez, F. L., M. B. Nickdel, R. McLeod, R. E. Lyons, K. Lyons, J. F. Dubremetz, M. E. Grigg, B. U. Samuel and C. W. Roberts (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." Parasitology **131**(Pt 2): 169-79.
- High, K. P., K. A. Joiner and R. E. Handschumacher (1994). "Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **269**(12): 9105-12.
- Hoppe, H. C. and K. A. Joiner (2000). "Cytoplasmic tail motifs mediate endoplasmic reticulum localization and export of transmembrane reporters in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." Cell Microbiol **2**(6): 569-78.
- Hoppe, H. C., H. M. Ngo, M. Yang and K. A. Joiner (2000). "Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms." Nat Cell Biol **2**(7): 449-56.
- Huynh, M. H., K. E. Rabenau, J. M. Harper, W. L. Beatty, L. D. Sibley and V. B. Carruthers (2003). "Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex." Embo J **22**(9): 2082-90.
- Huynh, M. H., C. Opitz, L. Y. Kwok, F. M. Tomley, V. B. Carruthers and D. Soldati (2004). "Trans-genera reconstitution and complementation of an adhesion complex in *Toxoplasma gondii*." Cell Microbiol **6**(8): 771-82.
- Jacobs, D., J. F. Dubremetz, A. Loyens, F. Bosman and E. Saman (1998). "Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **91**(2): 237-49.
- Jewett, T. J. and L. D. Sibley (2003). "Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites." Mol Cell **11**(4):885-94.
- Joiner, K. A. and D. S. Roos (2002). "Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more." J Cell Biol **157**(4): 557-63.
- Jones, J. L., D. L. Hanson, S. Y. Chu, C. A. Ciesielski, J. E. Kaplan, J. W. Ward and T. R. Navin (1996). "Toxoplasmic encephalitis in HIV-infected persons: risk factors and trends. The Adult/Adolescent Spectrum of Disease Group." Aids **10**(12): 1393-9.
- Kaasch, A. J. and K. A. Joiner (2000). "Protein-targeting determinants in the secretory pathway of apicomplexan parasites." Curr Opin Microbiol **3**(4): 422-8.

- Kappe, S., T. Bruderer, S. Gantt, H. Fujioka, V. Nussenzweig and R. Menard (1999). "Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites." J Cell Biol **147**(5): 937-44.
- Karsten, V., H. Qi, C. J. Beckers, A. Reddy, J. F. Dubremetz, P. Webster and K. A. Joiner (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**(6): 1323-33.
- Karsten, V., R. S. Hegde, A. P. Sinai, M. Yang and K. A. Joiner (2004). "Transmembrane domain modulates sorting of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **279**(25): 26052-7.
- Kasper, L. H., K. M. Currie and M. S. Bradley (1985). "An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*." J Immunol **134**(5): 3426-31.
- Katlama, C., S. De Wit, E. O'Doherty, M. Van Glabeke and N. Clumeck (1996). "Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS." Clin Infect Dis **22**(2): 268-75.
- Keeley, A. and D. Soldati (2004). "The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa." Trends Cell Biol **14**(10): 528-32.
- Khan, I. A., K. H. Ely and L. H. Kasper (1991). "A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice." J Immunol **147**(10): 3501-6.
- Kuliawat, R., J. Klumperman, T. Ludwig and P. Arvan (1997). "Differential sorting of lysosomal enzymes out of the regulated secretory pathway in pancreatic beta-cells." J Cell Biol **137**(3): 595-608.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J Mol Biol **157**(1): 105-32.
- Labruyere, E., M. Lingnau, C. Mercier and L. D. Sibley (1999). "Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **102**(2): 311-24.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lakey, J. H., J. M. Gonzalez-Manas, F. G. van der Goot and F. Pattus (1992). "The membrane insertion of colicins." FEBS Lett **307**(1): 26-9.

- Lebrun, M., A. Michelin, H. El Hajj, J. Poncet, P. J. Bradley, H. Vial and J. F. Dubremetz (2005). "The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion." Cell Microbiol **7**(12): 1823-33.
- 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., C. Mercier, G. Torpier, B. Tourvieille, F. Darcy, J. L. Liu, P. Maes, A. Tartar, A. Capron and M. F. Cesbron-Delauw (1993). "Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane." Mol Biochem Parasitol **59**(1): 143-53.
- Lecordier, L., I. Moleon-Borodowsky, J. F. Dubremetz, B. Tourvieille, C. Mercier, D. Deslee, A. Capron and M. F. Cesbron-Delauw (1995). "Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole." Mol Biochem Parasitol **70**(1-2): 85-94.
- Lecordier, L., C. Mercier, L. D. Sibley and M. F. Cesbron-Delauw (1999). "Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell." Mol Biol Cell **10**(4): 1277-87.
- Lee, M. C., L. Orci, S. Hamamoto, E. Futai, M. Ravazzola and R. Schekman (2005). "Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle." Cell **122**(4): 605-17.
- Leriche, M. A. and J. F. Dubremetz (1990). "Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion." Parasitol Res **76**(7): 559-62.
- Leriche, M. A. and J. F. Dubremetz (1991). "Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies." Mol Biochem Parasitol **45**(2): 249-59.
- Liendo, A. and K. A. Joiner (2000). "*Toxoplasma gondii*: conserved protein machinery in an unusual secretory pathway?" Microbes Infect **2**(2): 137-44.
- Liendo, A., T. T. Stedman, H. M. Ngo, S. Chaturvedi, H. C. Hoppe and K. A. Joiner (2001). "*Toxoplasma gondii* ADP-ribosylation factor 1 mediates enhanced release of constitutively secreted dense granule proteins." J Biol Chem **276**(21): 18272-81.
- Liszewski, M. K., T. W. Post and J. P. Atkinson (1991). "Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster." Annu Rev Immunol **9**: 431-55.

- Liszewski, M. K. and J. P. Atkinson (1996). "Membrane cofactor protein (MCP; CD46). Isoforms differ in protection against the classical pathway of complement." J Immunol **156**(11): 4415-21.
- Liszewski, M. K., M. K. Leung and J. P. Atkinson (1998). "Membrane cofactor protein: importance of N- and O-glycosylation for complement regulatory function." J Immunol **161**(7): 3711-8.
- Littman, D. R., Y. Thomas, P. J. Maddon, L. Chess and R. Axel (1985). "The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes." Cell **40**(2): 237-46.
- Lovett, J. L., N. Marchesini, S. N. Moreno and L. D. Sibley (2002). "*Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores." J Biol Chem **277**(29): 25870-6.
- Lovett, J. L. and L. D. Sibley (2003). "Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells." J Cell Sci **116**(Pt 14): 3009-16.
- Lublin, D. M., M. K. Liszewski, T. W. Post, M. A. Arce, M. M. Le Beau, M. B. Rebentisch, L. S. Lemons, T. Seya and J. P. Atkinson (1988). "Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP). Evidence for inclusion in the multigene family of complement-regulatory proteins." J Exp Med **168**(1): 181-94.
- Luft, B. J. and J. S. Remington (1992). "Toxoplasmic encephalitis in AIDS." Clin Infect Dis **15**(2): 211-22.
- Luo, S., F. A. Ruiz and S. N. Moreno (2005). "The acidocalcisome Ca²⁺-ATPase (TgA1) of *Toxoplasma gondii* is required for polyphosphate storage, intracellular calcium homeostasis and virulence." Mol Microbiol **55**(4): 1034-45.
- Magno, R. C., L. C. Straker, W. de Souza, and M. Attias (2005). "Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles." Microsc Microanal **11**(2): 166-74.
- Marechal, E. and M. F. Cesbron-Delauw (2001). "The apicoplast: a new member of the plastid family." Trends Plant Sci **6**(5): 200-5.
- Meissner, M., M. Reiss, N. Viebig, V. B. Carruthers, C. Toursel, S. Tomavo, J. W. Ajioka and D. Soldati (2002). "A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts." J Cell Sci **115**(Pt 3): 563-74.

- Mercier, C., L. Lecordier, F. Darcy, D. Deslee, A. Murray, B. Tourvieille, P. Maes, A. Capron and M. F. Cesbron-Delauw (1993). "Molecular characterization of a dense granule antigen (Gra 2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **58**(1): 71-82.
- Mercier, C., D. K. Howe, D. Mordue, M. Lingnau and L. D. Sibley (1998a). "Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice." Infect Immun **66**(9): 4176-82.
- Mercier, C., M. F. Cesbron-Delauw and L. D. Sibley (1998b). "The amphipathic alpha helices of the *toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association." J Cell Sci **111 (Pt 15)**: 2171-80.
- Mercier, C., B. Rauscher, L. Lecordier, D. Deslee, J. F. Dubremetz and M. F. Cesbron-Delauw (2001). "Lack of expression of the dense granule protein GRA5 does not affect the development of *Toxoplasma* tachyzoites." Mol Biochem Parasitol **116**(2): 247-51.
- Mercier, C., J. F. Dubremetz, B. Rauscher, L. Lecordier, L. D. Sibley and M. F. Cesbron-Delauw (2002). "Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins." Mol Biol Cell **13**(7): 2397-409.
- Mercier, C., K. D. Adjogble, W. Daubener and M. F. Delauw (2005). "Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?" Int J Parasitol **35**(8): 829-49.
- Messina, M., I. Niesman, C. Mercier and L. D. Sibley (1995). "Stable DNA transformation of *Toxoplasma gondii* using phleomycin selection." Gene **165**(2): 213-7.
- Mevelec, M. N., T. Chardes, O. Mercereau-Puijalon, I. Bourguin, A. Achbarou, J. F. Dubremetz and D. Bout (1992). "Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies." Mol Biochem Parasitol **56**(2): 227-38.
- Miller, S. A., E. M. Binder, M. J. Blackman, V. B. Carruthers and K. Kim (2001). "A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*." J Biol Chem **276**(48): 45341-8.
- Miller, S. A., V. Thathy, J. W. Ajioka, M. J. Blackman and K. Kim (2003). "TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase." Mol Microbiol **49**(4): 883-94.
- Mineo, J. R. and L. H. Kasper (1994). "Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30)." Exp Parasitol **79**(1): 11-20.

- Mital, J., M. Meissner, D. Soldati and G. E. Ward (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**(9): 4341-9.
- Moleon, I., P. Beuchamp, M. F. Cesbron and B. Tourvieille (1994). "Cloning of the gene encoding the p30 antigen of *Toxoplasma gondii* by PCR to insert it in transgenic mice." Arch Med Res **25**(4): 463-6.
- Mondragon, R. and E. Frixione (1996). "Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites." J Eukaryot Microbiol **43**(2): 120-7.
- Montoya, J. G. and O. Liesenfeld (2004). "Toxoplasmosis." Lancet **363**(9425): 1965-76.
- Moore, H. P., M. D. Walker, F. Lee and R. B. Kelly (1983). "Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse ACTH-secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing, and secretion on stimulation." Cell **35**(2 Pt 1): 531-8.
- Moreno, S. N. and L. Zhong (1996). "Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites." Biochem J **313** (Pt 2): 655-9.
- Morisaki, J. H., J. E. Heuser and L. D. Sibley (1995). "Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell." J Cell Sci **108** (Pt 6): 2457-64.
- Morris, M. T., A. Coppin, S. Tomavo and V. B. Carruthers (2002). "Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1." J Biol Chem **277**(47): 45259-66.
- Morris, M. T. and V. B. Carruthers (2003). "Identification and partial characterization of a second Kazal inhibitor in *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **128**(1): 119-22.
- Morrisette, N. S. and L. D. Sibley (2002). "Cytoskeleton of apicomplexan parasites." Microbiol Mol Biol Rev **66**(1): 21-38; table of contents.
- Muniz-hernandez, S., C. Mercier, M. Mondragon, M. G. del Carmen, M. F. Cesbron-Delauw, S. Gonzalez and R. Mondragon (2007). The membranous nanotubular network maintains the spatial organization of *Toxoplasma* parasites during their replication within the parasitophorous vacuole. (en preparation).
- Naguleswaran, A., N. Muller and A. Hemphill (2003). "Neospora caninum and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions." Exp Parasitol **104**(3-4): 149-58.
- Nakaar, V., H. M. Ngo, E. P. Aaronson, I. Coppens, T. T. Stedman and K. A. Joiner (2003). "Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*." J Cell Sci **116**(Pt 11): 2311-20.

- Neudeck, A., S. Stachelhaus, N. Nischik, B. Striepen, G. Reichmann and H. G. Fischer (2002). "Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7." Microbes Infect **4**(6): 581-90.
- Ngo, H. M., E. O. Ngo, D. J. Bzik and K. A. Joiner (2000a). "*Toxoplasma gondii*: are host cell adenosine nucleotides a direct source for purine salvage?" Exp Parasitol **95**(2): 148-53.
- Ngo, H. M., H. C. Hoppe and K. A. Joiner (2000b). "Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion." Trends Cell Biol **10**(2): 67-72.
- Ngo, H. M., M. Yang, K. Paprotka, M. Pypaert, H. Hoppe and K. A. Joiner (2003). "AP-1 in *Toxoplasma gondii* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment." J Biol Chem **278**(7): 5343-52.
- Ngo, H. M., M. Yang and K. A. Joiner (2004). "Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules?" Mol Microbiol **52**(6): 1531-41.
- Nichols, B. A., M. L. Chiappino and C. E. Pavesio (1994). "Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*." Parasitol Res **80**(2): 91-8.
- Nishimura, N. and W. E. Balch (1997). "A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum." Science **277**(5325): 556-8.
- Nockemann, S., H. Dlugonska, B. Henrich, A. Kitzerow and W. Daubener (1998). "Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted-secreted antigen (ESA) from *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **97**(1-2): 109-21.
- Odenthal-Schnittler, M., S. Tomavo, D. Becker, J. F. Dubremetz and R. T. Schwarz (1993). "Evidence for N-linked glycosylation in *Toxoplasma gondii*." Biochem J **291** (Pt 3): 713-21.
- Ossorio, P. N., J. F. Dubremetz and K. A. Joiner (1994). "A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions." J Biol Chem **269**(21): 15350-7.
- Parker, M. W. and F. Pattus (1993). "Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins." Trends Biochem Sci **18**(10): 391-5.
- Parmley, S. F., G. D. Sgarlato and J. S. Remington (1993). "Genomic and corrected cDNA sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **57**(1): 161-5.
- Paschen, S. A. and W. Neupert (2001). "Protein import into mitochondria." IUBMB Life **52**(3-5): 101-12.

- Perkins, M. E. (1992). "Rhoptry organelles of apicomplexan parasites." Parasitol Today **8**(1): 28-32.
- Prigione, I., P. Facchetti, L. Lecordier, D. Deslee, S. Chiesa, M. F. Cesbron-Delauw and V. Pistoia (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**(7): 3741-8.
- Pszenny, V., S. O. Angel, V. G. Duschak, M. Paulino, B. Ledesma, M. I. Yabo, E. Guarnera, A. M. Ruiz and E. J. Bontempi (2000). "Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **107**(2): 241-9.
- Pszenny, V., B. E. Ledesma, M. Matrajt, V. G. Duschak, E. J. Bontempi, J. F. Dubremetz and S. O. Angel (2002). "Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **121**(2): 283-6.
- Que, X., H. Ngo, J. Lawton, M. Gray, Q. Liu, J. Engel, L. Brinen, P. Ghosh, K. A. Joiner and S. L. Reed (2002). "The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing." J Biol Chem **277**(28): 25791-7.
- Quinn, D., L. Orci, M. Ravazzola and H. P. Moore (1991). "Intracellular transport and sorting of mutant human proinsulins that fail to form hexamers." J Cell Biol **113**(5): 987-96.
- Rabenau, K. E., A. Sohrabi, A. Tripathy, C. Reitter, J. W. Ajioka, F. M. Tomley and V. B. Carruthers (2001). "TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with the adhesive protein TgMIC2." Mol Microbiol **41**(3): 537-47.
- Rachinel, N., D. Buzoni-Gatel, C. Dutta, F. J. Mennechet, S. Luangsay, L. A. Minns, M. E. Grigg, S. Tomavo, J. C. Boothroyd and L. H. Kasper (2004). "The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*." J Immunol **173**(4): 2725-35.
- Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief and H. J. Geuze (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." J Exp Med **183**(3): 1161-72.
- Rayapuram, N. and S. Subramani (2006). "The importomer--a peroxisomal membrane complex involved in protein translocation into the peroxisome matrix." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1613-9.

- Rayner, J. C. and H. R. Pelham (1997). "Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast." *Embo J* **16**(8): 1832-41.
- Reiss, M., N. Viebig, S. Brecht, M. N. Fourmaux, M. Soete, M. Di Cristina, J. F. Dubremetz and D. Soldati (2001). "Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*." *J Cell Biol* **152**(3): 563-78.
- Rodriguez, C., D. Afchain, A. Capron, C. Dissous and F. Santoro (1985). "Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes." *Eur J Immunol* **15**(7): 747-9.
- 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.
- Saffer, L. D., O. Mercereau-Puijalon, J. F. Dubremetz and J. D. Schwartzman (1992). "Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration." *J Protozool* **39**(4): 526-30.
- Saksouk, N., M. M. Bhatti, S. Kieffer, A. T. Smith, K. Musset, J. Garin, W. J. Sullivan, Jr., M. F. Cesbron-Delauw and M. A. Hakimi (2005). "Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*." *Mol Cell Biol* **25**(23): 10301-14.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). Calcium-phosphate-mediated transfection of eukaryotic cells with plasmid DNAs. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 16.14-16.20 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA).
- Saouros, S., B. Edwards-Jones, M. Reiss, K. Sawmynaden, E. Cota, P. Simpson, T. J. Dowse, U. Jakle, S. Ramboarina, T. Shivarattan, S. Matthews and D. Soldati-Favre (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**(46): 38583-91.
- Schwab, J. C., C. J. Beckers and K. A. Joiner (1994). "The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2): 509-13.
- Schwartzman, J. D. and L. D. Saffer (1992). "How *Toxoplasma gondii* gets in and out of host cells." *Subcell Biochem* **18**: 333-64.

- Schwarz, R. T. and S. Tomavo (1993). "The current status of the glycobiology of *Toxoplasma gondii*: glycosylphosphatidylinositols, N- and O-linked glycans." Res Immunol **144**(1): 24-31.
- Seeber, F., J. F. Dubremetz and J. C. Boothroyd (1998). "Analysis of *Toxoplasma gondii* stably transfected with a transmembrane variant of its major surface protein, SAG1." J Cell Sci **111 (Pt 1)**: 23-9.
- Sevier, C. S., O. A. Weisz, M. Davis and C. E. Machamer (2000). "Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs." Mol Biol Cell **11**(1): 13-22.
- Sibley, L. D., J. L. Krahenbuhl, G. M. Adams and E. Weidner (1986). "*Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins." J Cell Biol **103**(3): 867-74.
- Sibley, L. D., I. R. Niesman, T. Asai and T. Takeuchi (1994). "*Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole." Exp Parasitol **79**(3): 301-11.
- Sibley, L. D., I. R. Niesman, S. F. Parmley and M. F. Cesbron-Delauw (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 (Pt 4)**: 1669-77.
- Sibley, L. D. and N. W. Andrews (2000). "Cell invasion by un-palatable parasites." Traffic **1**(2): 100-6.
- Sibley, L. D. (2003). "*Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style." Traffic **4**(9): 581-6.
- Silverman, J. A., H. Qi, A. Riehl, C. Beckers, V. Nakaar and K. A. Joiner (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**(20): 12352-9.
- Sinai, A. P., P. Webster and K. A. Joiner (1997). "Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction." J Cell Sci **110 (Pt 17)**: 2117-28.
- Sinai, A. P. and K. A. Joiner (2001). "The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane." J Cell Biol **154**(1): 95-108.

- Soldati, D. and J. C. Boothroyd (1993). "Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*." Science **260**(5106): 349-52.
- Soldati, D., J. F. Dubremetz and M. Lebrun (2001). "Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **31**(12): 1293-302.
- Soldati, D. and M. Meissner (2004). "*Toxoplasma* as a novel system for motility." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 32-40.
- Steiner, D. F., Y. Rouille, Q. Gong, S. Martin, R. Carroll and S. J. Chan (1996). "The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals." Diabetes Metab **22**(2): 94-104.
- Striepen, B., D. Soldati, N. Garcia-Reguet, J. F. Dubremetz and D. S. Roos (2001). "Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **113**(1): 45-53.
- Suss-Toby, E., J. Zimmerberg and G. E. Ward (1996). "*Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8413-8.
- Swisher, C. N., K. Boyer and R. McLeod (1994). "Congenital toxoplasmosis. The Toxoplasmosis Study Group." Semin Pediatr Neurol **1**(1): 4-25.
- Thiele, C., H. H. Gerdes and W. B. Huttner (1997). "Protein secretion: puzzling receptors." Curr Biol **7**(8): R496-500.
- Tomley, F. M. and D. S. Soldati (2001). "Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites." Trends Parasitol **17**(2): 81-8.
- Torrey, E. F. and R. H. Yolken (2007). "Schizophrenia and toxoplasmosis." Schizophr Bull **33**(3): 727-8.
- Urban, S. and M. Freeman (2003). "Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain." Mol Cell **11**(6): 1425-34.
- Vivier, E. and A. Petitprez (1969). "[The outer membrane complex and its development at the time of the formation of daughter cells in *Toxoplasma gondii*]." J Cell Biol **43**(2): 329-42.
- Vogel, N., M. Kirisits, E. Michael, H. Bach, M. Hostetter, K. Boyer, R. Simpson, E. Holfels, J. Hopkins, D. Mack, M. B. Mets, C. N. Swisher, D. Patel, N. Roizen, L. Stein, M. Stein, S. Withers, E. Mui, C. Egwuagu, J. Remington, R. Dorfman and R. McLeod

- (1996). "Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception." Clin Infect Dis **23**(5): 1055-60.
- von Heijne, G. (2007). "Formation of transmembrane helices in vivo--is hydrophobicity all that matters?" J Gen Physiol **129**(5): 353-6.
- Vonlaufen, N., N. Guetg, A. Naguleswaran, N. Muller, C. Bjorkman, G. Schares, D. von Blumroeder, J. Ellis and A. Hemphill (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**(1): 576-83.
- Waller, R. F. and G. I. McFadden (2005). "The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites." Curr Issues Mol Biol **7**(1): 57-79.
- Walmsley, A. R., F. Zeng and N. M. Hooper (2003). "The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant." J Biol Chem **278**(39): 37241-8.
- Wan, K. L., V. B. Carruthers, L. D. Sibley and J. W. Ajioka (1997). "Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2." Mol Biochem Parasitol **84**(2): 203-14.
- Wiersma, H. I., S. E. Galuska, F. M. Tomley, L. D. Sibley, P. A. Liberator and R. G. Donald (2004). "A role for coccidian cGMP-dependent protein kinase in motility and invasion." Int J Parasitol **34**(3): 369-80.
- Yamabhai, M. and R. G. Anderson (2002). "Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts." J Biol Chem **277**(28): 24843-6.
- Yang, M., I. Coppens, S. Wormsley, P. Baeovova, H. C. Hoppe and K. A. Joiner (2004). "The *Plasmodium falciparum* Vps4 homolog mediates multivesicular body formation." J Cell Sci **117**(Pt 17): 3831-8.
- Zaliauskiene, L., S. Kang, C. G. Brouillette, J. Lebowitz, R. B. Arani and J. F. Collawn (2000). "Down-regulation of cell surface receptors is modulated by polar residues within the transmembrane domain." Mol Biol Cell **11**(8): 2643-55.
- Zhou, H., Q. Gu, Q. Zhao, J. Zhang, H. Cong, Y. Li and S. He (2007). "*Toxoplasma gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and GRA2 in *Pichia pastoris*." Parasitol Res **100**(4): 829-35.
- Zinecker, C. F., B. Striepen, S. Tomavo, J. F. Dubremetz and R. T. Schwarz (1998). "The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides." Mol Biochem Parasitol **97**(1-2): 241-6.

RESUME

Parmi les mécanismes de survie intracellulaire connus, l'export de protéines solubles ou transmembranaires visant à modifier différents compartiments de la cellule-hôte est une stratégie employée par de nombreux pathogènes. Chez *Toxoplasma gondii*, il a été montré que les granules denses (GD) constituent la voie par défaut pour les protéines solubles. Par contre, le tri de protéines transmembranaires vers les GD plutôt que vers la membrane plasmique du parasite (MPP), et leur maintien sous forme soluble avant insertion membranaire post-sécrétoire, font appel à des mécanismes originaux qui restent à élucider.

La protéine de GD GRA5 est adressée à la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) après sécrétion. Exprimée en cellules de mammifères, GRA5 est adressée à la membrane plasmique avec une topologie de type I, ce qui reflète la particularité des mécanismes de sécrétion de *T. gondii*. Par une approche basée sur des protéines chimériques présentant des domaines spécifiques de GRA5 et d'une protéine transmembranaire de surface parasitaire, nous avons pu identifier les déterminants de l'adressage à la MPP *versus* à la MVP. Nous avons ainsi pu démontrer que le domaine Nt de GRA5 est impliqué dans l'adressage soluble aux GD et est essentiel pour l'insertion membranaire post-sécrétoire dans la MVP. Ces résultats, qui ont été étendus à une autre protéine GRA transmembranaire (GRA6), contredisent l'idée largement répandue selon laquelle les signaux d'adressage des protéines transmembranaires seraient présents dans la queue C-terminale et/ou dépendraient de la longueur du domaine transmembranaire de ces protéines.

ABSTRACT

The success of many intracellular pathogens relies on the export of both soluble and membrane-bound proteins that are destined to modify various compartments of the host cell. In *Toxoplasma gondii*, it is well established that the dense granules (DG) constitute the default constitutive pathway for soluble proteins. By contrast, the mechanism by which transmembrane proteins are sorted to the DG instead of the parasite plasma membrane (PPM), and are maintained in a soluble form while adopting a transmembrane topology after secretion is not known.

The GRA5 DG protein of *T. gondii* is targeted to the parasitophorous vacuole membrane (PVM) after soluble secretion. Expression of GRA5 in mammalian cells revealed that the protein is targeted to the cell surface with a type I topology, providing evidence that soluble trafficking of GRA5 within the parasite is peculiar. By using chimeric proteins containing specific domains of GRA5 and a plasma membrane targeted transmembrane protein, we investigated which are the determinant(s) of PPM *versus* PVM targeting. We demonstrated that the GRA5 Nt domain is involved in soluble targeting within the DG and is essential for insertion into the PVM. These results, that were extended to another transmembrane GRA protein (GRA6), contrast with the broad acceptance that sorting signals are present within the cytoplasmic tail of membranous proteins and/or depend on the size of their transmembrane domain.