ETUDES STRUCTURALES, CELLULAIRES ET PHARMACOLOGIQUES DE LA SYNTHESE DES GALACTOLIPIDES CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA ET TOXOPLASMA GONDII

Cyrille Botte

▶ **To cite this version:**

Cyrille Botte. ETUDES STRUCTURALES, CELLULAIRES ET PHARMACOLOGIQUES DE LA SYNTHESE DES GALACTOLIPIDES CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA ET TOXOPLASMA GONDII. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00319667

HAL Id: tel-00319667

https://theses.hal.science/tel-00319667

Submitted on 9 Sep 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.

Université Joseph Fourier – Grenoble I

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Discipline : Biologie

Présentée par

Cyrille Botté

Le 20 Décembre 2007

ETUDES STRUCTURALES, CELLULAIRES ET PHARMACOLOGIQUES DE LA SYNTHESE DES GALACTOLIPIDES CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA* ET *TOXOPLASMA GONDII*

Directeurs de thèse : Éric Maréchal et Corinne Mercier

Composition du Jury :

Jean-François Dubremetz, *Rapporteur*
Dominique Soldati, *Rapporteur*
Christelle Breton
Christine Miège
Éric Maréchal
Corinne Mercier

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, CEA-Grenoble et du Laboratoire d'adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Institut Jean Roget Grenoble

A mes parents, Joëlle et Jean-Luc Botté

Remerciements

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame Marylin Vantard et à Madame Marie-France Cesbron-Delauw pour m'avoir accordé leur confiance en m'accueillant dans leurs laboratoires de Physiologie Cellulaire Végétale et d'Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, respectivement.

Je remercie Mesdames Christelle Breton de l'Université Joseph Fourier, Christine Miège de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, Dominique Soldati de l'Université de Genève et Monsieur Jean-François Dubremetz de l'Université de Montpellier, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger cette thèse.

Je tiens à remercier Eric Maréchal, mon *boss*, qui m'a permis de mettre le pied à l'étrier et qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Sa vision enthousiaste de la science et son esprit entrepreneur constituent définitivement des modèles pour la suite de ma carrière.

Je remercie Corinne Mercier mon autre *boss* qui, grâce à sa passion et à sa rigueur, m'a introduite au monde de Apicomplexa que je ne pense pas délaisser avant un long moment. Nos fréquentes oppositions, contradictions et confrontations ont été la clé de notre travail commun. Plus qu'un encadrant, je pense avoir trouvé en elle une amie aussi bien dans le travail et dans la vie lorsque j'en ai besoin.
Je vous remercie particulièrement d'avoir fait de moi leur *Padawan* et pouvoir intégré le grand ordre des *chevaliers Jedi*.

Un grand merci à Mesdames Maryse Block et Cordelia Bisanz ainsi qu'à Monsieur Mohamed Ali Hakimi pour leurs conseils avisés sur mes travaux.

Merci à Christelle Breton, Henri Vial, Rima McLeod, Ruth Welti, Laurence Lafanechère, et Yung-Sing Wong pour leur collaboration.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe: Olivier Bastien, Nadia Saïdani, Delphine Grando, Amélie Zoppé, Hélène Valladié et Evelyne Duvernois. Ce travail est aussi le vôtre et sans vous ça n'aurait pas été aussi plaisant…

Une spéciale dédicace pour Karine Musset pour toute les demandes en culture cellulaire et elle sait qu'il y en a eu beaucoup!

Merci à tous les thésards et postdocs passés et présents pour tous les bons moments partagés.

J'exprime ma sympathie à tous les membres des deux laboratoires, merci à tous!

A vous tous mes amis du LAR et dépendants, MERCI, vous-mêmes savez!

Merci à toi Yoshiki de m'avoir tenu la main jusqu'aux dernières lignes de cette thèse et de me supporter pour tout ce qui s'est et va se passer.

Enfin, je tiens naturellement à remercier ma famille et particulièrement mes parents qui m'ont donné le goût et l'envie d'être curieux de tout, ainsi que d'avoir la persévérance pour arriver à ses envies.

Sommaire

Introduction générale **1**

I. Découverte et classification de *Toxoplasma gondii* **1**

II. Cycle parasitaire de *Toxoplasma gondii* **4**

III. La toxoplasmose **6**

IV. La synthèse de galactolipides chloroplastiques : une cible pour de nouveaux modèles de thérapies anti-toxoplasmiques ? **8**

Partie bibliographique

Métabolisme et dynamique des acyl-lipides chez les organismes eucaryotes dotés de plastes **11**

I. Introduction **11**

II. Les acyl-lipides membranaires dans les cellules eucaryotes **12**

A. Les grandes classes d'acyl-lipides 12
1. Les acides gras 12
2. Les glycérolipides 17
3. Les sphingolipides 28
4. Analogies structurales entre glycérolipides et sphingolipides 34

B. Les grandes voies de synthèse des acyl-lipides 34
1. Synthèse des acides gras 34
2. Voies générales de synthèse des glycérolipides 37
3. Synthèse des sphingolipides 42

C. Compartimentation, homéostasie et dynamique membranaire dans les cellules eucaryotes 43
1. Diffusion des lipides au sein d'une membrane 43
2. Transfert de lipides d'une membrane à une autre 44
3. Trafic de lipides dans les cellules eucaryotes 45

III. Particularités de la synthèse, compartimentation et dynamique des lipides dans les cellules végétales **47**

A. Compartimentation des cellules végétales 47

B. Le plaste, un organite central de la synthèse des lipides chez les plantes 48

C. Synthèse et dynamique subcellulaire des galactolipides dans les cellules dotées de chloroplastes simples 54

IV. Particularités de la synthèse, de la compartimentation et de la dynamique des lipides chez le parasite apicomplexe *Toxoplasma gondii* **63**

A. Compartimentation membranaire des cellules de *T. gondii* 63
1. Le système endomembranaire 65
2. Le complexe apical 66

3. La pellicule et les structures associées 71
4. La vacuole parasitophore et sa membrane 76
5. Les organites semi autonomes 78
6. Mode de vie de *T. gondii* et dynamique membranaire 85

B. Etat des connaissances sur la composition lipidique des compartiments membranaires de *T. gondii* 87
1. Composition des membranes en général 88
2. Rafts 88

C. Métabolisme et dynamique lipidique chez *T. gondii* 89
1. Les acides gras 89
2. Le cholestérol 91
3. Les glycérolipides 91
4. Les shingolipides 92

D. Métabolisme et dynamique des lipides comme cible de traitements anti-parasitaires 93

V. Objectis du travail de thèse **94**

Matériel et méthodes **95**

I. Organismes modèles étudiés et méthodes de culture : *Arabidopsis*, *Chlamydomonas*, fibrobastes humains, *Toxoplasma*, *Escherichia coli* **96**

A. Choix des organismes modèles 95

B. Méthodes de culture et traitements en présence de molécules bioactives 95
1. *Arabidopsis thaliana* 95
a. Méthode générale de culture 95
b. Traitements en présence de composés candidats-herbicides 96
2. *Chlamydomonas reinhardtii* 96
a. Méthode générale de culture 96
b. Traitements en présence de composés candidats-algistatiques ou algicides 96
3. Fibroblastes humains 96
a. Méthode générale de culture 96
b. Traitements en présence de composés potentiellement toxiques 96
4. *Toxoplasma gondii* 97
a. Propagation sur tapis de fibroblastes humains 97
b. Invasion cellulaire synchronisée des cellules hôtes 97
c. Traitements en présence de composés candidats-antiparasitaires 98
5. *Escherichia coli* 100

II. Systèmes recombinants bactériens **100**

A. Souches recombinantes d'*Escherichia coli* 100

B. Méthodes d'induction de l'expression de protéines recombinantes chez *Escherichia coli* 101

III. Méthodes d'étude des protéines **101**

A. Dosage des protéines 101

B. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 101

C. Transfert de protéines et immunodétection (Western blot) 102
a. Electrotransfert de protéines sur membrane de nitrocellulose 102
b. Immunodétection par chemiluminescence 102

D. Mesure de l'activité enzymatique des MGDG synthases 102
a. Mesure de l'activité après apport de diacylglycérol dans des micelles mixtes 102
b. Mesure de l'activité en vésicules de membranes chargées en diacylglycérol 102

IV. Méthodes d'étude des lipides **103**

V. Méthodes d'observations des cellules **104**

A. Observations par microscopie optique et immunofluorescence indirecte (IFI) 105

B. Observations par microscopie électronique à transmission 105

C. Etude de la motilité de *Toxoplasma gondii* (gliding) 105

D. Etude de la sécrétion du contenu des granules denses et des micronèmes (Protocole de préparation des ESA -excretory secretory antigens-) 106

V. Méthodes d'étude de l'activité immunologique portée par un sérum **106**

A. Immunoagglutination de parasites vivants 106

B. Immunoagglutination de parasites fixés 107

C. Mesure de la phagocytose induite par l'opsonisation des parasites par les sérums 107

D. Mesure de l'activation de la voie classique du complément induite par l'opsonisation de T. gondii par les différents sérums 107

Résultats – Chapitre I

Etude structurale de la MGDG synthase chloroplastique de plantes par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée **108**

I. Préambule **108**

II. Molecular modeling and site-directed mutagenesis of plant chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase reveal critical residues for activity **110**

Résultats – Chapitre II

Sélection d'inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis* et caractérisation de leurs bioactivités sur modèles d'eucaryotes photosynthétiques (*Arabidopsis*, *Chlamydomonas*) et Apicomplexa (*Toxoplasma*) **123**

I. Introduction **123**

II. Criblage pharmacologique visant à sélectionner des inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana* **124**

A. Principe du test miniaturisé permettant la mesure automatisée de l'activité MGDG synthase et de son inhibition 124

B. Criblage primaire automatisé et identification de molécules inhibitrices de la MGDG synthase d'*Arabidopsis thaliana* 126

II. Etude de l'effet de DB-E-PDB et DB-BE-PDB, deux molécules inhibitrices de la MGDG synthase I d'*Arabidopsis thaliana*, sélectionnées par criblage à haut débit, sur des eucaryotes chlorophylliens **128**

A. Spectre d'inhibition des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur l'activité des MGDG synthases de plantes supérieures 128

B. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur le développement d'*Arabidopsis thaliana* 130

C. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur le développement de *Chlamydomonas reinhardtii* 131

III. Caractérisation de l'action des inhibiteurs de la MGDG synthase sur le parasite *Toxoplasma gondii* (et Apicomplexes apparentés) 132

A. Etudes préliminaires de l'effet des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB à forte concentration (100 µM) sur le développement de *Toxoplasma gondii* 132

B. Etudes de l'effet des molécules DE-E-PDB et DE-BE-PDB à forte concentration (100 µM) sur l'intégrité des cellules humaines HFF 134

1. Effet des molécules DE-E-PDB et DE-BE-PDB sur cellules HFF non proliférantes 135
2. Effet des molécules DE-E-PDB et DE-BE-PDB sur cellules HFF en prolifération 137

C. Mesure de l'IC50 des molécules DB-E-PDB et DB-DE-PDB sur la prolifération du parasite *Toxoplasma gondii* 138

1. Choix et optimisation d'un test systématique de mesure d'une IC50 de molécules antiparasitaires sur le modèle *Toxoplasma gondii* 138
2. Mesure de L'IC50 des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB 144

D. Investigations préliminaires sur le mode d'action des inhibiteurs de la MGDG synthase chez *T. gondii*, en relation avec le processus d'invasion 145

1. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-DE-PDB sur la motilité de *T. gondii* 146
2. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-DE-PDB sur l'extrusion du conoïde 147
3. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur la sécrétion du contenu des micronèmes 147

IV. Optimisation des molécules en vue d'améliorer les propriétés herbicides et/ou antiparasitaires, discussion et perspectives 148

A. Optimisation des propriétés herbicides et / ou antiparasitaires de composés dérivés du châssis moléculaire commun à DE-E-PDB et DE-BE-PDB 149

B. Perspectives : des outils pour des stratégies de génétique chimique directe et inverse 156

Résultats – Chapitre III

Localisation et dynamique sub-cellulaire d'une classe de lipides apparentée au DGDG chez *Toxoplasma gondii* 159

I. Préambule 159

II. Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like epitope in *Toxoplasma gondii* 161

Résultats – Chapitre IV

Antigène digalactolipidique à la surface de *Toxoplasma gondii* et exploration d'applications diagnostiques et thérapeutiques éventuelles 178

I. Activité d'un serum de lapin obtenu par immunisation à l'aide de DGDG chloroplastique, sur le parasite *Toxoplasma gondii* **179**

A. Le serum anti-DGDG provoque l'immunoagglutination de toxoplasmes extracellulaires 179

1. Immunoagglutination de toxoplasmes vivants en présence de serum anti-DGDG 180

2. Immunoagglutination de toxoplasmes fixés selon les conditions d'un test diagnostique hospitalier 181

B. Le serum de lapin anti-DGDG inhibe l'invasion de *Toxoplasma gondii* dans la cellule hôte 183

II. Effet du serum de lapin anti-DGDG sur l'activation du système immunitaire inné au cours de la réponse anti-toxoplasmique **185**

A. Le serum anti-DGDG active la phagocytose de *T. gondii* par les macrophages via l'opsonisation du parasite 185

B. Le serum de lapin anti-DGDG active la voie classique du complément grâce à l'opsonisation du parasite 188

Conclusion **195**

Publications **201**

Annexe

Contribution à l'établissement du profil lipidomique de *Toxoplasma gondii* **203**

Références **214**

Résumé

Abréviations

ACCase : complexe Acétyl-CoA carboxylase
ACT : Acyl Transférase
AP : Acice Phosphatidique
ATP : Adénosine triphosphate
CDP : Cytidine triphosphate
CoA : Coenzyme A
DAG : Diacylglycérol
DGD : DGDG synthase
DGDG : Digalactosyldiacylglycérol
DGLE : Digalactolipide-like epitope
DL : Dose létale
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DPG : Diphosphatidylglycérol
DRM: Fractions membranaires résistantes aux détergents
FAE : Acide gras élongase
FAS : Acide gras synthase
Gal : Galactose
Glc : Glucose
GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HFF : Human Foreskin Fibroblast
IC : Concentration inhibitrice
IFI : Immunofluorescence indirecte
IMC : Complexe membranaire interne
LB : Luria-Broth
MGCB : Monogalactosylcérébroside
MGD : MGDG synthase
MGDG : Monogalactosyldiacylglycérol
MGlcDG : Monoglucosyldiacylglycérol
MVP : Membrane de la vacuole parasitophore
PBS : Tampon phosphate
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PI : Phosphatidylinositol
PPM : Membrane péiplasmique
PS : Phosphatidylsérine
RE : Réticulum endoplasmique
SAG : Antigène de surface (*Apicomplexa)*
SM : Sphingomyéline
SQDG : Sulfoquinovosyldiacylglycérol
VP : Vacuole parasitophore
UDP : Uridine diphosphate

Introduction

Toxoplasma gondii est un protiste appartenant au phylum des *Apicomplexa* qui regroupe de nombreux agents pathogènes d'incidence majeure sur le plan médical et vétérinaire (*Toxoplasma*, agent de la toxoplasmose, *Plasmodium*, responsable du paludisme, *Eimeria*, responsable des coccidioses, etc). La découverte en 1996 que *T. gondii* possédait un organite limité par plusieurs membranes, et dérivé d'un chloroplaste (McFadden et al. 1996 ; Köhler et al. 1997) a ouvert un champ d'étude nouveau à la frontière de la parasitologie et de la biologie végétale. Le travail présenté dans cette thèse repose sur une approche comparative du métabolisme des glycérolipides entre des organismes porteurs de chloroplastes (en particulier les Angiospermes tels qu'*Arabidopsis thaliana*) et le modèle d'Apicomplexe *Toxoplasma gondii*.

Ce chapitre introductif décrit succinctement comment notre compréhension de l'évolution qui aboutit à des organismes tels que *Toxoplasma gondii*, à la frange des règnes animaux et végétaux, a récemment progressé. S'appuyant sur cette évolution sophistiquée, des questions nouvelles de biologie comparative se posent et des stratégies inattendues pour développer des thérapies à l'aide de médicaments herbicides sont maintenant proposées.

I. Découverte et classification de Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii a été isolé pour la première fois en 1908, simultanément par Nicolle et Manceaux, à Tunis, chez un rongeur nord africain, le gondi, et par Splendore, au Brésil, chez un lapin (Nicolle et Manceaux, 1909 ; Splendore, 1909). Toute notion concernant son cycle biologique ou son importance en pathologie humaine et animale étaient alors inconnues. Il faut attendre les années 1920-1930 pour voir apparaître les premières descriptions de cas de toxoplasmose humaine. C'est la mise au point des premiers tests sérologiques dans les années 1940 qui a permis de révéler l'importance de la prévalence de la toxoplasmose humaine. Le cycle de ce parasite et la compréhension des modes de transmission n'ont eu lieu qu'au cours des années 1970

Depuis une décennie, le phylum des *Apicomplexa* auquel appartient *T. gondii* a suscité un intérêt renouvelé du fait que des données moléculaires et cellulaires ont permis de progresser

dans la compréhension de la biologie atypique de ces organismes, de l'évolution de leurs génomes (nucléaire, mitochondrial et plastidial) et enfin, de leur place dans la classification.

La classification des eucaryotes unicellulaires a été remaniée à de nombreuses reprises. Les unicellulaires ont tout d'abord été simplement séparés en protozoaires (animaux unicellulaires) et protophytes (végétaux unicellulaires), concept de classification qui s'accompagne d'une hiérarchisation des unicellulaires comme des êtres archaïques, inférieurs, et précurseurs des organismes pluricellulaires. Il est resté courant de présenter les unicellulaires comme des organismes précédant les métazoaires, dans une vision logique de complexification du vivant au cours de l'évolution. Le naturaliste allemand Ernst Haeckel introduit le terme de *Protista*, signifiant les "êtres primordiaux". Une sub-division des protozoaires proposée par Bütschli (1880) en Sarcodina (les organismes amiboïdes), Mastigophora (espèces flagellées), Infusoria (espèces ciliées) et Sporozoa (groupe d'unicellulaires parasites dans lequel *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii* sont classés) reste encore utilisée, surtout chez les non-protistologues. Selon cette classification, les Apicomplexa sont aussi appelés Sporozoaires, du fait de la division du zygote à l'intérieur d'une structure résistante limitée par une paroi (ce type de division est appelé sporogonie) produisant de très nombreuses cellules infectieuses, appelées sporozoïtes.

Dans ces classifications, les Apicomplexa sont rassemblés avec les Dinoflagellés et les Ciliés dans le phylum des Alvéolés, c'est-à-dire d'organismes munis de sacs membranaires ("alvéoles", appelées aussi le "complexe membranaire interne" -IMC dans ce manuscrit-) sous la membrane plasmique. La suite du débat sur la classification des protistes est caractérisée par l'apport des analyses sub-cellulaires par microscopie électronique, des informations moléculaires ainsi que la prise en compte des concepts de la théorie endosymbiotique et la possibilité de considérer des phylums comprenant à la fois des êtres unicellulaires et pluricellulaires. Le botaniste canadien Thomas Cavalier-Smith propose une classification en six règnes, tentant de concilier les données de phylogénie moléculaire et les scénarios d'endosymbiose (Cavalier-Smith, 1998) qu'il a récemment affiné selon un « arbre de la vie », (Cavalier-Smith, 2004). Deux schémas d'organisation des cellules eucaryotes se seraient séparés, d'une part les Unichontes avec un cône de microtubules simples attaché à un unique centriole, et les Bichontes avec deux bandes de microtubules attachés à un centriole postérieur et un éventail de microtubules attaché à un centriole antérieur (Figure 1). Les protozoaires comprendraient dans ce schéma, des êtres unichontes et des êtres bichontes.

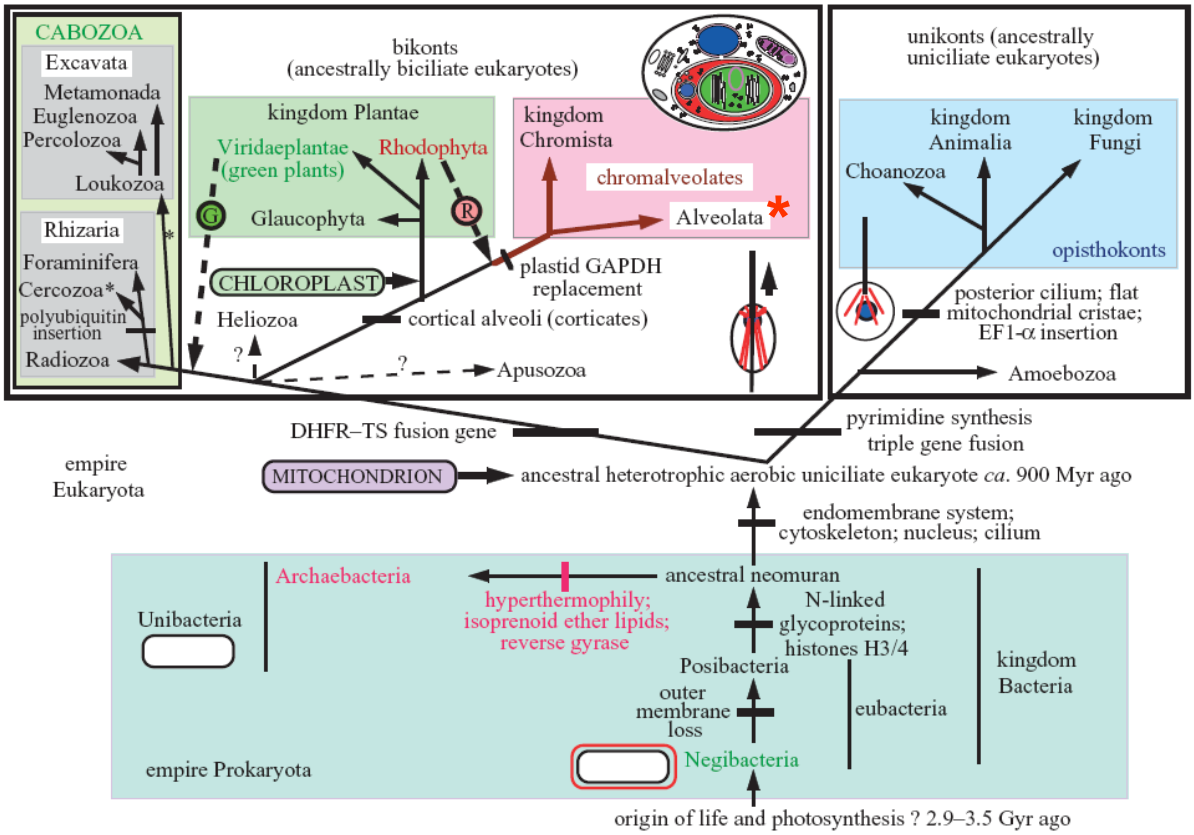


Figure 1 : L'arbre de la vie selon Cavalier-Smith (2004). Cet arbre de la vie (Tree of Life), tiré de Cavalier-Smith (2004), est fondé sur des données moléculaires, ultra-structurales et paléontologiques. Le règne des Protozoaires n'est pas indiqué pour raison de simplicité de la représentation. Ce règne comprend quatre groupes majeurs (Alveolata, Cabozoa, Amoebozoa et Choanozoa) et le phylum Apusozoa. La figure indique les 4 schémas d'organisation des cellules vivantes (les Unibactéries avec une simple membrane plasmique, les Negibactéries limitées par deux membranes, les Unichontes avec un cône de microtubules simples attaché à un unique centriole, les Bichontes avec deux bandes de microtubules attachés à un centriole postérieur et un éventail de microtubules attaché à un centriole antérieur) ainsi que les cellules eucaryotes les plus complexe dans le monde vivant, c'est-à-dire les Cryptophytes.

La classification s'est donc extrêmement sophistiquée et complexifiée et la vision des Protozoaires obscurcie. Alastair Simpson et Andrew Roger ont récemment proposé une représentation de ce qu'ils appellent les "vrais règnes des eukaryotes", obtenus en privilégiant les données moléculaires, en particulier des fusions de gènes marqueurs phylogénétiques. Cette classification se présente sous la forme d'un arbre séparant six groupes majeurs, Opisthokonta (rassemblant les unichontes monophylétiques), Amoebozoa, Plantae, Excavata, Rhizaria et Chromalveolata (groupe dans lequel se situent les Apicomplexa) (Figure 2).

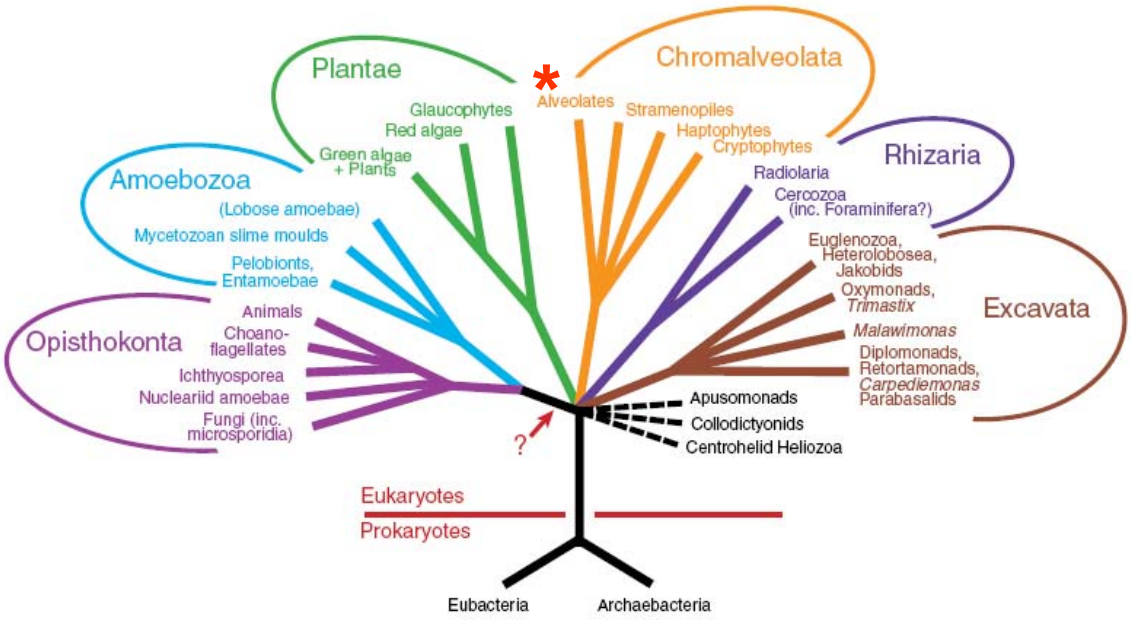


Figure 2 : Les "vrais" règnes des Eucaryotes selon Simpson et Roger (2004). Ce schéma proposé par Simpson et Roger (2004), privilégie les informations moléculaires obtenues à partir d'un ensemble de séquences considérées comme des marqueurs phylogénétiques. La flèche indique la position possible de la racine, fondée sur l'analyse de fusion de gènes marqueurs. Le signe (*) indique le groupe dans lequel les Apicomplexes sont classés (dans le groupe des Alvéolés).

Selon les classifications les plus récentes, *Toxplasma gondii* est donc un protiste des Chromoalveolata et plus particulièrement, des Alveolates, où sont classés les Apicomplexa.

II. Cycle parasitaire de Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii peut infecter virtuellement tous les animaux homéothermes. Chez l'humain, il provoque la toxoplasmose, qui est probablement la parasitose humaine la plus répandue dans le monde. Parasite intracellulaire obligatoire, *T. gondii* se multiplie au sein d'une vacuole parasitophore (VP) qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire développée lors de la phase aiguë de l'infection. Cette phase est suivie par l'enkystement du parasite dans les organes où la pression du système immunitaire est la plus faible. Cette interconversion est caractéristique de la forme chronique de l'infection qui perdure pendant toute la vie de l'individu.

Le toxoplasme a un cycle complexe qui implique la transmission entre hôtes par des stades spécialisés pour l'invasion :

(i) le stade tachyzoïte, forme proliférative infectieuse chez l'hôte intermédiaire, se développe dans des vacuoles transitoires qui peuvent contenir jusqu'à 128 parasites ;

(ii) le stade bradyzoïte, chez l'hôte intermédiaire, est contenu dans des kystes intracellulaires qui mesurent environ 100µm de diamètre et contiennent plusieurs milliers de parasites ;

(iii) le stade mérozoïte, chez l'hôte définitif, est le seul stade capable de reproduction sexuée ;

(iv) le stade sporozoïte, résultat de la reproduction sexuée chez l'hôte définitif, est libéré dans l'environnement avec les fecès du chat, dans des oocystes de 10 à 15 µm de diamètre qui contiennent 8 sporozoïtes.

La Figure 3 schématise ces différentes phases. Le stade tachyzoïte est celui sur lequel la majeur partie de mes travaux de thèse ont porté.

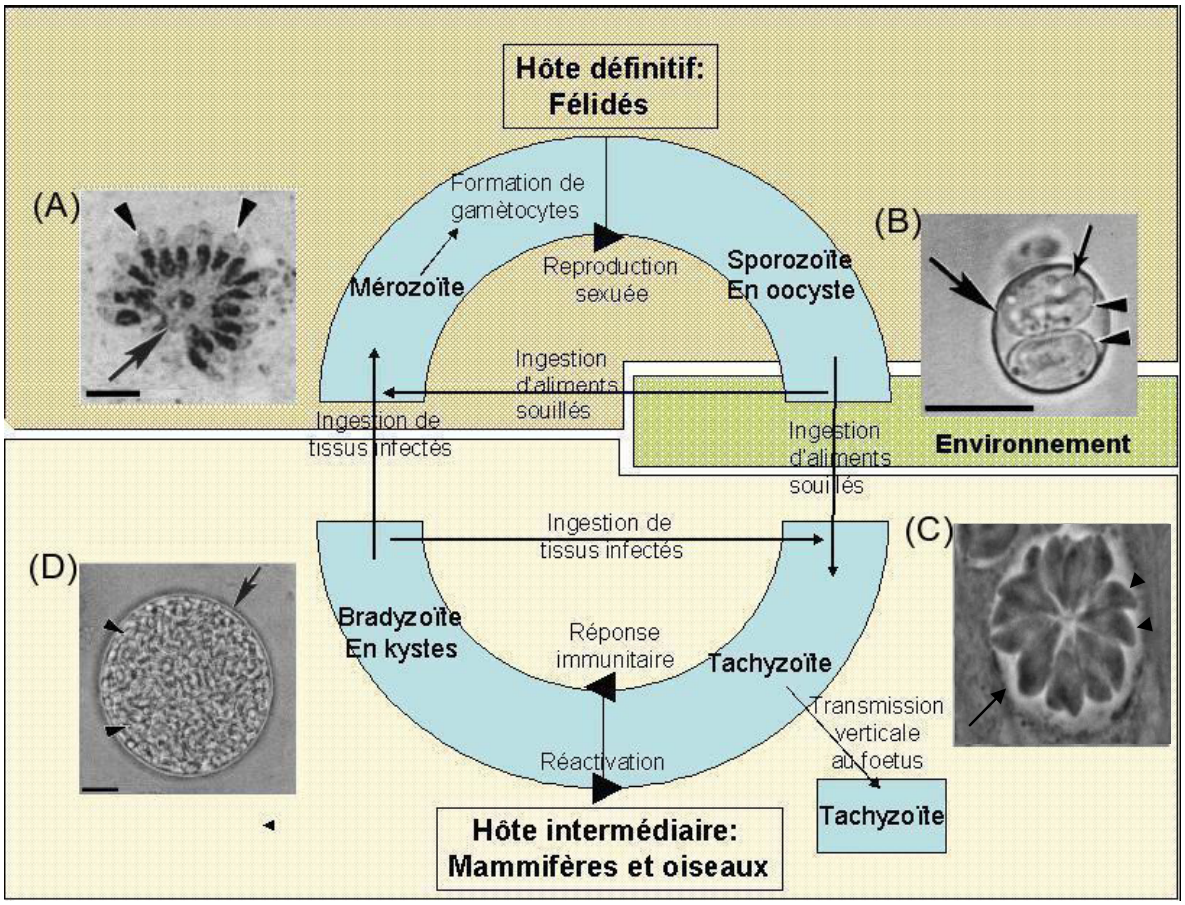


Figure 3: Cycle vital de *T. gondii*. (A) Mérozoïtes (têtes de flèches) contenus dans une vacuole transitoire (flèche). (B) Sporozoïtes (têtes de flèches) contenus dans un oocyste, dont la paroi est indiquée par une flèche. (C) Tachyzoïtes (têtes de flèches) contenus dans une vacuole parasitophore (flèche). (D) Bradyzoïtes (têtes de flèches) contenus dans un kyste à paroi épaisse (fléche). Les images A,B,D sont tirées de Hill et Dubey (2002), et l'image C du travail réalisé au cours de cette thèse.

En plus des enjeux médicaux concernant directement *T. gondii*, ce parasite apparaît comme un modèle de laboratoire précieux pour l'étude du parasitisme intracellulaire. En effet, *T. gondii* remplit plusieurs critères essentiels pratiques pour des approches expérimentales :

(i) la forme tachyzoïte est facilement cultivée *in vitro* car le parasite est capable d'envahir et de se multiplier dans de nombreux types cellulaires ;

(ii) le génome de *T. gondii* est complètement séquencé et en cours d'assemblage ([ToxoDB] : http ://www.toxodb.org) ;

(iii) les transfections transitoires et stables sont possibles ; en particulier la création de parasites "knock-out" (KO) permettant l'arrêt de l'expression d'un gène en réponse à un agent chimique peut être réalisée (KO inductibles);

(iv) des modèles animaux (souris, rats) respectivement sensibles ou résistants à l'infection par *T. gondii* sont identifiés.

Malgré des différences importantes de biologie cellulaire et de métabolisme au sein du phylum Apicomplexa, *T. gondii* représente donc un modèle crucial pour comprendre la biologie des Apicomplexa, en particulier pour les analyses de structures intracellulaires simples à visualiser à l'aide de nombreuses sondes moléculaires, pour l'étude de processus dynamiques tels que le mécanisme d'invasion et pour le développement de drogues anti-parasitaires.

III. La toxoplasmose

La toxoplasmose est une infection bénigne dans la majorité des cas. Cette infection se traduit par deux phases : une phase aiguë lors de la primo-infection par la forme tachyzoïte proliférative. Cette phase est rapidement endiguée par la réponse immunitaire de l'hôte. Elle est suivie d'une phase chronique asymptomatique (forme bradyzoïte enkystée) qui provoque peu d'effets connus chez un sujet immunocmpétent et stimule une immunité protectrice contre une réinfection. Les kystes, contenant des bradyzoïtes, n'entraînent pas directement de lésions tissulaires mais sont susceptibles de réactiver à la faveur d'un déficit immunitaire.

La gravité de cette infection est liée d'une part, au risque de transmission du parasite au fœtus en cas de primo-infection de la mère en cours de grossesse. La gravité des manifestations (choriorétinites, atteintes cérébrales), peut aller jusqu'à l'avortement spontané, selon le stade de la grossesse au cours duquel l'infection se produit. Cette forme congénitale de la toxoplasmose reste un problème majeur de santé dans les pays développés. C'est aussi un problème vétérinaire important car la toxoplasmose congénitale est responsable de très nombreux cas d'avortements spontanés dans les élevages ovins et caprins. Par ailleurs, la gravité de l'infection par *T. gondii* est liée au risque de réactivation de l'infection dans le cas d'une immunodépression, comme c'est

le cas chez les patients traités par chimiothérapie, sous traitements immuno-dépresseurs ou atteints par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ces réactivations provoquent une encéphalite, mortelle si elle n'est pas rapidement traitée.

Bien qu'une seule espèce, *T. gondii*, soit décrite au sein du genre Toxoplasma, plus de 200 isolats ou souches ont bénéficié à ce jour d'analyses génotypiques. La pathogénicité des souches est définie par l'étude de la virulence chez la souris : détermination des DL50 et DL100, doses de parasites minimales entraînant la mort de 50% ou de 100% des souris infectées. La plupart des isolats analysés (95%) sont généralement regroupés en 3 génotypes principaux (types I, II et III) en fonction de leur virulence (Howe et Sibley, 1995, Howe et al., 1996). Ces génotypes diffèrent très peu génétiquement (moins de 1%). Le génotype I est très virulent (*e.g.* souche RH) : la DL100 est de 1 ou 2 parasites. Les génotypes II (*e.g.* souche Prugniaud) et III (*e.g.* souche C) sont avirulents ou de virulence intermédiaire (DL50 $\geq 10^3$ parasites). La souche RH, utilisée pour la majorité des études expérimentales de cette thèse, est l'une des souches les plus virulentes mais aussi des mieux caractérisées : une souris infectée par un parasite meurt en moins de 15 jours (Howe et al. 1996).

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

Depuis quelques années, des progrès significatifs ont été réalisé dans l'identification de molécules induisant une réponse immunitaire protectrice et pouvant être considérées comme des candidats vaccinaux contre la toxoplasmose. Ces molécules sont surtout des antigènes de surface ainsi que des antigènes sécrétés par *T. gondii*. Ces candidats, seuls ou en cocktail, sont au stade expérimental sur des modèles animaux. Un vaccin commercial (Toxovac®, AgVax Developments Ltd.) basé sur l'infection par une forme atténuée de tachyzoïtes est employé avec succès contre l'infection congénitale chez la brebis (Buxton et Innes, 1995). La vaccination par des parasites vivants atténués ne peut pas être envisagée pour l'homme, en particulier à cause des risques potentiels de réactivation.

IV. La synthèse de galactolipides chloroplastiques : une cible pour de nouveaux modèles de thérapies antitoxoplasmiques ?

La découverte chez *T. gondii* d'un organite d'origine végétale spécifique des Apicomplexa, l'apicoplaste, détaillé dans la partie B du chapitre Bibliographique de ce manuscrit, a ouvert de nouvelles voies de recherche pharmacologique, visant à développer des médicaments-herbicides. La généalogie des apicomplexes reflète en effet des héritages différents, suivant que les gènes ont été soit hérités de l'algue rouge qui a été ingérée au cours de l'endosymbiose secondaire à l'origine de l'apicoplaste, soit hérités de l'eucaryote secondaire.

Dans un organisme végétal simple tel qu'*Arabidopsis thaliana*, une généalogie des gènes nucléaires montre déjà des héritages distincts selon les endosymbioses primaires à l'origine des mitochondries et des chloroplastes simples. L'équipe de William Martin (Rujan et Martin, 2001; Martin et al., 2002; Martin, 2003) a déterminé qu'environ 18% du génome d'*Arabidopsis* était d'origine cyanobactériale. Les protéines plastidiales codées par le noyau sont dotées de séquences d'adressage leur permettant d'être transférées vers l'organite. Certaines protéines héritées de la cyanobactérie ancestrale remplissent des fonctions analogues à celles documentées chez les procaryotes ; d'autres remplissent de nouvelles fonctions propres à la cellule eucaryote.

Suite à l'endosymbiose secondaire qui a donné naissance au phylum des Apicomplexa (détaillée dans la partie Bibliographique), de nombreux gènes hérités d'une cyanobactérie ancestrale (pour certaines fonctions conservées de l'apicoplaste) ainsi que du génome nucléaire de l'algue rouge, sont attendus dans le génome nucléaire. La caractéristique végétale la plus spectaculaire étant l'apicoplaste, il a été très vite proposé que cet organite soit une cible tout à fait intéressante pour de nouveaux traitements thérapeutiques de type herbicide (Fichera et Roos, 1997; pour revue McFadden et Roos, 1999; Maréchal et Cesbron-Delauw, 2001; Wiesner et Seeber, 2005; Bisanz et al., 2006). Les processus végétaux hérités de l'algue rouge ne se réduisent pas aux processus plastidiaux. De nombreuses autres voies biochimiques caractéristiques des plantes ont par ailleurs été mises en évidence (métabolisme du folate, transduction de signaux par les kinases CDPK, etc. pour revue, Maréchal et Cesbron-Delauw, 2001).

Chez les organismes photosynthétiques, le plaste est un organite vital. L'étude de mutants invalidés dans la division de l'apicoplaste a montré qu'il en était de même chez les Apicomplexes (He et al., 2001), avec cependant un délai avant d'observer des effets délétères (voir Partie Bibliographique). Le fait que la mise en place des membranes du plaste chez les plantes repose en majeure partie sur la synthèse des galactolipides (monogalactosyldiacylglycérol, ou MGDG et digalactosyldiacylglycérol ou DGDG), fait de cette voie métabolique une cible potentielle pour des herbicides touchant le développement de la plante entière.

La synthèse de lipides aux propriétés chromatographiques indiscernables du MGDG et du DGDG a été mesurée chez les *T. gondii* (Maréchal et al., 2002). Il a été supposé que les activités galactosyltransférases permettant de produire des galactolipides chloroplastiques étaient présentes chez *T. gondii* et qu'elles pourraient être localisées au niveau des membranes de l'apicoplaste.

Au cours de ma thèse, suivant cette hypothèse initiale, j'ai tout d'abord contribué à la validation d'un modèle de la structure de l'enzyme majeure de la voie de synthèse des galactolipides chez les Angiospermes, *i.e.* la MGDG synthase (Chapitre I des Résultats)

1) progresser dans la compréhension du fonctionnement de cette enzyme,

2) proposer des informations structurales afin d'explorer la phylogénie moléculaire difficile pour cette famille d'enzymes chez les eucaryotes dotés de plastes,

3) aider à la rationalisation d'une recherche de composés inhibiteurs.

J'ai ensuite participé à la caractérisation de nouveaux inhibiteurs des MGDG synthases de plantes sélectionnés par un criblage pharmacologique à haut débit (Chapitre II) et j'ai déterminé l'effet de ces composés et de leurs dérivés de synthèse sur *Toxoplasma gondii*.

Enfin, j'ai entrepris une étude des lipides membranaires de *T. gondii* reconnus par un anticorps dirigé contre le DGDG chloroplastique, au cours du développement parasitaire (Chapitre III) et j'ai engagé une caractérisation de cette classe de lipide pour des applications diagnostiques et vaccinales éventuelles (Chapitre IV). Au cours de ce travail de thèse, j'ai également participé à l'établissement du lipidome global de *T. gondii* (travail présenté en Annexe).

Partie Bibliographique : Métabolisme et dynamique des acyl-lipides chez les organismes eucaryotes dotés de plastes

I. Introduction

Les lipides ont été définis pragmatiquement comme étant les corps gras qui composent le Vivant, une propriété physicochimique d'hydrophobicité qui peut être portée par une grande diversité structurale, allant de molécules compactes polycycliques telles que les stérols, aux longues chaînes de carbones telles que les dérivés des acides gras ou des isoprénoïdes.

Quelques grandes *classes de lipides* peuvent être reconnues, au sein desquelles une formidable diversité moléculaire est toutefois difficile à décrire simplement. Les tentatives récentes pour proposer une classification valable pour l'ensemble des lipides (Consortium Lipid Maps, [Lipid Maps]) se heurtent à cette diversité et n'évitent pas l'élaboration d'un catalogue. Les représentations de schémas métaboliques lipidiques universels (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, [KEGG] ; MetaCyc Encyclopedia of Metabolic Pathways, [MetaCyc]) ne sont pas aussi simples que celles des voies métaboliques de composés hydrosolubles ; elles ne couvrent qu'une petite partie des voies connues et ne permettent pas de représenter la compartimentation cellulaire. Alternativement, les initiatives pour représenter des voies métaboliques qui soient spécifiques d'organismes donnés, par exemple les plantes (Plant Lipid Metabolic Pathways, de l'Université du Michigan, base maintenue par F. Beisson [Plant Lipid Metabolic Pahtways]) ou les Apicomplexes (Malaria Metabolic Pathways, de l'Université de Jérusalem, base maintenue par H. Ginsburg [Malaria Metabolic Pathways]) permettent une représentation plus fine du métabolisme des lipides et de leur compartimentation, mais les initiatives ne sont pas adaptées aux approches comparatives.

Les lipides sont dits *polaires* lorsqu'ils sont amphiphiles, c'est-à-dire lorsqu'ils possèdent une partie hydrophile (souvent appelée « tête » hydrophile) et une partie hydrophobe (souvent appelée « queue » hydrophobe). Les lipides polaires sont les composants essentiels qui structurent les membranes biologiques, sous forme d'une bicouche très dynamique dans laquelle s'insèrent des protéines (modèle de la mosaïque fluide, Singer et Nicolson, 1972). Les lipides n'ont pas uniquement un rôle structural pour la compartimentation cellulaire. Ils possèdent également d'autres fonctions vitales : ils sont précurseurs métaboliques, servent pour le stockage de l'énergie et représentent d'importantes molécules de signalisation. (Dowhan, et Bogdanov, 2002 ; Eyster, 2007).

Nous n'aborderons dans ce chapitre que la classe des molécules lipidiques polaires construites à partir des acides gras, appelés *acyl-lipides*. La plupart des acyl-lipides membranaires sont constitués d'acides gras liés :

(i) *via* une liaison ester ou éther, à un trialcool, le glycérol (formation de glycérolipides) ou à d'autres alcools tels que le cholestérol (formation de stérols) ;

(ii) *via* une liaison amide à des bases sphingoides (céramides, sphingolipides et gangliosides) ou plus rarement à des amines.

Dans une première partie, nous décrirons l'ensemble des acyl-lipides membranaires ainsi que les grandes voies de synthèse dont ils dépendent chez l'ensemble des eucaryotes. Nous décrirons succinctement les moyens mis en œuvre par les cellules eucaryotes pour leur compartimentation, maintenir l'homéostasie et faciliter la dynamique des membranes biologiques. Dans une seconde partie, nous décrirons les particularités de la compartimentation membranaire ainsi que du métabolisme et de la dynamique lipidique chez les plantes, en soulignant le fait que le plaste est un site particulier de synthèse d'acides gras et de glycérolipides pour l'ensemble de la cellule végétale. Enfin, dans une troisième partie, nous décrivons la specificité de la compartimentation membranaire et l'état des connaissances sur le métabolisme et la dynamique lipidique chez *Toxoplasma gondii*, modèle de parasite Apicomplexe pour ce travail.

II. Les acyl-lipides membranaires dans les cellules eucaryotes

A. Les grandes classes d'acyl-lipides

1. Les acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques comportant une chaîne aliphatique de longueur variable. Cette chaîne de carbones peut être simple (saturée ou insaturée), ou encore modifiée par différentes substitutions (méthylations, oxydations, cyclisations). A ce jour, plus d'un millier d'acides gras naturels ont été décrits [The Lipid Library]. Outre leur rôle d'élément constitutif de base pour l'ensemble des classes d'acyl-lipides, les acides gras sont aussi une source d'énergie pour la cellule ; ils peuvent agir comme messagers intracellulaires ou comme précurseurs de molécules impliquées dans les voies de signalisation (hormones, messagers).

- ***Nomenclature des acides gras simples***

Les acides gras simples peuvent être classés en 3 grands groupes structuraux : les *acides gras saturés* (ne possédant pas de double liaison) et les *acides gras mono-* et *poly-insaturés*. Chaque acide gras peut être distingué par :

(i) un nom systématique, issu de la (stéréo)chimie de sa structure ;

(ii) un nom trivial, le plus souvent en rapport avec sa découverte ;

(iii) un nom raccourci, donnant les caractéristiques structurales principales (voir Tableau 1).

Les acides gras les plus rencontrés dans les cellules eucaryotes ont une taille variant de 16 à 18 carbones et comprennent de 0 à 3 insaturations. Ces insaturations sont soit en conformation *cis,* soit en conformation *trans*, ce qui confère une structure spécifique à l'acide gras qui les porte. Certains acides gras poly-insaturés sont dits essentiels, c'est-à-dire que l'organisme est incapable de les synthétiser *de novo* ; un apport par le régime alimentaire est donc indispensable. Ce terme ne s'applique qu'aux animaux puisque les végétaux sont autonomes pour la synthèse de l'ensemble des acides gras.

- *Les acides gras saturés*

Les machineries de biosynthèse d'acides gras produisent majoritairement l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0) qui sont de fait les acides gras saturés les plus abondants (voir paragraphe II. B. 1). Le C16:0 représente 20-30% des lipides dans la plupart des tissus animaux et 10-40% des lipides végétaux (Gunstone et al, 1994 ; Gurr et al, 2002). Le C18:0 est lui aussi très abondant dans l'ensemble des tissus animaux et végétaux. 80% des gangliossides (voir paragraphe II. A. 3) sont composés de C18:0.

- *Les acides gras insaturés*

Les acides gras insaturés sont majoritairement des acides gras en C18 et en C16 (acides gras ubiquitaires). L'acide oléique (*cis*-9-C18:1) est de loin, le plus abondant dans les lipides structuraux de cellules animales et végétales. Les acides gras poly-insaturés les plus courants sont les acides linoléique (C18:2) et α-linolénique (C18 :3), précurseurs de nombreux médiateurs cellulaires dont les eicosanoïdes (thromboxanes, prostaglandines, leucotriènes, jasmonates). Les acides linoléique (C18:2) et α-linolénique (C18 :3) sont des acides gras essentiels pour les cellules animales. La désaturation de l'acide palmitique (C16:0) peut conduire à l'introduction d'une double liaison à des positions différentes chez les animaux (acide palmitoïque, *cis*-9-C16 1) et les plantes (groupement *cis*-7-C16:1 des galactolipides ou *trans*-3-C16:1t du phosphatidylglycérol). La notation C16:1t permet de désigner ce dernier, alors que la notation C16:1 est ambigüe (voir Tableau 1). La détermination des profils d'acides gras d'extraits biologiques nécessite une analyse extrèmement fine (par méthodes couplant spectroscopie infra-rouge, chromatographie phase gazeuse, chromatographie couche mince, chromatographie liquide, spectrométrie de masses ; Ledoux et al., 2000)afin de distinguer ces isomères.

Il n'est par exemple, pas encore établi si certains organismes tels que les Apicomplexes, qui présentent des structures végétales, contiennent des acides gras de type *cis*-7-C16:1 ou *trans*-3-C16:1t.

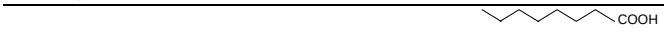
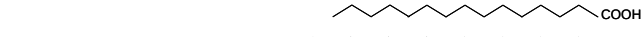
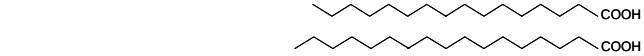
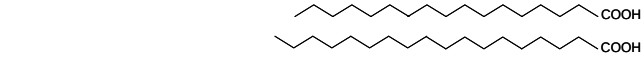
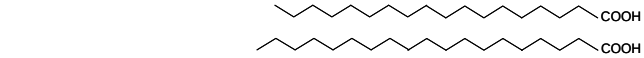
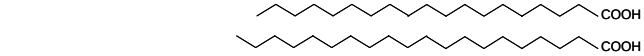
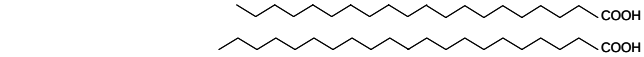
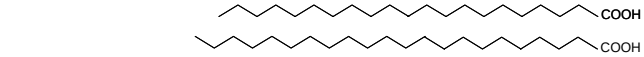
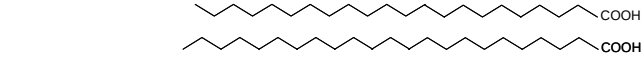
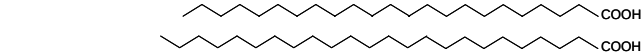
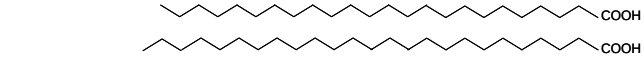
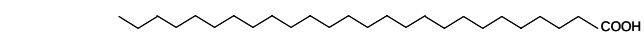
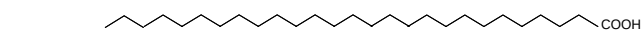
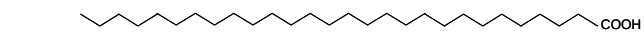
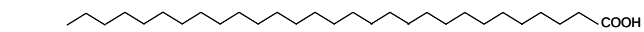
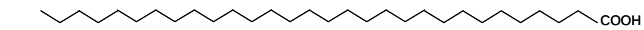
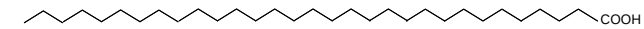
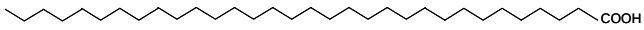
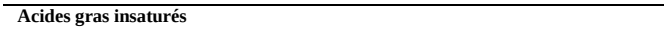
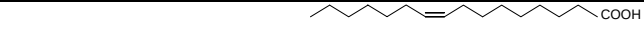
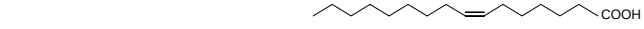
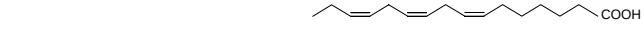
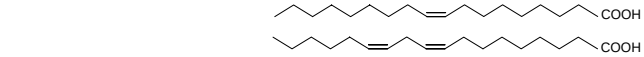
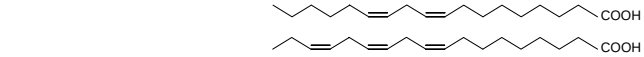
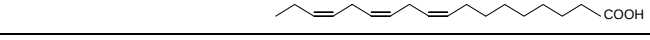
	Nom systématique	Nom trivial	Désignation raccourcie
Acides gras saturés			
	octanoïque	Caprylique	8:0
	nonanoïque		9:0
	décanoïque	Caprique	10:0
	undécanoïque		11:0
	dodécanoïque	Laurique	12:0
	tridécanoïque		13:0
	tetradécanoïque	Myristique	14:0
	pentadécanoïque		15:0
	hexadécanoïque	Palmitique	16:0
	heptadécanoïque	Margarique	17:0
	octadécanoïque	Stéarique	18:0
	nonadécanoïque		19:0
	eicosanoïque	Arachidique	20:0
	henéicosanoïque		21:0
	docosanoïque	Béhénique	22:0
	triquéosanoïque		23:0
	tétracosanoïque	Lignocérique	24:0
	pentacosanoïque		25:0
	hexacosanoïque		26:0
	heptacosanoïque		27:0
	octacosanoïque		28:0
	nonacosanoïque		29:0
	triacontanoïque		30:0
	hentriacontanoïque		31:0
	dotriacontanoïque		32:0
Acides gras insaturés			
	*cis*-9-hexadecénoïque	Palmitoléique (graisse de baleine)	16:1
	*cis*-7-hexadecénoïque	≠Palmitoléique (lipides de plantes)	16 :1
	trans-3-hexadecénoïque	≠Palmitoléique (groupement acyl du PG chez les plantes)	16:1t
	cis-7,*cis*-10-hexadécadiénoïque		16:2
	*cis*-7,*cis*-10,*cis*-13-hexadécatriénoïque		16:3
	*cis*-9-octadecénoïque	Oléique	18:1
	*cis*-9,*cis*-12-octadécadiénoïque	Linoléique	18:2
	9-*cis*,12-*cis*,15-*cis*-octadécatriénoïque	αLinolénique	18:3

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principaux acides gras simples, saturés et insaturés. La désignation raccourcie indique en premier chiffre, la longueur de la chaîne aliphatique et en deuxième, le nombre d'insaturations portées.

- ***Les acides gras substitués***

Les acides gras peuvent subir de multiples transformations telles que des branchements de groupes aliphatiques (Dembitsky et al, 2003), des couplages avec des isoprénoïdes, des cyclisations et/ou des oxydations (fréquent chez les plantes, Smith, 1971).

- ***Rôle des acyls dans l'intégrité et la dynamique des membranes biologiques***

Quantitativement, les acides gras sont surtout utilisés comme donneurs de groupements acyls, permettant de constituer des lipides polaires membranaires. Les acyls sont localisés *in fine* dans la partie médiane des bicouches lipidiques. Ils fournissent aux membranes biologiques, leur qualité de « mur hydrophobe » et permettent de ce fait, l'établissement d'une compartimentation cellulaire, avec des équilibres et des échanges contrôlés de part et d'autre des membranes. La Figure 1 montre le modèle de la mosaïque fluide des membranes biologiques où s'insèrent les protéines (figure déduite du modèle de Singer et Nicholson 1972) avec, en encart bleu, un modèle qui montre la complexité des lipides membranaires qui la composent. Il est interréssant de noter la grande diversité des acides gras des lipides membranaires (Figure 1, encart bleu, acides gras en gris avec une extrémité jaune).

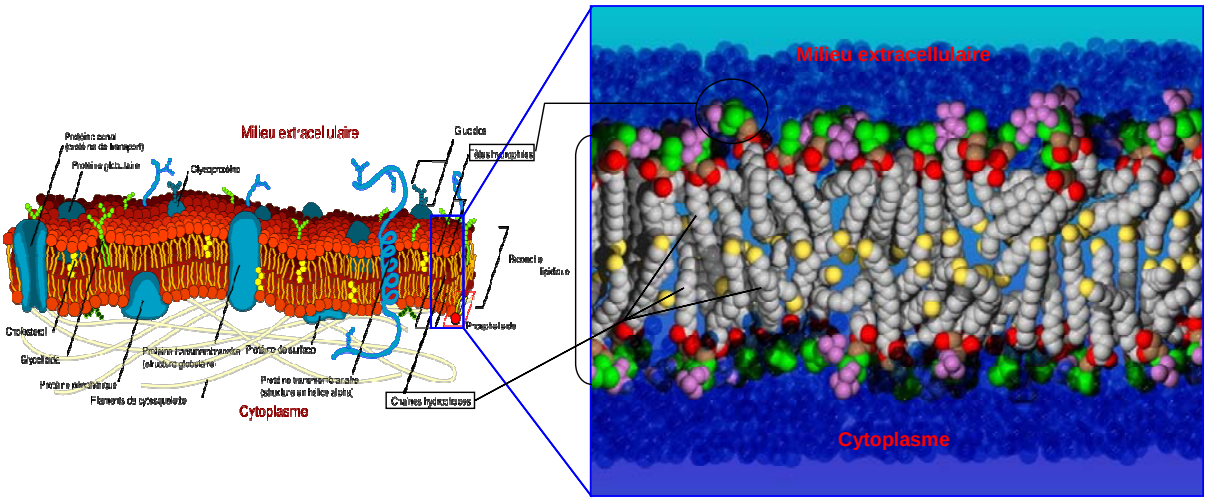


Figure 1 : Rôle des groupements acyls dans l'organisation des membranes biologiques. L'organisation membranaire forme une mosaïque dans laquelle s'insèrent les protéines (à gauche ; Singer et Nicolson, 1972). L'encart bleu (à droite) représente une partie de la membrane biologique, sans protéines : les acyls sont représentés en gris (avec une extrémité jaune). Les têtes polaires sont exposées aux deux surfaces de la membrane (oxygènes en rouge, groupement phosphate en vert, tête polaire de la choline en mauve), exposées aux compartiments aqueux (en bleu, de part et d'autre de la membrane). Les particularités structurales (longueur de chaîne, degré et conformation des insaturations) entraînent une grande diversité des groupements acyls qui confèrent certaines propiétés dynamiques aux membranes biologiques et qui permettent l'interaction avec les protéines membranaires.

Le degré de saturation ainsi que la conformation de la double liaison (*cis*- ou *trans*-) (Figure 2A) déterminent pour chaque acide gras un équilibre entre rigidité et flexibilité. Le profil des groupements acyls présents dans une membrane est donc lié à des propriétés dynamiques à l'échelle membranaire : de nombreuses insaturations apportent une plus grande fluidité, accentuée par exemple par une conformation en *cis* de ces doubles liaisons (Figure 2B).

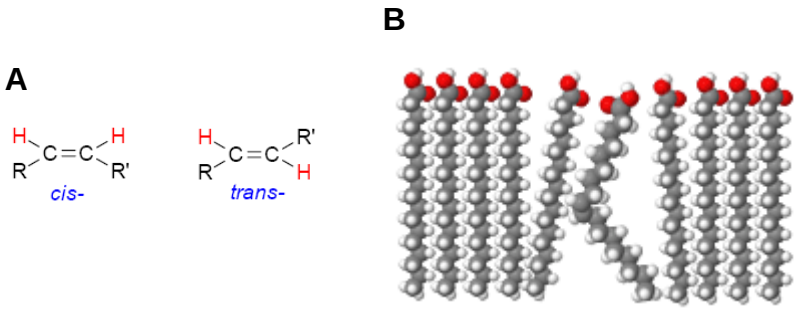


Figure 2 : Conformations stéréochimiques des insaturations des groupements acyls et leur implication dans la fluidité membranaire. A. Représentation stéréochimique *cis*- et *trans*- de groupements chimiques autour d'une double liaison (gauche). B. Représentation atomique d'un lipide portant un acide gras insaturé au centre d'une monocouche, modifiant la fluidité latérale de la membrane.

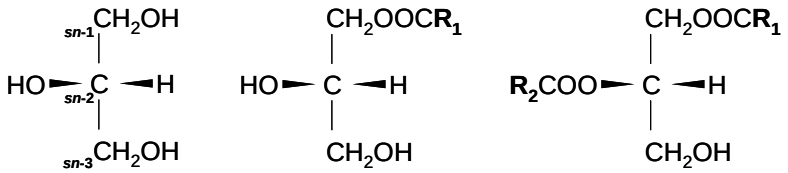
La fluidité membranaire n'est pas uniquement conditionnée par la nature des groupements acyls. Le cholestérol rencontré dans tous les tissus animaux, module aussi la fluidité membranaire en interagissant avec ses composants lipidiques, en particulier les phospholipides (Ohvo-Rekila et al, 2002) et plus particulièrement, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline. L'estérification des stérols par les acides gras constitue une forme de transport et de stockage préférentiel sous forme de particules lipidiques intracellulaires souvent associées à des lipoprotéines. Le couplage du cholestérol est réalisé avec les acides gras composant la phosphatidylcholine (Jonas, 2000).

En conclusion, les acides gras sont des acides carboxyliques ayant une grande diversité structurale, impliqués dans des fonctions cellulaires vitales (structure des membranes, métabolisme du carbone et métabolisme énergétique, signalisation). Ils jouent un rôle quantitatif et qualitatif vital pour l'intégrité cellulaire et sa compartimentation, en tant que composants indispensables à la biosynthèse de lipides membranaires tels que les glycérolipides et les sphingolipides dont nous décrirons les caractéristiques et les voies de biosynthèse.

2. Les glycérolipides

• *Définition et nomenclature des principaux glycérolipides*

Les glycérolipides représentent la majorité des lipides membranaires. Ce sont des esters du glycérol, un trialcool (Figure 3A) sur lequel un, deux ou trois hydroxyl(s) peuvent être liés à une chaîne d'acide gras *via* une liaison ester. La position des acyls sur le glycérol est notée suivant le système de nomenclature « stereospecific number » (*sn*) (Figure 3).



A. glycérol **B. *sn*-1 monoacylglycérol** **C. *sn*-1,2-diacylglycérol**

Figure 3 : Représentation de Fischer des acyl-glycérols comportant des acides gras estérifiés en position sn-1, sn-2 et sn-3 du glycérol. (A) Nomenclature *sn* ; (B) Exemple de *sn*-1-monoacylglycérol ; (C) Exemple de *sn*-1,2-diacylglycérol. R_1 et R_2 : deux groupements acyls.

En général, les lipides membranaires sont des glycérolipides formés d'un glycérol dont les positions *sn*-1 et *sn*-2 sont occupées par une chaîne d'acide gras ; ils portent par contre, une tête polaire en position *sn*-3. Ils ont donc tous pour base commune le squelette du diacylglycérol (Figure 3C).

L'ensemble des glycérolipides membranaires est synthétisé à partir de l'acylation séquentielle du glycérol-3-phosphate issu de la glycolyse formant tout d'abord l'acide lysophosphatidique puis l'acide phosphatidique. L'acide phosphatidique permet ensuite la synthèse du diacylglycérol (DAG) et du cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG). Ces 3 lipides constituent les précurseurs nécessaires à la néosynthèse de l'ensemble des glycérolipides (Figure 4). La Figure 4 résume l'ensemble des voies de biosynthèse des glycérolipides qui sera détaillé dans le paragraphe B-2.

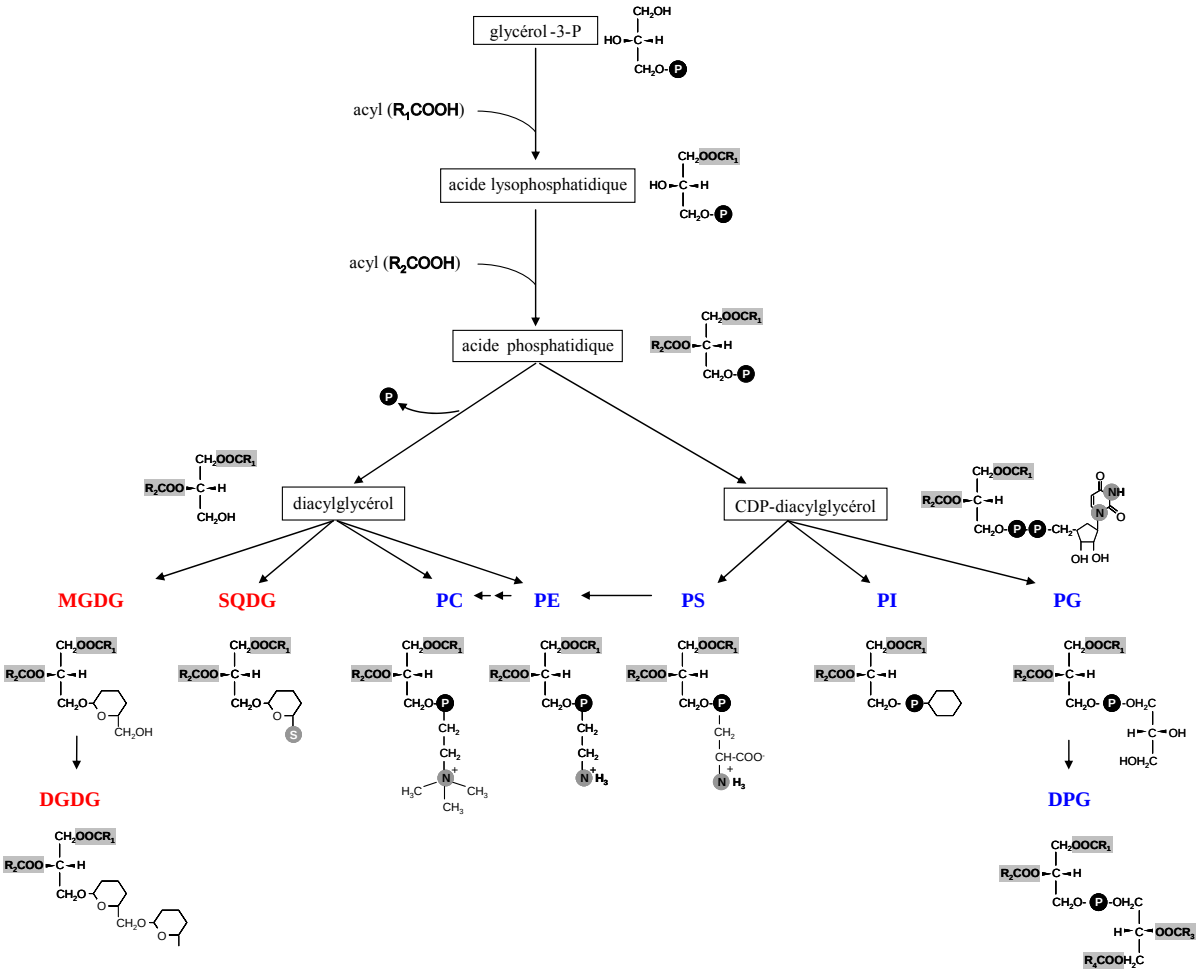


Figure 4 : Voies générales de synthèse des glycérolipides. Les glycolipides sont indiqués en rouge, les phospholipides en bleu et les précurseurs hydrophobes de ces lipides sont encadrés. DPG, diphosphatidylglycérol (ou cardiolipide) ; DGDG, digalactosyldiacylglycérol ; MGDG, monogalactosyldiacylglycérol ; PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; PS, phosphatidylsérine ; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol ; (S) groupement sulfate ; (P), groupement phosphate.

- ***Les précurseurs des glycérolipides membranaires***

- *L'acide phosphatidique (AP)*

L'acide phosphatidique (AP) peut être généré par différentes voies (détaillées dans la partie biosynthèse B-2). L'AP est à la fois le précurseur central de la synthèse des glycérolipides et un messager intracellulaire important (Bargmann et Munnik, 2006 ; Wang et al, 2006). Il ne s'accumule donc que transitoirement et de ce fait, son contenu en acides gras ainsi que sa teneur dans les différentes membranes restent difficiles à déterminer.

- *Le diacylglycérol (DAG)*

La nature des acides gras formant le DAG dépend de la voie dont il est issu (voir synthèse du DAG, paragraphe B-2). Comme l'AP, le DAG est à la fois un précurseur métabolique et un messager cellulaire (Wakelam, 1998). Du fait de la faible taille de sa tête polaire, il introduit une courbure négative facilitant la fission ou la fusion membranaire, ces courbures peuvent alors augmenter les interactions hydrophobes avec les protéines de ces zones et donc modifier leur activité (Carrasco et Mérida, 2007 ; Goñi, et Alonso, 1999). On peut aussi observer la présence de monoacylglycérol (MAG) dans certains tissus animaux et végétaux mais uniquement en très faible quantité du fait de ses propriétés déstabilisantes des membranes.

- *Le cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG) :*

Ce liponucléotide qui est à l'origine de nombreux glycérolipides, n'est que très rarement détecté au niveau des membranes eucaryotes. En effet, il ne représente que 0,05% du total des phosphoglycérolipides car il est immédiatement transformé en phosphatidylinositol (PI) ou en phosphatidyléthanolamine (PE) après sa synthèse à partir d'AP au niveau du réticulum endoplasmique (voir Tableau 2). Le CDP-DAG est le précurseur de synthèse du phosphatidylglycérol (PG) dans les membranes des plastes et des mitochondries. Son contenu en acide gras est proche de celui de lipides dont il est le précurseur et particulièrement, du PI. On pense que ceci serait dû à une sélection de l'enzyme responsable de sa synthèse plutôt qu'à des réactions de déacylation/ré-acylation. On ne sait pas si le CDP-DAG possède d'autres fonctions que celle de précurseur. Toutefois, une activité anti-cancéreuse *in vitro* a été rapportée pour le CDP-DAG, ce qui suggère un rôle possible dans des voies de signalisation (Heacock et Agranoff, 1997).

Le Tableau 2 récapitule brièvement la structure, les fonctions principales et la localisation des trois précurseurs des glycérolipides.

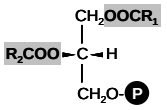
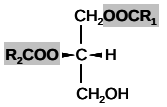
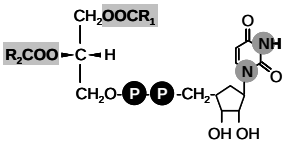
Nom	Structure schématique	Fonctions principales	Localisation
Acide phosphatidique (AP)		• Précurseur général de synthèse des glycérolipides (DAG et CDP-DAG) • Messager intracellulaire	• Ubiquitaire, formé selon les besoins cellulaires.
Diacylglycérol (DAG)		• Précurseur pour la synthèse de glycérolipides phosphatés (PE, PC) ou non (MGDG, DGDG, SQDG) • Messager intracellulaire	• Formé selon les besoins cellulaires. • Présent dans les zones de courbures membranaires
Cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG)		• Précurseur pour la synthèse de phospholipides (PS, PE, PC, PG, DPG)	• Réticulum, mitochondrie, plastes

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des principaux précurseurs des glycérolipides, l'acide phosphatidique, le diacylglycérol et le CDP-diacylglycérol.

- ***Les phosphoglycérolipides***

Les phosphoglycérolipides[1] sont des glycérolipides dont le groupement polaire porte un groupement phosphate. Comme montré sur le Tableau 3, les glycérolipides sont classés en fonction de la charge globale dont ils sont porteurs ainsi que de l'encombrement de leur tête polaire et donc de leur capacité à s'organiser spontanément en bicouche lipidique. Dans ce paragraphe, nous détaillons les caractéristiques structurales des grandes classes de phosphoglycérolipides ainsi que leurs fonctions principales.

- *La phosphatidylcholine (PC)*

La PC est le lipide le plus abondant des membranes de cellules animales et végétales, constituant jusqu'à 50% de leur composition totale. Sa charge est neutre et elle semble contenir plus d'acides gras en C18 que les autres phospholipides même si cette composition est sujette à de nombreuses et profondes transformations telles que des déacylations/ré-acylations. Dans les cellules animales, elle est essentiellement composée de C16:0, C18:0, C18:1 et C18:2, voire de C20:4, selon les tissus.

[1] Le terme « phospholipide », souvent employé pour désigner les glycérolipides, est un terme ambigu puisqu'il qualifie aussi les sphingolipides phosphatés. Dans ce manuscrit, ce terme sera dans la mesure du possible ; utilisé dans son sens large.

De par sa forme « cylindrique », la PC s'organise spontanément en bicouche. Sa structure lui permet donc de servir en tant qu'élément structurant des membranes et compenser les propriétés de lipides « déstabilisateurs » de membranes (lipides de structure dite « hexagonale ») ou formant des microdomaines membranaires. Elle est préférentiellement localisée dans le feuillet externe des membranes dont elle fait partie. La disparition de la PC provoque une inhibition de croissance et parfois la mort cellulaire chez de nombreux eucaryotes supérieures, à l'exception notable de la levure (de Kroon, 2007). Au delà de son rôle structural majeur, la PC est impliquée dans la signalisation intracellulaire, notamment en tant que source de DAG. Au niveau du noyau, la PC stabiliserait la chromatine [The Lipid Library]. La PC est aussi l'un des principaux lipides circulant dans le plasma sanguin, en tant que composant des lipoprotéines de type HDL (High Density Lipoproteins, impliquées dans le transport du cholestérol estérifié). Enfin, la PC est un précurseur de la sphingomyéline. Elle assure donc un lien métabolique fort entre les glycérolipides et les sphingolipides (Xu, 2002).

- *La phosphatidyléthanolamine (PE)*

La PE est le deuxième lipide le plus abondant chez les animaux et les végétaux. Ce lipide neutre constitue donc un élément clé de la construction des bicouches lipidiques. Dans les cellules animales, la PE existe sous forme diacyl (acides gras estérifiés sur le squelette glycérol), alkylacyl (un des acides gras est lié au glycérol par liaison éther) ou bien alcènylacyl [The Lipid Library]. La PE est riche en acide arachidonique ainsi qu'en acide docosahexaenoïque (Tableau 1), présents le plus souvent en position *sn*-2. Chez les plantes telles qu'*Arabidopsis*, la PE est essentiellement composée de C16:0, C18:2 et C18:3 (Cronan, 2003 ; Christie, 2003). Par analogie avec son rôle chez *Escherichia coli*, on pense que la PE contribue à l'assemblage des protéines dans les membranes biologiques (Bogdanov et Dowhan, 1999). Il existe plusieurs voies de synthèse de la PE, *via* le DAG ou le CDP-DAG (voir Figures 4 et 8). La PE est un précurseur important pour la synthèse de PC.

- *La phosphatidylsérine (PS)*

La PS est un phospholipide largement distribué chez les plantes, les animaux et les microorganismes [The Lipid Library]. Elle représente en général moins de 10% du contenu lipidique total mais elle est particulièrement abondante au niveau de la membrane plasmique et du reticulum endoplasmique (10-20% des lipides totaux). Du fait des réactions d'acylation-déacylation et d'interconversion entre phospholipides, il est difficile de déterminer une composition standard en acides gras de la PS. Néanmoins, la composition en acides gras chez *Arabidopsis*, ressemble à celle de la PE. En tant que phospholipide anionique, la PS possède une capacité à chélater les cations et plus particulièrement, le calcium qui modifie alors la conformation de la tête polaire, ce qui peut avoir des conséquences sur le rôle de la PS.

La PS est à la croisée de très nombreuses voies métaboliques. La PS est impliquée dans l'échange de têtes polaires entre phospholipides (PE, PC) et elle constitue donc un

précurseur pour leurs synthèses. La PS est localisée sur le feuillet interne des membranes dont elle fait partie. Cette particularité a une incidence sur sa fonction: lors des phénomènes d'apoptose chez les mammifères par exemple, la PS est présentée vers l'extérieur de la membrane, ce qui signale les cellules apoptotiques aux cellules immunitaires; le même phénomène dit de *flip-flop* est observé dans les plaquettes sanguines, ce qui permet l'activation de la prothrombine en thrombine et le processus de coagulation (Vance et Steenbergen, 2005 ; Lentz, 2003 ; Buckland et Wilton, 2000).

- *Le phosphatidylglycérol (PG)*

Chez les plantes, le PG est retrouvé dans la plupart des membranes cellulaires avec une importance particulière au niveau des plastes : le PG peut représenter jusqu'à 10% des lipides des membranes thylacoïdiennes à l'intérieur des chloroplastes (dont 70% au niveau du feuillet extérieur). Une des particularités du PG végétal est qu'il ne porte des acides gras insaturés qu'en position *sn*-1 du glycérol (Xu et Siegenthaler, 1996). Le rôle exact du PG reste à déterminer mais il semblerait qu'un niveau minimum de PG soit requis pour la photosynthèse et la croissance normale des plantes. Chez les animaux, le PG représente 1-2% des lipides. Il est probablement localisé dans les mitochondries où il sert de précurseur du cardiolipide [The Lipid Library].

- *Le diphosphatidylglycérol (DPG) ou cardiolipide*

Le DPG, communément appelé cardiolipide, est un composant spécifique de la mitochondrie (jusqu'à 15-20% des lipides membranaires mitochondriaux). Le DPG est le seul phospholipide à posséder 4 chaînes d'acides gras : cette structure « dimérique » porte donc deux charges négatives (voir Tableau 3). Le DPG est exclusivement composé de chaînes d'acides gras à 18 carbones et à 80%, de C18:2. Le DPG possède un rôle structural crucial en interaction avec les enzymes impliquées dans la phosphorylation oxydative car il est totalement intégré dans leur structure quaternaire et permet la bonne association des différentes sous-unités ainsi que leur fonctionnement (Haines et Dencher, 2002). Du fait de sa structure dimérique, il a tendance à créer des domaines transitoires déstabilisant les bicouches dont il fait partie. Il a été décrit comme participant aux phénomènes d'apoptose et de translocation du cholestérol au travers des membranes mitochondriales (Kagan et al., 2004 ; Haines et Dencher, 2002).

- *Le phosphatidylinositol (PI).*

Le PI est présent dans tous les tissus de tous les types cellulaires et plus particulièrement, dans le cerveau où sa proportion peut atteindre 10% des phospholipides. C'est un phospholipide anionique constitué d'un squelette d'AP lié par le groupement phosphate à un inositol. Dans les cellules de mammifères, 78% du PI est constitué de

l'association de l'acide arachidonique (*sn*-2) et de l'acide stéarique (*sn*-1). Chez les végétaux, l'acide gras saturé est le plus souvent l'acide palmitique et les acides gras insaturés, l'acide linoléique ou l'acide linolénique [The Lipid Library].

En plus de ses fonctions structurales en tant que lipide chargé négativement, le PI joue un rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire. Le PI est capable de se lier aux domaines PH (plekstrin homology) de certaines protéines, régulant ainsi leur activité dans de nombreux processus clés des cellules. Il existe des formes poly-phosphatées du PI appelées phosphatidylinositol phosphates (PIPs). Les PIPs sont synthétisés par des kinases spécifiques et jouent un rôle dans la régulation de protéines essentielles, notamment dans les processus d'osmorégulation, de formation du cytosquelette d'actine ainsi que dans la régulation de la biosynthèse des shingolipides (Meijer et Munnik, 2003 ; Payrastre, 2004 ; Suh et Hille, 2005 ; Vanhaesebroeck et al, 2001). Le PI et les PIPs constituent les principales sources de DAG destinées à la signalisation intracellulaire. Les inositol phosphates, générés lors de l'hydrolyse des PIP jouent eux aussi des rôles essentiels en tant que messagers nucléaires pour la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription et la dynamique des ARN.

Le PI est aussi connu pour permettre l'ancrage membranaire de protéines au niveau du feuillet extérieur de la membrane plasmique *via* un « pont » glycosylé (glycosyl phosphatidyl inositol ou GPI). La partie aliphatique de l'ancre est communément occupée par une longue chaîne (C18 ou C24) liée par une liaison éther en position *sn*-1 et un acide gras saturé (12:0, 14:0, 16:0) en *sn*-2. La partie glycosylée de l'ancre est variable d'une espèce à l'autre mais la partie α-Man(1→4)α-GlcN (1→6)-*myo*-inositol-1-HPO_4-lipide est conservée. Les protéines destinées à être ancrées par des GPI possèdent une séquence signal hydrophobe qui est clivée avant d'être liée par la nouvelle extrémité C-terminale à un résidu éthanolamine de l'ancre GPI. L'ancre GPI est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique puis dirigée vers le feuillet externe de la membrane plasmique où elle est capable de s'incorporer aux rafts lipidiques (Maeda et al, 2007). Les protéines GPI ancrées (Figure 5) sont retrouvées sur la membrane plasmique de l'ensemble des cellules animales et des protozoaires.

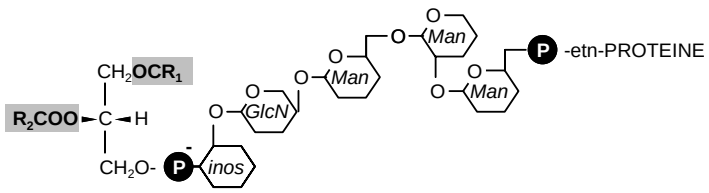


Figure 5 : Exemple de structure d'une protéine GPI-ancrée. P, phosphate ; *inos*, inositol ; *GlcN*, glucosamine ; *Man*, mannose ; *etn*, éthanolamine.

- ***Les glycoglycérolipides non phosphatés : monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et sulfooquinivosyl diacylglycérol (SQDG) d'origine végétale***

Les galactoglycérolipides sont les composants lipidiques majeurs des membranes chloroplastiques chez les organismes photosynthétiques, ce qui en fait les lipides les plus abondants sur terre. Les membranes des plastes végétaux (ainsi que les membranes des cyanobactéries dont ils sont issus selon la théorie endosymbiotique, voir origine du plaste partie III, paragraphe B) peuvent contenir jusqu'à 80% de galactolipides, contrairement à l'ensemble des membranes biologiques dont les classes lipidiques prédominantes sont les phospholipides. Les membranes plastidiales comportent un autre glycérolipide non phosphaté, le sulfoquinovosyldiacylglycérol ou SQDG (pour revue, Jouhet, 2005 ; Jouhet et al., 2007).

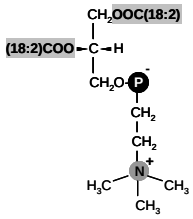
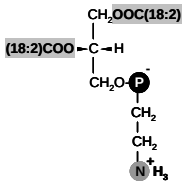
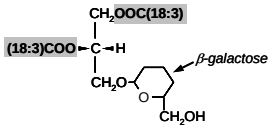
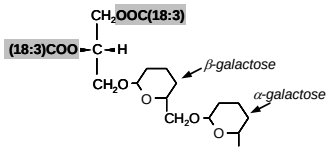
Les deux structures prédominantes des galactolipides sont le *sn*-1,2-diacyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-sn-glycérol (monogalactosyldiacylglycérol ou MGDG), et *sn*-1,2-diacyl-3-O-(6'-O-α-D-galactopyranosyl-β-D-galactopyranosyl)-*sn*-glycérol (digalactosyldiacylglycérol ou DGDG). Ces deux espèces de galactolipides végétaux sont riches en acides gras polyinsaturés : les plantes nommées 18:3 (comme le pois) contiennent essentiellement des galactolipides portant des acides gras en C18:3 sur les positions *sn*-1 et *sn*-2 ; les plantes en 16:3 (comme *Arabidopsis*) contiennent des acides gras en 16:3 en position *sn*-2 et des acides gras en 18:3 en *sn*-1 (voir synthèse du MGDG et du DGDG partie I, paragraphe B-2 et partie II, paragraphe C). Dans les organes non photosynthétiques des plantes, on peut retrouver des galactolipides contenant des espèces plus saturées d'acides gras. Bien que le DGDG soit synthétisé à partir de MGDG, le DGDG semble le seul à pouvoir être composé d'acide palmitique (16:0).

Le rôle des galactolipides sera détaillé plus loin. Les galactolipides sont essentiels pour l'ensemble des processus photosynthétiques (Dörmann et Benning, 2002). Le MGDG forme spontanément une phase micellaire dite « hexagonale II », déstabilisant la formation de bicouches lipidiques. Le DGDG possède quant à lui, une forme cylindrique qui induit la formation spontanée d'une phase « lamellaire » propice à la stabilisation des bicouches (Hölzl et Dörmann, 2007). Du fait de ces propriétés structurales distinctes, l'équilibre entre MGDG et DGDG semble important pour les fonctions qu'ils jouent au niveau des membranes du plaste. De nombreux travaux ont récemment démontré que le DGDG pouvait se substituer aux phospholipides chez les plantes, lors de situations de stress telles que la carence en phosphate (Jouhet et al. 2006, partie II, paragraphe C, rôle des galactolipides dans la carence en phosphate).

Le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) possède une tête polaire souffrée, le sufloquinovose, correspondant à un hexose lié à un groupement sulfate. Cette particularité en fait un lipide négativement chargé (voir Tableau 3). Il est essentiellement présent dans les membranes du chloroplaste. La structure prédominante du SQDG porte un acide gras en 16:0 sur la position *sn-1* et un acide gras en 18:2 ou 18:3 sur la position *sn-2*. Il semble important

pour le bon fonctionnement des thylacoïdes où on le retrouve essentiellement au niveau du feuillet interne de leur membrane. Il possède un rôle dans la photosynthèse (voir partie III, paragraphe C, rôle des galactolipides dans la photosynthèse). Il permet également de fournir une charge négative minimum aux membranes sans apport de phosphate et semble à ce titre, nécessaire lors de carence de phosphate. C'est un lipide à la forme cylindrique qui pourrait donc stabiliser les bicouches lipidiques (Hölzl et Dörmann, 2007).

Le Tableau 3 récapitule la structure, la localisation cellulaire principale et la phase (lamellaire ou hexagonale) de l'ensemble des glycérolipides traités dans les deux derniers paragraphes.

Nom	Structure schématique	Phase ou structure	Localisation subcellulaire
Lipides neutres			
Phosphatidylcholine (PC)		Lamellaire	• Principal lipide de la majorité des membranes, à l'exception notable des membranes plastidiales. Dans les chloroplastes, la PC n'est présente que sur la face externe de la membrane externe de l'enveloppe (Jouhet, 2005). De plus elle est plus abondante dans le feuillet externe des membranes dont elle fait partie.
Phosphatidyléthanolamine (PE)		Lamellaire	• Ubiquitaire, deuxième lipide le plus abondant chez les animaux et les végétaux, la PE est totalement absente des membranes plastidiales (Jouhet, 2005).
Monogalactosyldiacylglycérol (MGDG)		Hexagonale	• Exclusivement présent dans les membranes plastidiales, le MGDG est plus abondant au niveau de la membrane interne de l'enveloppe et de la membrane des thylacoïdes où il représente plus de 50% de la composition lipidique.
Digalactosyldiacylglycérol (DGDG)		Lamellaire	• En très forte majorité dans les membranes plastidiales où il représente 30% de la composition membranaire (à égale concentration dans les différentes membranes), le DGDG se retrouve aussi au niveau de la membrane plasmique, du tonoplaste et de l'enveloppe mitochondriale, dans le cas de la carence en phosphate (Jouhet et al. 2006).

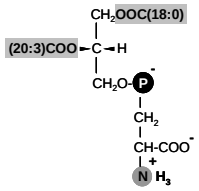
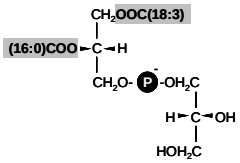
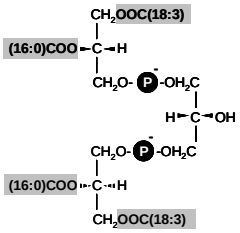
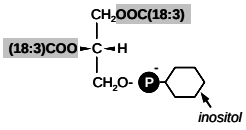
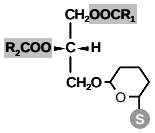
Lipides anioniques			
Phosphatidylsérine (PS)		Lamellaire	• Largement distribuée mais plus abondante dans la membrane plasmique et dans le RE, la PS est surtout présente sur le feuillet interne des membranes dont elle fait partie. Cette asymétrie peut être inversée lors de l'apoptose par exemple.
Phosphatidylglycérol (PG)		Lamellaire	• Chez les plantes, le PG est ubiquitaire avec une synthèse importante au niveau du plaste. Chez les animaux, le PG se retrouve principalement au niveau de la mitochondrie, précurseur du DPG.
Diphosphatidylglycérol (DPG)		Hexagonale	• Uniquement mitochondrial.
Phosphatidylinositol (PI)		Lamellaire	• Ubiquitaire.
Sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG)		Lamellaire	• Uniquement dans les membranes du plaste et plus particulièrement, sur celles des thylacoïdes.

Tableau 3 : Structure des principaux glycérolipides eucaryotes (cellules animales et végétales). Monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) neutre et formant une phase hexagonale ; digalactosyldiacylglycérol (DGDG) neutre et formant des bicouches ; phosphatidylcholine (PC) neutre et formant des bicouches, phosphatidyléthanolamine (PE) neutre et formant une phase hexagonale, phosphatidylsérine (PS) anionique et formant des bicouches, diphosphatidylglycérol (DPG) ou cardiolipide anionique et formant une phase hexagonale, phosphatidylglycérol (PG) anionique et formant des bicouches ; phosphatidylinositol (PI) anionique et formant des bicouches.

- ***Les galactolipides d'origine animale***

A la suite de la caractérisation des galactolipides végétaux (Carter 1956), des recherches ont été menées dans différents modèles animaux. Des galactolipides ont été retrouvés de façon ubiquitaire dans l'ensemble des tissus nerveux et cérébraux, à hauteur de 0.1 à 0.6% des lipides totaux et à l'état de traces dans les autres tissus. Les travaux menés sur matériel animal indiquent que les galactolipides existent sous forme diacyl et alkyl-acyl, avec des acides gras en majorité saturés ou monoeïques tels que du 16:0, 18:0 et du 18:1. Dans le tissus cérébral, un lipide mineur présentant une structure semblable au MGDG de plantes, à savoir du *sn*-1,2-diacyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-sn-glycérol, a été décrit ainsi que la forme *sn*-1-alkyl,*sn*-2-acyl correspondante (Slomiany et al, 1987). Il est admis que ce lipide est un produit alternatif de la céramide galactosyltransférase (Maréchal et al, 2002).

Un autre galactolipide a été caractérisé dans les tissus animaux et plus particulièrement, au niveau des testicules et des spermatozoïdes: le séminolipide ou *sn*-1-O-hexadecyl,*sn*-2-O-hexadecanoyl-3-O-β-D-(3'-sulfo)-galactopyranosyl-sn-glycérol. Ce galactolipide est aussi présent en faible concentration dans les tissus riches en glycolipides et notamment la myéline. Il existe sous formes diacyl, dialkyl et acyl-alkyl et contient uniquement des acides gras saturés, à l'exception notable du cerveau de certains poissons où existe une forme riche en C18:1. Il a été démontré que le séminolipide pourrait être impliqué dans le fonctionnement des cellules germinales ainsi qu'au cours du processus de spermatogénèse au niveau des testicules (Zhang et al, 2005).

L'étude des galactolipides d'origine animale a souvent été ignorée du fait des très faibles quantités retrouvées ainsi que de la difficulté des méthodes de purification. De nouvelles techniques telles que la spectrométrie de masse par electrospay et ionisation en tandem ouvrent aujourd'hui de nouvelles voies pour l'étude de ces glycolipides aux propriétés particulières (voir chapitre III et annexe).

3. Les sphingolipides

Les sphingolipides regroupent une large gamme de lipides dont la structure générale est proche de celle des glycérolipides, dans la mesure où ces lipides dérivent d'un alcool, portent une tête polaire au sommet d'une queue hydrophobe et qu'ils s'insèrent dans les bicouches lipidiques comme les glycérolipides. Toutefois, la vision générale actuelle est que les glycérolipides composent la matrice des membranes dans laquelle se dispersent les autres constituants membranaires alors que la spécificité des sphingolipides est de structurer des micro-domaines spécialisés, appelés au sens large radeaux (ou rafts) lipidiques. Les sphingolipides sont aussi impliqués dans de nombreux processus cellulaires et physiologiques,

en tant que précurseurs d'un grand nombre de métabolites, de messagers cellulaires, d'acteurs du système immunitaire, etc.

Les sphingolipides dérivent d'une longue chaîne carbonée (sphingoïde ou base sphingoïde) du type de la sphingosine (chaîne aliphatique possédant plusieurs groupements hydroxyls libres, voir Tableau 4). Les céramides sont constituées d'une chaîne sphingoïde liée *via* une liaison amine, à une chaîne d'acide gras (Tableau 4). Les sphingolipides complexes sont synthétisés à partir des céramides sur lesquelles est greffée une tête polaire.

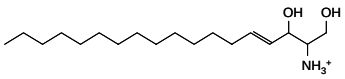
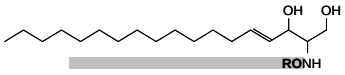
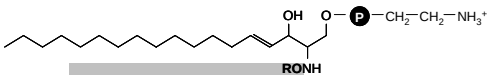
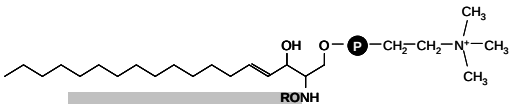
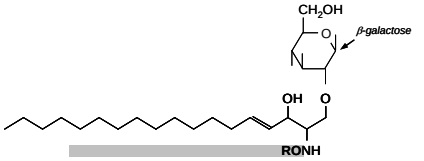
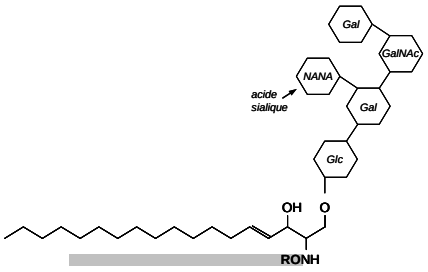
Structure schématique	Classe de lipide
	Sphingosine
	Céramide = sphingosine + amide-acyl (R)
	phosphoéthanolamine céramide
	Phosphocholine céramide (Sphingomyéline)
	Monogalactosylcérébroside (MGCB)
	Ganglioside GM1

Tableau 4 : Différentes classes de sphingolipides. La shingosine est la plus abondante des sphingoïdes qui sont constitués d'une simple chaîne aliphatique portant un groupement amine et des groupements hydroxyls. Les céramides sont les précurseurs de synthèse de l'ensemble des snhigolipides complexes. Elles sont constituées d'une shingosine qui est liée à une chaîne d'acide gras via une liaison amine. La phosphoéthanolamine et la sphingomyéline représentent deux shingolipides complexes types. Le monogalactosylcérébroside est un cérébroside ou monohexosylcérébroside. Cette classe de shingolipide complexe est constituée d'une céramide liée par une liaison O-glycosidique à un hexose. Le GM1 est un ganglioside de la classe des oligoglycocérébrosides.

- *Les sphingoïdes*

Les sphingoïdes sont des 2-amino-1,3-dihydroxy-alcanes qui, dans de nombreux cas, possèdent une insaturation en *trans* à la position 4 de leurs chaînes aliphatiques. Ces chaînes sont longues de 18 carbones en général et possèdent 2 groupements hydroxyls libres. Plus de 80 longues chaînes basales ont été découvertes et la sphingosine est l'espèce la plus commune dans les tissus animaux. Contrairement aux autres lipides, les sphingoïdes ont une charge légèrement positive à pH neutre. Ceci ajouté à une solubilité relativement élevée, leur permet spontanément de traverser, voire changer de membrane. La plupart des sphingoïdes ne sont que des éléments constitutifs des sphingolipides plus complexes. La sphingosine-1-phosphate possède cependant des fonctions de signalisation cellulaire (Karlsson, 1970 ; Gomez-Munoz, 1998).

- *Les céramides*

Les céramides sont des sphingoïdes liés *via* une liaison amine à une chaîne d'acide gras. Ils sont donc apparentés aux *acyl-lipides*. Ils représentent les éléments clés de la synthèse de sphingolipides complexes. On les trouve dans pratiquement tous les tissus mais uniquement en quantités extrêmement faibles car ils sont rapidement convertis en sphingolipides plus complexes. En plus d'être les précurseurs d'une grande partie des sphingolipides, les céramides ont un rôle reconnu dans la régulation de l'apoptose par médiation des voies anti-prolifératives ou inhibition des pro-facteurs de survie cellulaire [The Lipid Library].

- *La sphingomyéline (SM), un analogue structural de la PC*

La SM est une céramide liée à une unité phosphorylcholine. Cette structure en fait l'analogue de la PC. Elle est un composant ubiquitaire des membranes de cellules animales et le plus abondant des sphingolipides. On peut la retrouver à hauteur de 50% dans la composition lipidique de certains tissus. C'est le lipide le plus présent dans la membrane des erythrocytes des animaux ruminants où elle remplace complètement la PC. On la retrouve en plus grande quantité au niveau de la membrane plasmique et plus particulièrement, sur le feuillet externe, à l'instar de son homologue phosphoglycérolipidique. La SM semble ne pas exister chez les plantes et les microorganismes, ce qui pose la question de son origine et de son évolution. La composition des chaînes aliphatiques constituant la partie hydrophobe de la SM peut varier d'un tissu à l'autre mais en général, la sphingosine semble être son constituant sphingoïde le plus rencontré ; ses chaînes d'acides gras sont en général longues et monoinsaturées (Ramstedt et al. 1999). On a longtemps pensé que la SM servait uniquement de substitut à la PC. De nombreux éléments montrent cependant que le métabolisme du cholestérol et de la SM sont co-intégrés. La conséquence est l'accumulation des deux molécules dans les mêmes membranes et dans des sous-domaines membranaires similaires :

les rafts (Ridgway et al. 1999). La SM possède des capacités à créer des liaisons hydrogènes plus fortes que la PC . De plus, les insaturations présentes au niveau des alkyls donnent des propriétés structurales très différentes au niveau de l'architecture membranaire. La SM est aussi un des précurseurs des céramides, des sphingoïdes et d'autres sphingolipides dans un cycle dit « cycle de la sphingomyéline », cycle qui permet la formation d'importants messagers cellulaires et/ou constituants membranaires. (Duan, 2006).

- *Les cérébrosides (monohexosylcérébrosides, MHexCB)*

Les cérébrosides représentent l'ensemble des monoglycosylcéramides (monohexosylcérébrosides ou MHexCB). Ils on été nommés d'après le lieu de leur découverte : le cerveau. Le galactosylcéramide Galβ1-1'Cer (monogalactosylcérébroside ou MGCB) est le plus abondant des cérébrosides dans les cellules animales. Il y est retrouvé dans tous les tissus nerveux où il constitue notamment un élément majeur des oligodendrocytes. Le glucosylcéramide (MGlcCB) est quant à lui, le principal glycosphingolipide des plantes et il est particulièrement abondant dans les tissus photosynthétiques. Il existe de nombreux cérébrosides dont la structure est mal élucidée. Ce sont des galactosylcéramides possédant une longue chaîne cyclique acétale fixée sur l'unité galactosyl (Yachida et al., 1998).

L'ensemble de ces cérébrosides est constitué, de manière générale, par de longues chaînes saturées ou monoeïques possédant un groupement hydroxyl en position 2, à l'exception des plantes résistantes au froid qui ont plus d'unités insaturées (Kojima, 1991). Leurs groupements amide-acyls possèdent également des unités saturées ou avec une seule insaturation (Hirabayashi, 1986).

Une des propriétés des cérébrosides est de posséder une température de fusion plus élevée que la température physiologique du corps des homéothermes, ce qui leur permet d'avoir une structure paracristalline. La présence d'atomes d'hydrogènes polaires sur la partie glycosylée ainsi que les groupements amines et hydroxyles sur les parties aliphatiques donnent aux cérébrosides, le potentiel de créer jusqu'à 8 liaisons hydrogènes (van Meer et Lisman, 2002). Ces deux propriétés structurales permettent aux cérébrosides de se compacter à l'intérieur des membranes et de se lier à un grand nombre de protéines. Localisés en majorité sur le feuillet externe de la membrane plasmique, ces lipides forment avec le cholestérol et la sphingomyéline, les rafts lipidiques. Dans les membranes végétales, on retrouve cette même association de domaines riches en sphingolipides et en stérols végétaux (Lynch et Dunn, 2004).

- *Les oligoglycosphingolipides (oligoglycocérébrosides, OGlycoCB) :*

Les OGlycoCB représentent la classe lipidique possédant au moins 2 unités glycosyl attachées à une céramide. Des centaines d'OGlycoCB ont été identifiés à ce jour. Leur nature et leur composition sont supposées être caractéristiques des fonctions cellulaires dans

lesquelles ils sont impliqués (Levery, 2005). Les études qui portent sur les OGlycoCB accordent habituellement plus d'attention à la nature du résidu glycosylé qu'à la partie apolaire. Les données relatives à la composition de la partie aliphatique restent de ce fait, peu documentées. Cependant, on sait que cette partie reflète l'origine biosynthétique de la macromolécule et qu'elle ressemble à celle de leur précurseur, le glucosylcéramide. On commence aussi à reconnaître que la partie céramide permet aux OGlycoCB de d'insérer dans le site membranaire qui leur est destiné et de se lier *via* des liaisons hydrogènes, à certaines protéines spécifiques (Lingwood, 2000). Ces lipides sont trouvés essentiellement au niveau des membranes du réticulum, du Golgi, du tonoplaste et de la membrane plasmique, mais leur fonction précise est un champ de recherche ouvert (Sperling et al., 2004).

Le *globoside* (GalNAcβ(1→3)Galα(1→4)Galβ(1→4)Glc-Cer) est l'OGlyCB le plus répandu à la surface des érythrocytes. Il est important dans les mécanismes d'interactions cellulaires et notamment, avec le déterminant des groupes sanguins.

Un *digalactosylcéramide* (DGCB) a été détecté dans certaines cellules animales et végétales (Sweeley et Siddiqui, 1977) mais son rôle n'a pas été caractérisé.

Le *phosphorylinositol céramide* est l'un des composants majeurs des membranes végétales. A l'instar du PI, il sert d'ancrage à certaines protéines et de récentes études montrent qu'il existerait 248 protéines différentes dans ce cas chez *Arabidopsis* (Lynch et Dunn, 2004). Les méthodes conventionnelles d'extraction ne permettent pas de les détecter mais de nouveaux processus montrent que ce lipide serait le plus abondant des sphingolipides chez les plantes et le placeraient au dessus des phospholipides au niveau de l'abondance membranaire (Markham et al., 2006 ; Sperling et Heinz, 2003). Il peut être localisé au sein des rafts lipidiques de *Saccharomyces cerevisae* où il est particulièrement abondant (Dickson et Lester, 1999).

Les *gangliosides* regroupent l'ensemble des OGlycoCB portant un résidu acide *N*-acetylneuraminique (acide sialique) ou acide neuraminique lié sur la chaîne oligosaccharidique du lipide *via* le groupement hydroxyl en position 2 de l'acide sialique. En conséquence, les gangliosides possèdent une charge nette négative à pH 7. L'un des plus communs est le monosialo-ganglioside ou ganglioside GM1 (Tableau 4). Il existe de nombreux gangliosides et l'essentiel de leur fonction est donné par la nature du résidu polysaccharidique qu'ils portent. Ils représentent 10-12% du contenu lipidique membranaire neuronal et jusqu'à 20-25% du feuillet externe de la membrane plasmique (Levery, 2005). On les retrouve aussi en faible quantité dans l'ensemble des cellules animales, regroupés au niveau des rafts (Sonnino et al., 2007). On pense qu'ils

maintiennent la stabilité architecturale de la myéline. Nombre de pathogènes et toxines bactériennes ont la capacité de se lier aux gangliosides (Kanfer, 1983).

- *Sphingolipides et rafts lipidiques*

Il est impossible de comprendre l'ensemble des functions des sphingolipides sans appréhender la notion de sous-domaines spécifiques appelés rafts lipidiques. Ces domaines sont le résultat de l'affinité selective entre les sphingolipides (entre autres) et certaines protéines. Les rafts membranaires peuvent donc être définis comme de petits domaines labiles (10-200 nm), hétérogènes, enrichis en sphingolipides et en cholestérol ; ils peuvent former de plus larges plateformes membranaires par des interactions protéines-protéines et protéines-lipides.

Les premières descriptions de tels domaines ont d'abord reposé sur les méthodes de purifications utilisées pour les isoler. En effet, les rafts lipidiques sont resistants aux détergents non-ioniques ; ils sont alors insolubles dans le triton X-100 (1%) froid. On leur a alors donné le nom de « membranes resistantes aux détergents » (Detergent Resistant Membranes, DRM) [Lipid Library].

Les rafts lipidiques possèdent une température de fusion plus élévée que les membranes constituées de glycérophospholipides du fait de la compaction élevée entre les longues chaînes d'acyls saturés des sphingolipides. Cette forte capacité de compaction des sphingolipides et du cholestérol en comparaison des glycérophospsoglycérolipides, engendre une séparation des phases de la membrane. Des régions de la membrane s'enrichissent en sphingolipides et en cholestérol, sur une « mer » fluide, appauvrie en cholestérol et enrichies en lipides contenant des chaînes polyinsaturés et flexibles (Allende et al. 2004).

Les rafts contiennent et stabilisent de nombreuses protéines grâce à des liaisons hydrogènes formées entre les shingolipides et ces protéines. Cette propriété d'association engendre la formation de domaines fonctionnels aux activités biologiques bien particulières. Les rafts sont notamment connus pour leurs rôles dans la transduction de signaux. Ils peuvent, par exemple, maintenir la présence de certaines protéines qui, une fois activées par phosphorylation, peuvent s'extraire du domaine membranaire. C'est notamment le cas lors de la transduction du signal durant l'activation des lymphocytes T (Zeyda et Stulnig, 2006). Certains pathogènes peuvent même activer une shingomyélinase que permet d'incorporer des céramides dans les rafts lipidiques de la membrane plasmique de la cellule visée, ce qui entraîne l'élargissement de ces rafts. Ce phénomène peut faciliter l'internalisation de certaines bactéries, de certains virus et de certains parasites ou encore initier l'apoptose (Riethmuller et al. 2006).

Des rafts enrichis en stérols végétaux et en sphingolipides (glucosylcéramide en particulier) ont été identifiés dans les cellules végétales. Ils semblent permettre le positionnement de protéines dans certaines zones membranaires à l'instar des rafts des cellules animales (Martin et al. 2005).

La composition lipidique régit donc les interactions que peuvent établir les rafts avec une protéine plutôt qu'une autre. Par comparaison de la solubilité membranaire dans différents détergents, il apparaît qu'il pourrait exister plusieurs sous-types de rafts qui permettraient d'ancrer une grande diversité de protéines.

4. Analogies structurales entre glycérolipides et sphingolipides

Glycérolipides et sphingolipides sont deux grandes classes d'acyl-lipides présentant des parentés structurales évidentes, en particulier la présence d'une queue hydrophobe à une/deux chaînes de carbones, et une tête polaire hydrophile. La présence de têtes polaires identiques (phosphocholine pour la PC et la SM, phophoéthanolamine pour la PE et la phophoéthanolamine céramide, galactose pour le MGDG et le MGCB) illustre l'existence de voies de synthèse proches ainsi que de phénomènes de transferts de têtes polaires.

B. Les grandes voies de synthèse des acyl-lipides

1. Synthèse des acides gras

- ***Substrats et enzymes de synthèse (ACCase, FAS I, FAS II, FAE)***

La biosynthèse des acides gras nécessite un substrat carboné thio-estérifié provenant du cytosol, l'acétyl-CoA et un extenseur de chaîne, le malonyl-CoA. Ce dernier est généré par l'activité d'une acétyl-CoA carboxylase (ACCase) qui, grâce à son groupement prosthétique biotine, se lie à une molécule de CO_2 et la transfère sur l'acétyl-CoA pour former le malonyl-CoA.

Des molécules de malonyl-CoA sont successivement additionnées à l'acétyl-CoA grâce à l'action d'une machinerie de synthèse appelée acide gras synthase ou fatty acid synthase (FAS). Il existe 2 types de FAS :

- la *FAS de type I*, complexe enzymatique dont les sous-unités sont chacune responsable d'une étape de la réaction d'élongation (Figure 6) ;

- la *FAS de type II* qui consiste en un groupe de protéines qui peuvent être séparées et purifiées. (Figure 6)

La FAS I est spécifique du cytosol des cellules animales, des champignons et de quelques procaryotes qui l'auraient acquise secondairement par transfert latéral de gènes (Goodman et McFadden, 2007). Le système FAS peut être porté par un ou plusieurs polypeptides. Chez l'Humain, la FAS I est un homodimère pour lequel chaque polypeptide porte le site de l'ACP et les centres catalytiques MAT, KS, KR, DH, ER et ET. Chez la levure, deux polypeptides portent d'une part, le site de l'ACP et les centres catalytiques KS et

KR et d'autre part, les centres AC (ac(et)yltransferase), DH, ER et MPT (malonyl/palmitoyl transferase).

La FAS II se retrouve chez l'ensemble des bactéries, dans le plaste des plantes et chez les parasites Apicomplexes (Goodman et McFadden, 2007). Les FAS permettent généralement la synthèse des acides gras saturés jusqu'à l'acide palmitique (16:0) pour la FAS I et l'acide stéarique (18:0).

L'élongation des chaînes d'acides gras est catalysée par des élongases (fatty acid elongase, FAE), qui pourraient être considérées comme des *FAS de type III*, car elles ajoutent des unités C2 sur le produit des FAS I et II. A ce jour, six types de FAE ont été caractérisées : ELOVL 1 à 6 (elongation of very-long-chain fatty acid). ELOVL 1, 3 et 6 sont dédiées à l'élongation des acides gras saturés et monoéïques ; les 3 autres, aux acides gras polyinsaturés (Jacobsson et al., 2006). Certains parasites tels que *Trypanosoma brucei* ne synthétisent leurs acides gras que par l'action des élongases (Livore et al., 2007 ; Lee et al., 2007).

- ***Initiation de la synthèse et cycles d'élongation de la chaîne carbonée***

La 1ère réaction de synthèse de acides gras consiste en l'attachement des groupements acétyl et malonyl sur le coenzyme acyl carrier protein (ACP), réaction catalysée par une malonyl-CoA:ACP malonyltransférase (MAT). L'élongation proprement dite par ajout séquentiel de 2 carbones commence à cette étape. Dans un premier temps, la céto-acyl-ACP synthase (KS) catalyse le transfert d'un carbone provenant du malonyl-ACP sur l'acétyl-ACP ; formant un groupement β-céto-acyl. Le groupement cétone est réduit en alcool par la β-céto-acyl-ACP réductase NADPH dépendante (KR). L'enoyl-ACP hydrase (DH) catalyse ensuite la formation d'un groupement cis-2,3-enoyl, qui est réduit par l'enoyl-ACP réductase (ER). Le groupement acyl saturé ainsi formé est transféré sur un ACP libre par l'ACP acyltransférase (AT).

Sept cycles sont nécessaires pour la synthèse du palmitate (C16:0) et huit, pour l'acide stéarique (C18 0). La réaction finale permet la séparation de l'acide gras du groupement acétyl par l'action d'une thio-estérase.

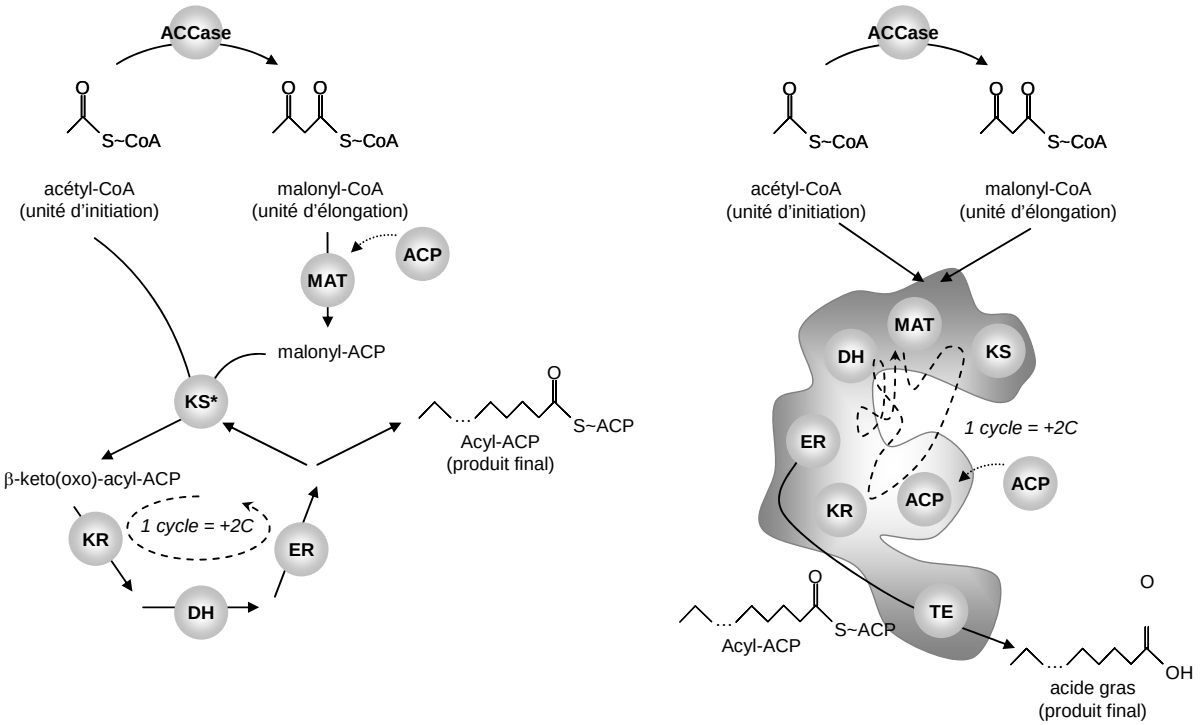


Schéma du système FAS II: L'acetyl-CoA est converti en malonyl-CoA par une acétyl-CoA carboxylase (**ACCase**), puis en malonyl-ACP par un malonyl-CoA:ACP transacylase (**MAT / enzyme FabD**). Le malonyl-ACP est condensé avec une autre molécule d'acétyl-CoA sous l'action d'une ketoacyl synthase (*) (ou β-oxoacyl ACP synthase III, **KS / enzyme FabH**) et forme le β-keto(oxo)acyl-ACP. Celui-ci est ensuite substrat pour une série de réactions catalysées par une ketoacyl réductase (ou β-oxoacyl ACP reductase, **KR / enzyme FabG**), une déhydratase (ou β-hydroxyacyl ACP dehydratases, **DH / enzymes FabZ et FabA**), une enoyl-ACP reductase (**ER / enzyme FabI**) pour former un butyryl-ACP. Ce produit entre à nouveau dans le cycle et la chaîne subit une élongation de 2 carbones par cycle. Les enzymes impliquées dans l'élongation sont des ketoacyl synthases différentes (**KS / enzymes FabB et FabF**).

(*) L'activité ketoacyl synthase **KS** peut être portée par FabH lors de l'intitiation, puis par FabB et FabH dans les cycles successifs d'élongation.

Schéma du système FAS I : L'acetyl-CoA est converti en malonyl-CoA par une acétyl-CoA carboxylase (**ACCase**). La synthèse d'acide gras est ensuite réalisée par un complexe porteur de centres catalytiques malonyl-CoA:ACP transacylase (**MAT**), ketoacyl synthase (**KS**), ketoacyl réductase (**KR**), déhydratase (**DH**), et enoyl-ACP reductase (**ER**) permettant la réalisation d'une élongation par cycles (2 carbones par cycle). Un site catalytique thioesterase (**ET**) permet la libération d'un acide gras libre, produit final de la réaction.

Figure 6 : Schémas de synthèse de la FAS I et de la FAS II.

- ***Mise en place des insaturations***

L'incorporation d'une double liaison est un mécanisme anaérobie réalisé *après* l'élongation de la chaîne d'acide gras. Dans le cas des acides gras monoinsaturés, ce sont essentiellement le C16:0 ou le C18:0 (voir Tableau 1) qui subissent la mise en place de l'insaturation. La chaîne monoeïque néoformée est ensuite allongée à sa taille finale. La mise en place des insaturations est catalysée par des enzymes nommées *désaturases* qui sont spécifiques de la position d'insertion de la future insaturation ainsi que de la longueur de la chaîne d'acide gras. Préalablement à la réaction, la chaîne doit être couplée à un acétyl-CoA chez les cellules animales ou à un ACP chez les cellules végétales. Les désaturases ont été particulièrement bien caractérisées chez les plantes (Shanklin et Cahoon, 1998). La structure des désaturases issues des cellules animales reste peu connue parce que ces enzymes sont membranaires. On sait qu'elles sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique, que leur centre actif est dirigé vers le cytosol et qu'elles sont constituées de 3 protéines [The Lipid Library].

La synthèse d'acides gras polyinsaturés implique l'orchestration de différentes désaturases. Dans les tissus végétaux, l'acide linoleïque (*cis*-9,*cis*-12-C18:2) et l'acide α-linolénique (*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15-C18:3) sont généralement synthétisés par l'action de désaturases spécifiques, respectivement les désaturases Δ12 et Δ15(ω3) à partir de l'acide stéarique. La désaturase Δ12 utilise la PC comme substrat préférentiel. Une fois cette insaturation mise en place, l'acide gras portant la double liaison est recyclé pour être incorporé lors de la synthèse d'autres classes lipidiques. Il est à noter que de manière générale, l'acide α-linolénique est synthétisé à partir du MGDG. Les désaturases de plantes sont localisées dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans le chloroplaste pour la majorité d'entre elles [The Lipid Library].

Concernant les cellules animales, le linoléate C18:2 et l'α-linolénate C18:3 ne peuvent être synthétisés *de novo* et doivent être acquis par le régime alimentaire. Les acides gras polyinsaturés des cellules animales sont synthétisés à partir des acides gras essentiels par une série d'élongations désaturations.

2. Voies générales de synthèse des glycérolipides

- ***Synthèse des précurseurs des glycérolipides : PA, DAG et CDP-DAG***

Les précurseurs de la synthèse des glycérolipides peuvent être synthétisés à partir du glycérol-3-phophate, selon une voie dite « néosynthèse » dans ce manuscrit, ou par hydrolyse d'autres lipides, selon des voies dites « alternatives ». La Figure 7 résume l'ensemble des voies de synthèse des trois précurseurs.

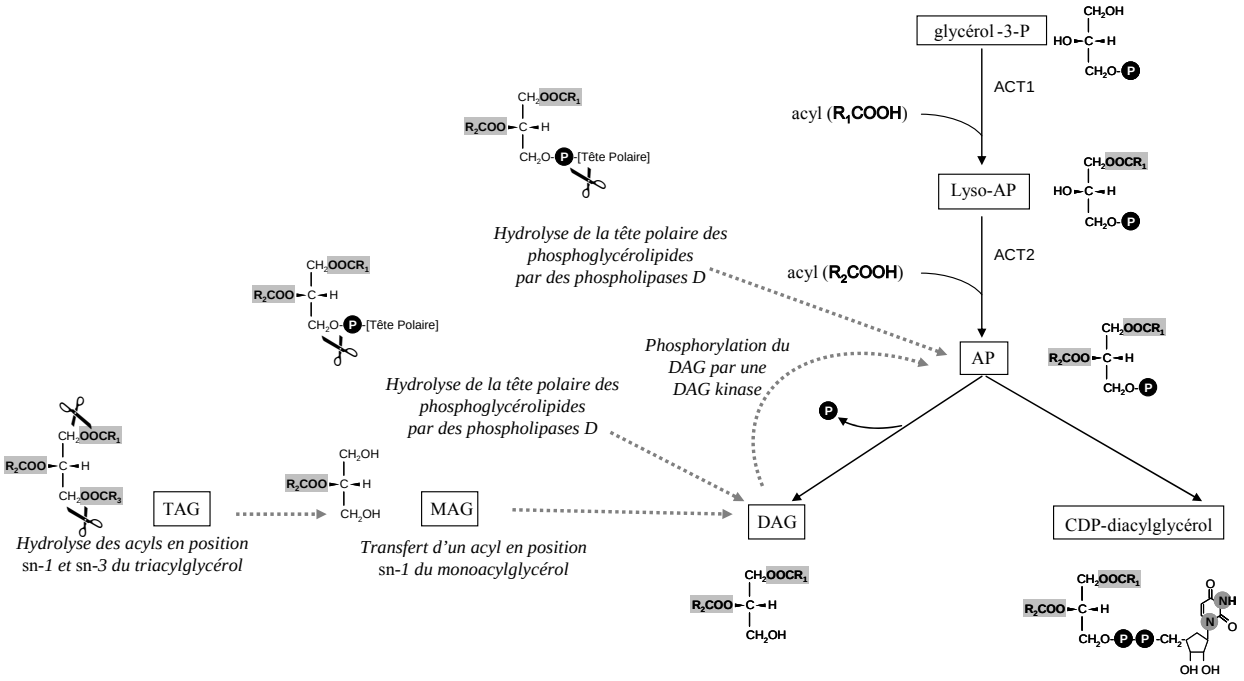


Figure 7 : Néosynthèse et voies alternatives de synthèse des précurseurs des glycérolipides.

- *Trois voies possibles de biosynthèse de l'acide phosphatidique (AP)*

L'AP n'est pas un lipide abondant mais il est d'une importance biologique capitale puisqu'il est à la fois un métabolite clef (un intermédiaire dans la synthèse du DAG, du CDP-DAG et des glycérolipides) et un second messager. La biosynthèse *de novo* de l'AP dans les cellules animales et végétales consiste en l'acylation séquentielle du glycérol-3-phosphate (G3P) issu de la glycolyse (Figure 7). L'AP peut aussi être généré par hydrolyse des phospholipides grâce à l'action d'une phospholipase D (Figure 7), enzyme répandue dans l'ensemble des tissus animaux. Une dernière voie est à l'origine de l'AP, notamment dans les processus de signalisation intracellulaire, par phosphorylation du DAG sous l'action d'une diacylglycérol kinase (Figure 7).

Dans les cellules végétales, suivant les lieux de synthèse, la distribution des acides gras est différente. Deux grands groupes structuraux d'AP on été ainsi définis. Le premier possède en position *sn*-2, des acides gras en C16 uniquement, la position *sn*-1 du glycérol pouvant être estérifiée par des acides gras en C18 et en C16. L'AP est alors dit de structure « procaryote » par analogie avec la composition en acides gras des glycérolipides des cyanobactéries (Heinz 1977). Il est alors synthétisé au niveau du plaste par acylations successives du G3P par les protéines ACT1 et ACT2. Le mutant knock-out du gène codant pour ACT1 conduit à la perte de la synthèse des glycérolipides de structure procaryote (Yokoi

et al 1998). L'invalidation du gène codant pour ACT2 chez *Arabidopsis* provoque la mort de l'embryon, au stade de développement correspondant au développement des chloroplastes (Yu et al. 2004). Le deuxième groupe structural possède des acides gras en C18 en position *sn*-2 ; il est dit de structure « eucaryote ». Les acides gras synthétisés au niveau du chloroplaste sont séparés de l'ACP par les thioestérases (précédemment décrites) et transférés vers la membrane externe des plastes par un mécanisme encore inconnu. Ils y sont réactivés par une acyl-CoA synthase (ACS) et sont ensuite estérifiés sur le G3P comme décrit plus haut (Frentzen 1990).

- *Trois voies possibles de synthèse du diacylglycérol (DAG)*

Il existe trois grandes voies de synthèse du DAG (Figure 7) (Miège et Maréchal, 1999). Concernant les processus de biosynthèse en masse des glycérolipides, le DAG est en grande partie issu de la conversion de l'AP par action d'une phosphatidate phosphatase. Le DAG ainsi produit est à l'origine de la synthèse de la PC, de la PE ainsi que des glycolipides. La phosphatidate phosphatase est généralement présente au niveau du réticulum des cellules animales et végétales ainsi que dans le plaste des cellules végétales (pour la synthèse des lipides de structure « procaryote »).

Les cellules de mammifères constituent une exception importante à ce schéma puisque la majorité du DAG est généré par hydrolyse et transacylation du triacylglycérol (TAG). Dans un premier temps, les acyls en positions *sn*-1 et *sn*-3 du TAG sont hydrolysés par des lipases, puis une acyl-CoA:monoacylglycérol acyltransférase catalyse la production de DAG. En relation avec son rôle de messager intracellulaire, le DAG peut aussi être généré par l'action d'une phospholipase C (voir figure) agissant généralement sur le PI et les phosphoinositides.

- *Synthèse du CDP-DAG*

Ce précurseur de la PS, du PI et du PG, est issu de la conversion de l'AP et d'une cytidine triphosphosphate (CTP) grâce à une CTP phosphatidate cytidylyltransférase. Cette activité a été localisée au niveau du réticulum, des mitochondries et des plastes.

- ***Synthèse des phosphoglycérolipides : PG, DPG, PI, PS, PE et PC***

Les voies de synthèse des phosphoglycérolipides sont généralement bien caractérisées *in vitro* mais moins bien comprises *in vivo*. En général, les phosphoglycérolipides sont synthétisés selon 3 grandes voies dérivées du CDP-DAG, du DAG et provenant de l'échange de têtes polaires d'autres phospholipides (Figure 8), suivant des réactions parfois redondantes. La Figure 8 récapitule l'ensemble de ces réactions.

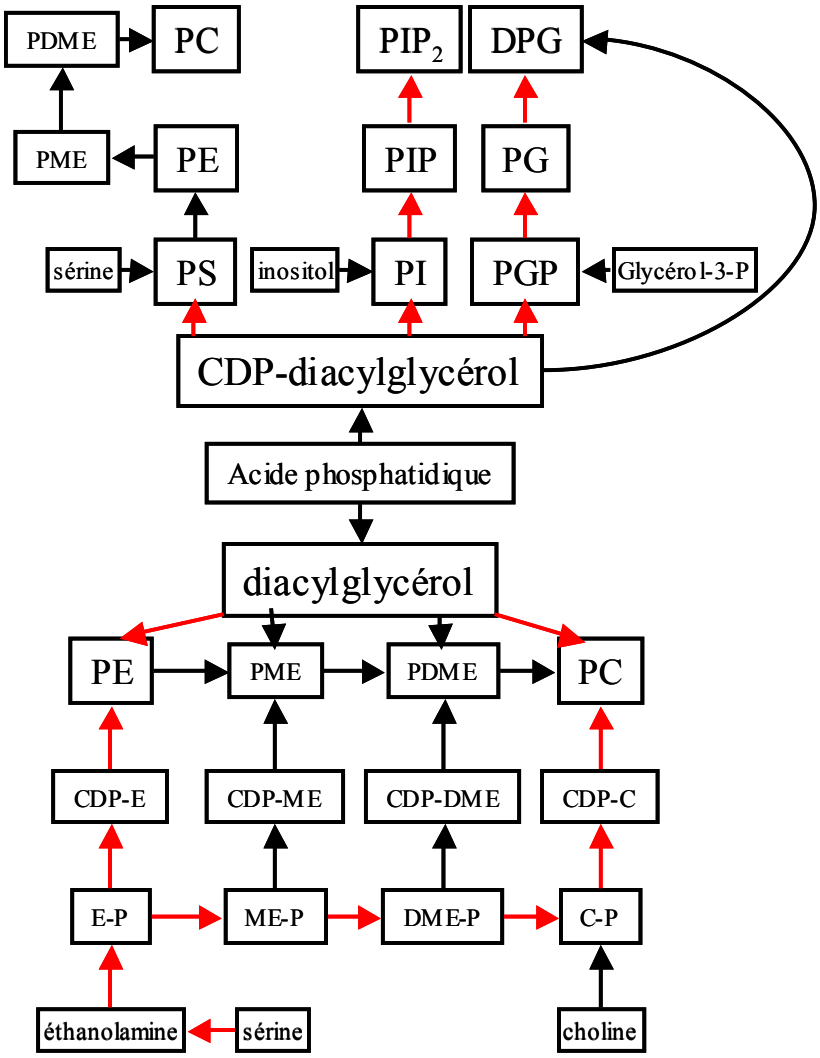


Figure 8 : Voies potentielles d'incorporation des têtes polaires des phospholipides dans les acyl-glycérols dérivés de l'acide phosphatidique d'après Kinney, 1993. (Les voies principales des plantes sont indiquées par des flèches rouges) C-P : choline phosphate, CDP-C : cytidine diphosphate-choline, CDP-E : cytidine diphosphate- éthanolamine, CDP-DME : cytidine diphosphate-diméthyléthanolamine, CDP-ME : cytidine diphosphate- méthyléthanolamine, DME-P : diméthyléthanolamine phosphate, E-P : éthanolamine phosphate, ME-P : méthyléthanolamine phosphate, PDME : phosphatidyldiméthyléthanolamine, PGP : phosphatidylglycérol phosphate, PIP : phosphatidylinositol phosphate, PIP2 : : phosphatidylinositol biphosphate, PME : phosphatidylméthyléthanolamine.

- *Synthèse des phospholipides dérivés du CDP-DAG*

Le PG est synthétisé grâce à l'action d'une PG-phosphate synthase (PGP synthase) et d'une PGP phosphatase (Figure 8) au niveau de son site de localisation finale, c'est-à-dire du réticulum endoplasmique, des mitochondries ou du chloroplaste. Chez les plantes, il existe deux gènes codant pour des PGP synthases (PGP1 et PGP2). L'enzyme PGP1 est adressée au niveau du plaste et de la mitochondrie et elle est indispensable pour la synthèse du PG plastidial. L'enzyme PGP2 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et elle est responsable de la synthèse du PG autre que plastidial. Le PG de la mitochondrie est quant à lui, synthétisé par les 2 enzymes (Babiychuk *et al.* 2003). Il existe aussi des voies mineures de

synthèse du PG par action de phospholipases D sur le DPG au encore d'autres phospholipides (Schlame et al. 2000)

Le DPG est synthétisé uniquement dans la membrane interne des mitochondries à partir de PG et de CDP-DAG par une DPG synthase (Figure 8). Cette enzyme utilise préférentiellement le CDP-dioleoylglycérol (C18:0/C18:0) et le PG (C18/C18) plutôt que le CDP-dipalmitoylglycérol (C16:0/C16:0) et au PG (C16/C18) (Frentzen et Griebau, 1994). Le DPG a donc un squelette DAG riche en C18. Chez *Arabidopsis*, l'adressage de cette enzyme est mitochondrial d'après les études *in silico* et *in vivo* (Beisson et al., 2003 ; Katayama et al., 2004).

Le PI est synthétisé par une PI synthase localisée au niveau du réticulum endoplasmique, à l'exception des levures où l'enzyme est localisée sur la membrane plasmique et dirigée vers la face cytosolique (Figure 8). Le PI est la source principale d'acide arachidonique (20:4) destiné à la synthèse des eicosanoïdes dans les cellules animales. Le PI et les PIPs sont aussi à l'origine d'une grande majorité du DAG destiné à la signalisation intracellulaire chez les plantes et les animaux, *via* l'action d'une phospholipase C (voir plus haut, synthèse du DAG)

La PS est synthétisée suivant des voies plus ou moins bien caractérisées chez les animaux et les végétaux. Chez les animaux, il existe 2 voies de synthèse de la PS impliquant 3 enzymes : les PS synthases I et II et la PS décarboxylase. Chacune de ces enzymes a des substrats et des sites de synthèse différents. La PS peut être synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique (zone appelée membrane associée à la mitochondrie) par une réaction d'échange de la L-sérine avec la PC ou la PE catalysée par la PS synthase I. Cette réaction ne requiert pas d'apport d'énergie (Figure 8). La PS néo-synthétisée peut être ensuite transportée vers la mitochondrie où elle est décarboxylée en PE par la PS décarboxylase. Elle repart ensuite vers le réticulum pour y être reconvertie en PS par la PS synthase II (Vance et Steenbergen, 2005). Les raisons de l'existence de ces voies multiples de synthèse sont encore mal connues.

Chez les plantes, la PS serait synthétisée à partir de deux voies différentes : une réaction d'échange de têtes polaires et une réaction impliquant le CDP-DAG (Figure 8) (Moore, 1982). Delhaize et al. (1999) ont montré la présence d'une PS synthase de plante, catalysant l'addition d'une sérine sur un CDP-DAG. Bien établi dans les modèles animaux, le devenir de la PS comme précurseur de la PE et de la PC n'a pas encore été clairement défini chez les plantes bien qu'une activité PS décarboxylase ait déjà été caractérisée dans les membranes mitochondriales (Rontein et al., 2003b).

- *Synthèse des phosphoglycérolipides dérivés du DAG (Kennedy Pathway)*

La voies de synthèse des phospholipides à partir du DAG constituent la voie dite de Kennedy (Kennedy pathway) ou voie nucléotidique (nucleotide pathway). Elle comporte trois étapes successives catalysées par une aminoalcool kinase, une CTP-phosphorylaminoalcool

cytidylyltransférase et une CDP-aminoalcool DAG aminoalcoolphosphotransférase (Moore, 1982). Cette voie de synthèse permet la formation de la PE et de la PC (Figure 8).

La PC peut être synthétisée suivant 2 voies distinctes : la voie Kennedy ou la voie de méthylation de la PE. Dans les cellules animales, la choline ne peut être synthétisée *de novo*. Elle est nécessairement obtenue par le régime alimentaire ou par recyclage de lipides. La 1ère étape de la néosynthèse de PC est catalysée par une choline kinase, alors que la dernière étape, utilisant le DAG et la CDP-choline, est réalisée par une phosphocholine transférase membranaire.

La seconde voie de synthèse de la PC passe par trois réactions successives de méthylations de la PE par des méthyltransférases, le S-adénosylméthionine étant le donneur de méthyls. Chez les plantes, l'activité PE-méthyl transférase n'a pas été détectée bien que les activités phosphatidylméthyl-éthanolamine:méthyltransférase et phosphatidyldiméthyl-éthanolamine:méthyltransférase soient présentes (Kinney, 1993). La voie utilisant la CDP-choline est donc prépondérante chez les plantes. Il en est de même dans les cellules animales à l'exception des levures où la voie de la méthylation de la PE est la voie principale de synthèse de la PC.

La synthèse de la PE suit la même voie que la PC (voie Kennedy) (Figure 4). Il existe un 2ème voie de synthèse de la PE par décarboxylation de la PS (décrit ci-dessus dans le paragraphe traitant de la synthèse de la PS).

- ***Synthèse des glycérolipides : MGDG, DGDG et SQDG***

La synthèse de galactoglycérolipides sera détaillée dans le paragraphe III B de la partie Bibliographique. Le plus simple de ces lipides, le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) peut être synthétisé en deux étapes par transfert d'une unité glucose provenant d'un nucléotide-sucre, l'UDP-glucose, sur le DAG, puis par une épimérisation du glucosyl en galactosyl (cas des cyanobactéries, Sato et al. 1982). Chez les plantes, le MGDG est synthétisé en une seule étape par transfert d'un groupement galactosyl de l'UDP-galactose sur le DAG. Le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) est généré par transfert d'un galactose supplémentaire de l'UDP-galactose sur le MGDG.

La biosynthèse du SQDG et notamment la synthèse de sa tête polaire, repose sur la disponibilité de l'UDP-sulfoquinovosyl synthétisé à partir de l'UDP-Glucose et sur le transfert du sulfoquinovosyl sur la position *sn*-3 du DAG. La production de SQDG a lieu uniquement au niveau du chloroplaste bien que le DAG issu du RE puisse être un substrat de la réaction (Benning, 2007).

3. Synthèse des sphingolipides

La Figure 9 résume les grandes réactions du métabolisme des sphingolipides (pour revue détaillée, Zheng et al., 2006). Le métabolisme des sphingolipides est lié à celui des glycérolipides, de par le partage de métabolites importants (palmitoyl-CoA, sérine, éthanolamine, CDP-choline, UDP-oses) de par l'existence de transfert de têtes polaires, et de

par la spécificité de certaines enzymes de synthèses capable de catalyser les mêmes réactions sur des substrats glycérolipiques et sphingolipides (Maréchal et al., 2002).

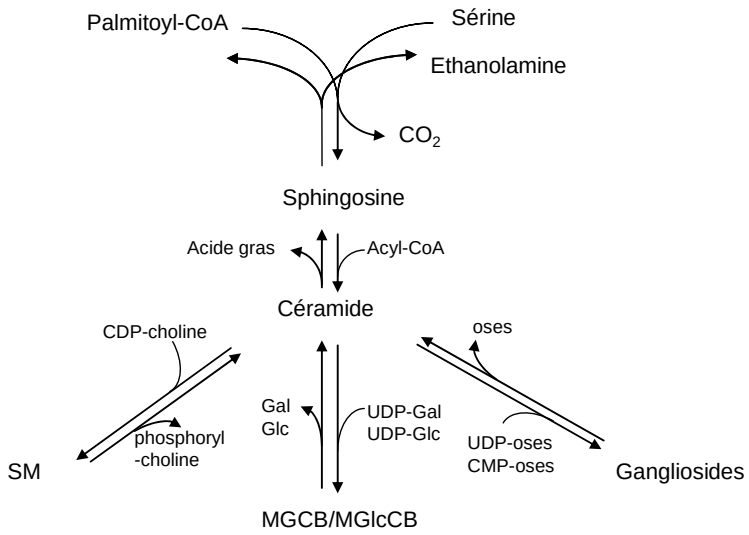


Figure 9 : Schéma général des réactions du méabolisme des sphingolipides.

C. Compartimentation, homéostasie et dynamique membranaire dans les cellules eucaryotes

Les lipides membranaires peuvent se déplacer latéralement au sein d'un feuillet membranaire, transversalement d'un feuillet à l'autre, ou être transférés d'une membrane à une autre.

1. Diffusion des lipides au sein d'une membrane

- ***Déplacements latéraux***

La diffusion des lipides dans le plan latéral d'une membrane est rapide (0,1-1 $\mu m^2.s^{-1}$; Jouhet, 2005). La distribution en lipides d'organites connectés par des vésicules devrait donc pouvoir s'équilibrer spontanément et rapidement. Pourtant, ce phénomène n'est pas observé car il existe des systèmes préservant une composition lipidique spécifique de chaque compartiment membranaire et l'ajustant au cours de processus cellulaires.

- ***Déplacements transversaux (flip-flop et translocation)***

Le mouvement au travers d'une bicouche s'appelle flip-flop. Il est très rapide pour le DAG alors qu'il prend plusieurs heures pour les phospholipides ou les glycolipides. Ces mouvements sont facilités par des protéines appelées flippases (Pomorsky et al. 2004). Les flippases énergie-indépendantes catalysent un mouvement ATP-indépendant. Le flip-flop qui

en résulte peut être spécifique d'un type de lipide, ne peut pas déplacer les lipides contre un gradient et maintien une symétrie des feuillets. Les mouvements peuvent-être des translocations ATP-dépendantes au cours desquelles des lipides spécifiques sont transloquées par des translocases, permettant des déplacements de lipides contre un gradient et le maintien de l'asymétrie d'une membrane.

2. Transfert de lipides d'une membrane à une autre

- ***Transfert vésiculaire***

Les échanges de lipides entre différentes membranes sont rapides pour des lipides possédant une seule chaîne d'acides gras, comme la lyso-PC, ou des acides gras courts (4 à 6 carbones). En revanche, les transferts de lipides possédant deux longues chaînes d'acides gras sont quasi inexistants alors qu'ils sont essentiels pour le fonctionnement des organites et la survie de la cellule. Des systèmes de transport de lipides par voies vésiculaires ou non-vésiculaires sont alors mobilisés. Le réticulum endoplasmique, site de synthèse de la majorité des phospholipides, des stérols, des sphingolipides et de nombreuses protéines, est un organite central de la cellule, en relation avec tous les autres compartiments. Avec ou sans l'appareil de Golgi, il intervient dans l'approvisionnement en protéines et en lipides des vacuoles et de la membrane plasmique par l'intermédiaire de vésicules se déplaçant le long de filaments d'actine (Samaj et al., 2004). L'ensemble de ces transports vésiculaires a beaucoup été étudié du point de vue du transport des protéines membranaires ou destinées à la sécrétion (Staehelin, 1997) mais très peu de données ont été collectées au niveau du contenu lipidique de ces vacuoles.

- ***Transfert par les zones de contacts***

Les organites des cellules eucaryotes sont mobiles et ont la possibilité de créer des zones de contact. Deux types de transferts par contacts membranaires ont été caractérisés à ce jour : par zones de contact directs entre membranes ou par rapprochement des membranes et transferts lipidiques associés à des protéines.

Le réticulum est un carrefour pour les transferts de lipides. Il est le lieu de la synthèse des phospholipides ou du DAG qui sont ensuite acheminés à l'ensemble des autres membranes cellulaires soit par la voie vésiculaire décrite précédemment, soit par contact direct entre les membranes. Ces zones correspondent à des secteurs où les membranes sont distantes de moins de 10 nm (Holthuis et Levine, 2005). Le réticulum possède de nombreux sous-domaines spécialisés qui interagissent avec d'autres organites comme les mitochondries, la vacuole, la membrane plasmique, les gouttelettes lipidiques et les chloroplastes chez les plantes (Staehelin, 1997). Un de ces domaines appelé MAM (Mitochondria Associated Membrane) permet notamment l'approvisionnement des mitochondries en PS. Chez les levures, la PE peut aussi être transférée du réticulum à la membrane plasmique selon le même mécanisme grâce à l'intervention d'un PAM (Plasma Membrane Associated Membrane)

(Holthuis et Levine, 2005). Les plastes des cellules végétales sont aussi capables de produire des structures tubulaires appelés stromules, capables d'interagir avec d'autres plastes, voire avec d'autres organites.

Au niveau des zones de contact, l'intervention de protéines permettant de créer des ponts entre organites et de catalyser le transfert des lipides a été caractérisée. Les protéines permettant ce type de transfert lipidique, les LTP (Lipid Transfer Proteins) ont été caractérisées chez les levures (Schrick et al., 2004), les mammifères (Hanada et al., 2003) et *Arabidopsis thaliana* (pour revue Kader, 1997 ; Breiteneder et Mills, 2005).

3. Trafic de lipides dans les cellules eucaryotes

Dans les cellules eucaryotes, les compartiments membranaires ne sont pas strictement séparés les uns des autres par des membranes figées. Un flux endomembranaire permanent existe entre le réticulum, l'enveloppe nucléaire, le Golgi, les endosomes, les vacuoles, etc. et la membrane plasmique, soit du fait de la connexion directe entre ces compartiments, ou grâce à des vésicules qui bourgeonnent à partir d'un compartiment et fusionnent avec un autre (Figure 10). Ce flux membranaire permet le transfert spontané de lipides polaires. Si la diffusion de lipides par le flux membranaire n'était pas contrôlée et régulée, un état d'équilibre devrait être observé, ce qui n'est pas le cas.

Les organites semi-autonomes simples tels que les mitochondries et les plastes primaires (voir plus loin) sont en dehors de ce flux membranaire (voir Figure 10). Le trafic inter-organites, qu'il soit ou non vésiculaire, est encore mal compris du point de vue des lipides. De nombreuses protéines telles que des flippases, translocases et LTP ont été caractérisées, mais les données sont encore trop fragmentaires pour extraire un schéma d'ensemble.

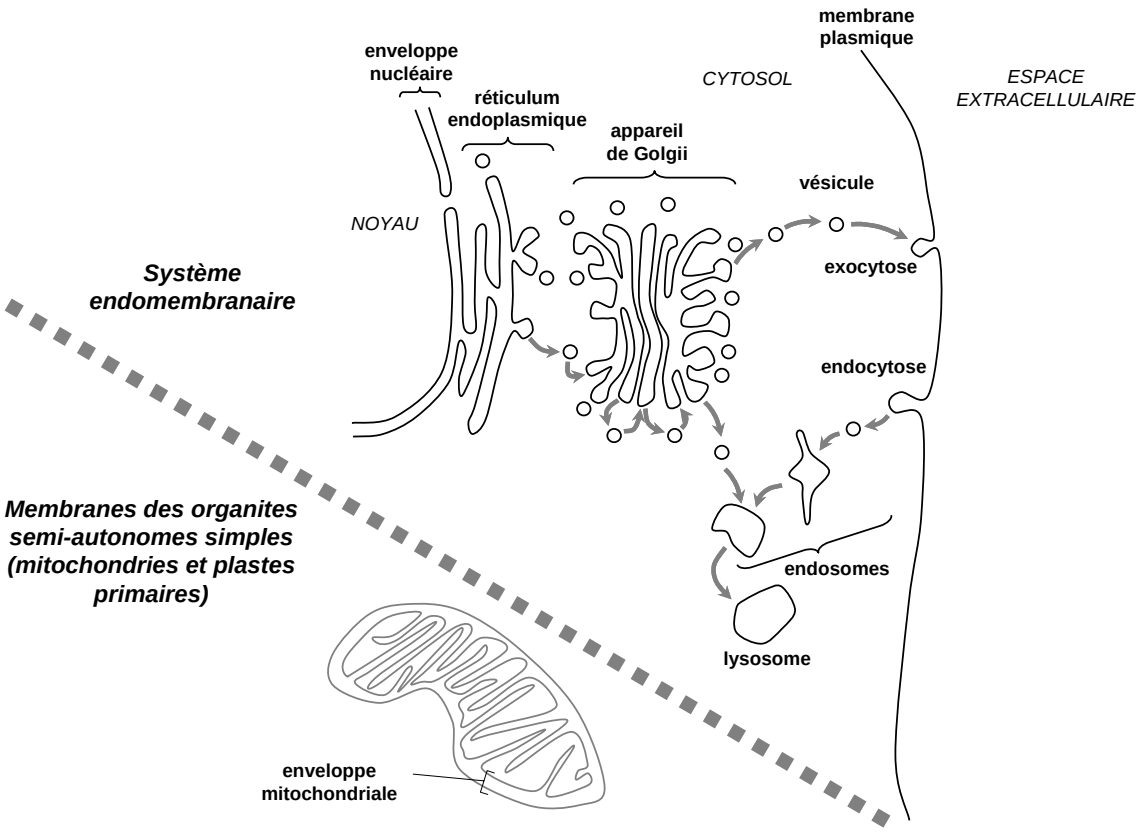


Figure 10 : Compartimentation des cellules eucaryotes et trafics membranaires. Le *système endomembranaire* est constitué de compartiments dont la biogenèse et la dynamique sont liées à l'échelle de la cellule entière par connexion membranaire directe ou trafic vésiculaire. Les transferts de lipides peuvent s'effectuer spontanément par diffusion latérale et au cours du trafic vésiculaire. Des mécanismes de tri sont opérés au cours de ce trafic membranaire, aboutissant à des membranes de compositions lipidiques distinctes. Les membranes des organites semi-autonomes simples (mitochondries et plastes primaires) ont une biogenèse et une dynamique membranaire en dehors du trafic vésiculaire général. Les transferts de lipides d'une membrane à une autre, depuis et / ou vers le système endomembranaire, nécessitent l'emprunt de systèmes spécifiques de transport vésiculaire ou non.

Le modèle cellulaire végétal a été particulièrement exploité pour étudier les trafics lipidiques entre compartiments car les techniques de fractionnement subcellulaire ont permis la détermination directe du contenu lipidique des différents compartiments membranaires, dans différents types cellulaires, tissus, organes, etc. et dans différentes conditions physiologiques. De plus, le modèle végétal présente l'avantage de posséder des lipides dont la compartimentation est très tranchée : on retrouve par exemple les galactolipides au niveau des plastes et ces lipides peuvent être re-localisés dans d'autres systèmes membranaires dans certaines conditions de stress telles que la carence en phosphate. Ce phénomène particulier est considéré comme un modèle simple pour analyser et comprendre les processus de régulation et de contrôle de la distribution des lipides au sein des compartiments membranaires.

III. Particularités de la synthèse, compartimentation et dynamique des lipides dans les cellules végétales

A. Compartimentation des cellules végétales

La définition du monde végétal (les plantes au sens commun) est difficile. Si on s'en tient à la tradition, les plantes sont vertes et inanimées, ce qui permet de les distinguer des animaux. Le qualificatif végétal est selon ces termes, lié d'une part à la capacité d'effectuer la photosynthèse : le chloroplaste est donc un des attributs caractéristique de la cellule végétale. D'autre part, la non-animation des plantes s'accompagne de propriétés structurales permettant d'occuper l'espace et de capter la lumière solaire, et de stratégies de cycles biologiques et de dissémination passive permettant d'affronter les aléas climatiques, rencontrer les partenaires sexuels, etc. sans pour autant s'animer. Les cyanobactéries chez les procaryotes et les plantes supérieures, appartiennent ainsi simplement au monde végétal. Chez les protistes, la catégorisation végétal (algues) / animal (protozoaires) résiste mal puisque certains organismes chlorophylliens sont munis de flagelles et peuvent se mouvoir alors que d'autres ont perdu leur chloroplaste et ont adopté une vie hétérotrophe.

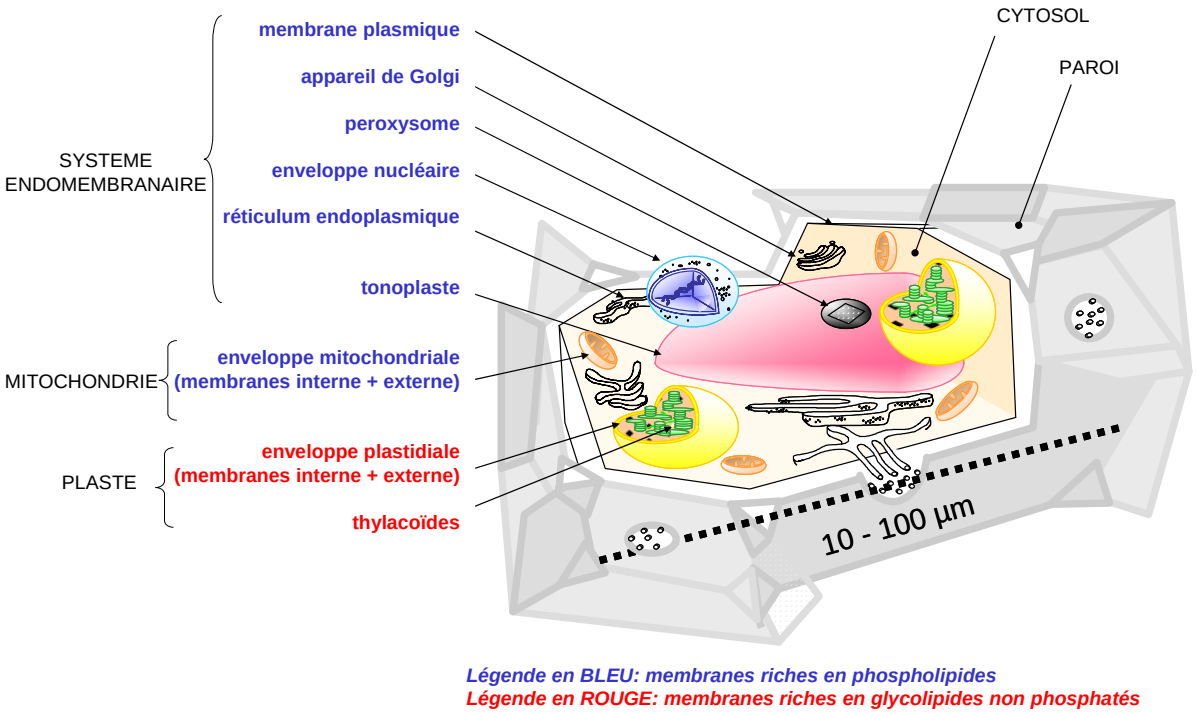


Figure 11 : Représentation schématique de la compartimentation d'une cellule végétale.

Dans le cas considéré comme général, une cellule végétale est donc une cellule eucaryote dont le plan d'organisation partage avec celui des cellules animales et des champignons, un système endomembranaire et des mitochondries. Il s'ajoute à ces compartiments « classiques », un plaste limité par une enveloppe constituée de deux

membranes. Le plaste est au cœur de la synthèse des lipides dans les cellules végétales (Figure 12).

B. Le plaste, un organite central de la synthèse des lipides chez les plantes

Les plastes sont des organites majeurs des plantes et des algues. Ils sont le lieu de réactions importantes du métabolisme (*e.g.* la photosynthèse, la synthèse des acides gras, etc.) et du stockage de nombreux produits comme l'amidon. Chez les plantes, la synthèse des acides gras n'a lieu qu'au niveau du plaste par l'intermédiaire de la FAS II (Voir paragraphe B-1). Il permet notamment la synthèse des acides gras (Figure 12, 1) et de glycérolipides (Figure 12, 2) qui peuvent être exportés vers le RE (Figure 12, 3) ou d'autres compartiments membranaires. Le plaste joue donc un rôle crucial pour l'ensemble des cellules végétales, y compris non photosynthétiques.

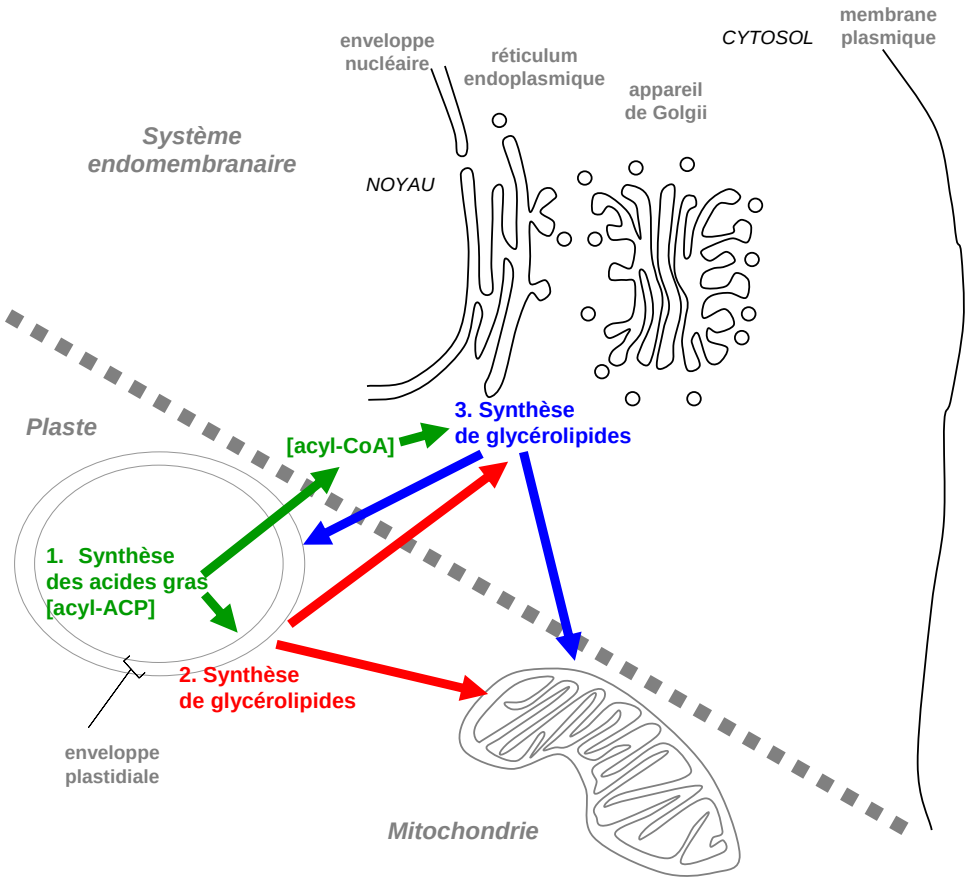


Figure 12 : Schéma général des synthèses et trafics d'acyl lipides entre les organites semi-autonomes et les membranes du système endomembranaire. La synthèse des acides gras est réalisée dans le stroma des plastes (en vert). Les acyls sont des précurseurs, soit pour une synthèse de glycérolipides au niveau du réticulum (en bleu), générant des glycérolipides de structure dite « eucaryote », soit pour une synthèse au niveau de l'enveloppe plastidiale (en rouge), générant des glycérolipides de structure dite « procaryote ». Un trafic de glycérolipides « eucaryotes » et « procaryotes » s'opère. Les galactolipides synthétisés par l'enveloppe plastidiale contribuent sous certaines conditions, à la biogenèse des membranes extraplastidiales (système endomembranaire et mitochondrie) (flèches rouges).

Tous les plastes dérivent des proplastes que l'on trouve dans les cellules embryonnaires (zygote et méristèmes, tissus peu ou indifférenciés formant une zone de croissance où ont lieu les mitoses). Chez les végétaux supérieurs, les proplastes évoluent de manière très différente suivant l'organe ou la cellule dans laquelle ils se trouvent : dans la racine, ils se différencient en amyloplastes ; dans les tissu photosynthétiques (feuilles), en chloroplastes ; dans certains fruits et au niveau des fleurs, en chromoplastes et enfin dans certaines feuilles placées à l'obscurité, en étioplastes. Les transformations d'un type plastidial à l'autre sont possibles, selon un processus appelé « interconversion plastidiale » (Figure 13).

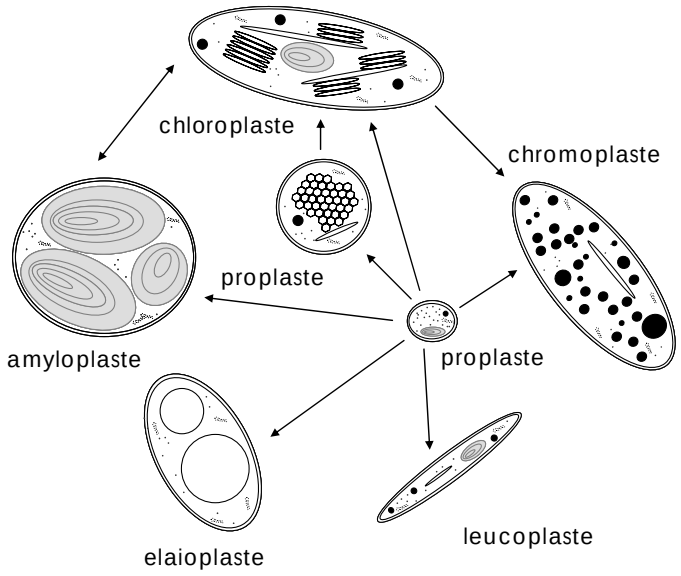


Figure 13 : Interconversion plastidiale. Tous les plastes observés dans les cellules des végétaux supérieurs dérivent d'un plaste embryonnaire (proplaste). Les plastes peuvent être chlorophylliens ou non. Dans tous les cas, la seule structure membranaire commune est l'enveloppe (membrane interne et membrane externe).

Le plaste est un organite semi-autonome tout comme la mitochondrie. Il possède donc son propre ADN circulaire. Le génome plastidial contient environ 100 gènes codant pour des ARNt et des ARNr, des protéines impliquées dans la photosynthèse, la transcription et la traduction des gènes plastidiaux. Ceci ne représente néanmoins qu'une minorité des protéines nécessaires à la biogénèse et au maintien d'un plaste fonctionnel. Le noyau code pour la grande majorité de ces protéines qui sont importées dans les plastes. L'expression de ces protéines importées est régulée en même temps que celles synthétisées au niveau du plaste.

Les données biochimiques et moléculaires démontrent que l'ensemble des plastes serait issu de l'endosymbiose primaire unique d'une cyanobactérie Gram négative ancestrale, un des premiers organismes photosynthétiques (Palmer 2003). L'endosymbiose primaire aurait donné naissance à trois grands groupes d'eucaryotes contenant des plastes simples :

(i) les endosymbiontes primaires verts (*Viridiplantae*) comprenant les algues vertes, *e.g. Chlamydomonas* et les plantes supérieures, *e.g. Arabidopsis*,

(ii) les endosymbiontes primaires rouges rassemblant les algues rouges,

(iii) les endosymbiontes primaires bleus, *e.g. Cyanophora*.

La Figure 14 résume ce modèle d'évolution.

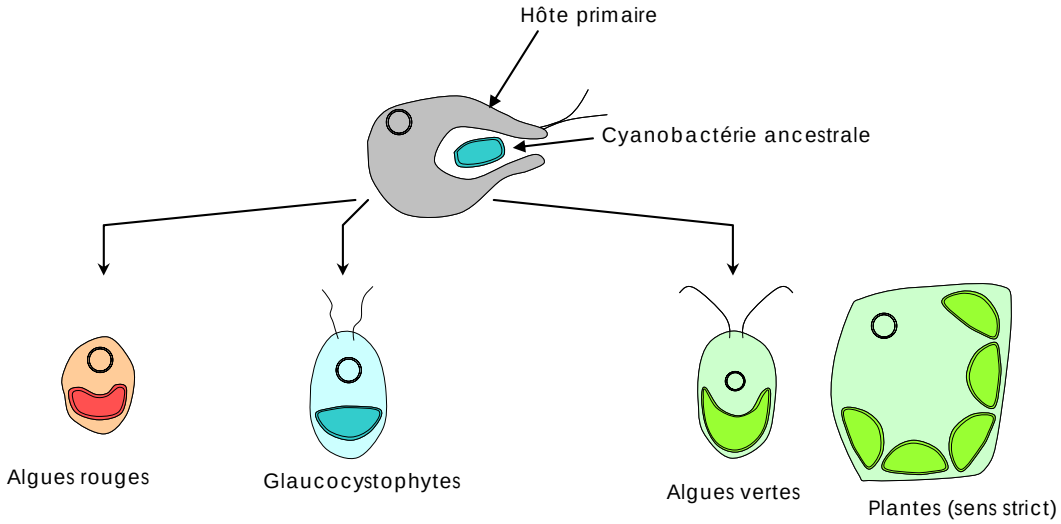
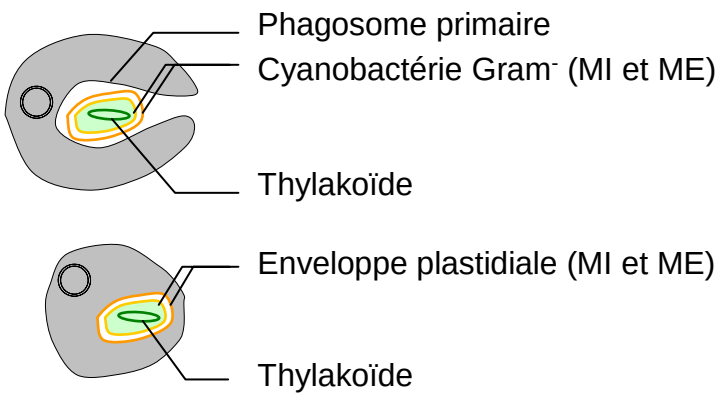


Figure 14 : Endosymbiose primaire à l'origine des cellules végétales (d'après Archiblad et Keeling, 2002).

L'endosymbiose est à l'origine de la compartimentation membranaire du plaste. En particulier, l'enveloppe formée de deux membranes qui limite le plaste serait issue des deux membranes de la cyanobactérie ancestrale (Figure 15).

Figure 15 : Endosymbiose primaire et origine des membranes des plastes. Les deux membranes de l'enveloppe du plaste seraient isues de la membrane externe et de la membrane interne de la bactérie Gram- à l'origine du plaste. La membrane du phagosome ne serait donc pas à l'origine de la membrane externe de l'enveloppe du plaste. Les thylacoïdes étaient déjà présents dans la bactérie ancestrale et ont été conservés lors de l'endosymbiose (d'après Archiblad et Keeling, 2002).



L'enveloppe est la seule structure membranaire permanente de l'ensemble des plastes. Une méthode de séparation et de purification des différents compartiments des plastes a été mise au point au laboratoire PCV (Figure 16) (Douce et al. 1973, Joyard et al. 1983). L'analyse biochimique des différentes structures membranaires du plaste montre une composition lipidique tout à fait particulière et unique dans le monde du vivant. En effet, chez les animaux et les levures ainsi que dans les membranes extraplastidiales, les phosphoglycérolipides constituent la classe lipidique prépondérante. Les membranes plastidiales (enveloppe et thylakoïde) sont quant à elles, en majorité constituées de galactolipides (MGDG et DGDG), lipides neutres et dont la concentration peut atteindre 80% du contenu lipidique total (Tableau 5).

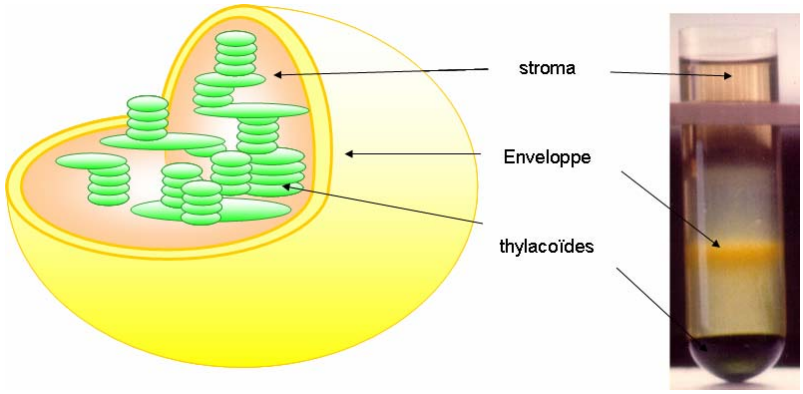


Figure 16 : Le chloroplaste présente un système membranaire dense et complexe. L'enveloppe est formée d'une membrane externe et d'une membrane interne. Les thylakoïdes s'empilent sous forme de grana. Chaque compartiment peut être fractionné sur gradient de saccharose permettant l'analyse des constituants et des réactions enzymatiques.

Dans les chloroplastes, le MGDG et le DGDG constituent 50% et 30% des membranes des thylacoïdes, respectivement (Siegenthaler 1998). Les autres lipides constituant les membranes des thylakoïdes sont le SQDG et le PG, qui tous deux portent une charge négative au pH physiologique. La PC est retrouvée comme constituant mineur de la membrane externe du chloroplaste. Cette composition lipidique est conservée chez les cyanobactéries et avec certaines variations, chez l'ensemble des unicellulaires photosynthétiques.

Membranes	PC	PE	PG	PI	PS	DPG	MGDG	DGDG	SQDG	stérols	Glyco-SL
Voie vésiculaire (flux endomembranaire)											
Réticulum +Golgi	43-48	23-26	6	6	3					4-15	
Tonoplaste	15-28	15-28	2	5-9	2					14-43	12-17
Membrane plasmique	8-36	9-32	1-5	1-6	1-10					5-60	6-30
Chloroplastes											
Membrane externe	32		10	5			17	30	6		
Membrane interne			9	1			55	30	5		
Thylakoides			7	1			58	27	7		
Mitochondries											
Membrane externe	52	22	3	10						13	
Membrane interne	37	33	2	4		11				13	

Tableau 5 : composition lipidique des membranes des cellules végétales (en %) (d'après Moreau et al., 1998 ; Jouhet, 2005). **Glyco-SL, glycosphingolipides.**

L'enveloppe joue un rôle fondamental dans la biogenèse et le fonctionnement des plastes. Elle contrôle les échanges de métabolites avec le cytosol ; elle contrôle l'import des protéines synthétisées dans le cytosol sous forme de précurseurs ; elle porte de nombreuses activités enzymatiques.

Pour la part protéique, l'import des précurseurs codés par le génome nucléaire est strictement dépendant de la présence d'une séquence d'adressage clivable, appelée transit peptide, en position N-terminale. Cet import est assuré par les complexes protéiques de translocation TOC (*translocon at the outer membrane of chloroplast*, au niveau de la membrane externe) et TIC (*translocon at the inner membrane of chloroplast*, au niveau de la membrane interne). Les complexes sont situés sur l'enveloppe des plastes (Figure 17).

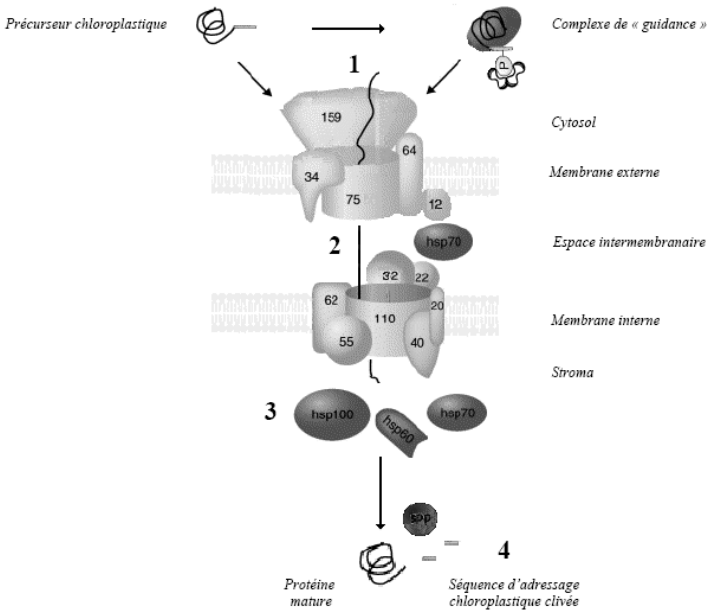


Figure 17 : Modèle d'import des précurseurs chloroplastiques dans le stroma et libération de la protéine mature (schéma modifié à partir de Soll, 2002). Les précurseurs protéiques interagissent avec le complexe TOC et s'engagent dans le processus d'import (1). Cette interaction peut être facilitée par la formation d'un complexe de « guide » avec les protéines chaperones de type 14-3-3 du cytosol. Le précurseur est transféré vers l'espace intermembranaire par l'activité ATPasique d'une autre série de protéines chaperones (2). La formation d'un supercomplexe d'import permet alors au précurseur de s'engager dans le complexe TIC. L'activité ATPasique de chaperones du stroma permet au précurseur de traverser l'enveloppe des chloroplastes (3). Enfin, dans le stroma, la protéine mature est liberée par l'activité d'une peptidase spécifique (SPP) (4).

L'insertion du transit peptide pourrait être facilitée par la présence du MGDG dans les membranes de l'enveloppe. En effet, certaines protéines importées dans le chloroplaste (Rubisco, la plastocyanine et la ferridoxine) possèdent un transit peptide qui a une affinité élevée pour le MGDG (Bruce, 1998). Certaines protéines semblent utiliser un système d'import indépendant de celui-ci (Miras et al. 2007).

L'enveloppe participe à d'autres processus critiques pour la biogenèse plastidiale. En particulier, l'enveloppe porte des activités importantes pour la synthèse de composés terpéniques tels que les caroténoïdes et les précurseurs de la chlorophylle, tous deux indispensables à la photosynthèse. De plus, l'enveloppe produit elle-même la majeure partie des lipides du plaste : les galactolipides (voir synthèse du MGDG et DGDG), les sulfolipides et le PG (pour revue Douce et Joyard, 1990). L'ensemble de ces fonctions de synthèse lipidiques caractérisées au niveau de l'enveloppe plastidiale, sont cruciales à la biogénèse du plaste.

Les galactolipides sont indispensables pour la croissance des cellules végétales en conditions de culture normale mais aussi en condition de carence en phosphate. De plus, ils semblent indispensables à une efficacité maximum du processus de photosynthèse. Le plaste constitue donc un site essentiel à la synthèse des lipides, autant pour les besoins propres de cet organite que pour les autres compartiments membranaires.

C. Synthèse et dynamique subcellulaire des galactolipides dans les cellules dotées de chloroplastes simples

- ***Structure et composition des galactolipides végétaux***

Les deux formes prédominantes des galactolipides chez les organismes photosynthétiques sont le MGDG et le DGDG, mais ils ne sont pas les seuls. Le MGDG contient en position *sn*-3, un résidu galactosyl lié par une liaison glycosidique β en position 1 du galactose (Figure 18A). Le DGDG contient un deuxième résidu galactose lié au premier *via* une liaison α(1-6) (Figure 18A). Certaines espèces contiennent des oligogalactolipides moins communs (Benson et al 1958). Ces lipides comportent trois (trigalactosyldiacylglycérol, triGDG), voire quatre (tétraGDG) résidus galactose. Il existe au moins trois « sous-classes » distinctes de ces oligogalactolipides, selon leur configuration anomérique (Figure 18B-D). La série 1 (Figure 18B), qui dérive de la configuration commune des galactolipides et la série 2 (Figure 18C) ont été détectées chez le haricot Adzuki (Kojima et al. 1990) (*Vigna angularis*). La série 3 (Figure 18D) est présente dans le tégument de la graine de riz (Fujino et al 1979). Contrairement aux têtes polaires qui restent très conservées, il existe une grande variété dans la taille, le degré d'insaturation et la distribution (positions *sn*-1 et *sn*-2) des chaînes d'acides gras portées par les galactolipides, selon leur voie de synthèse.

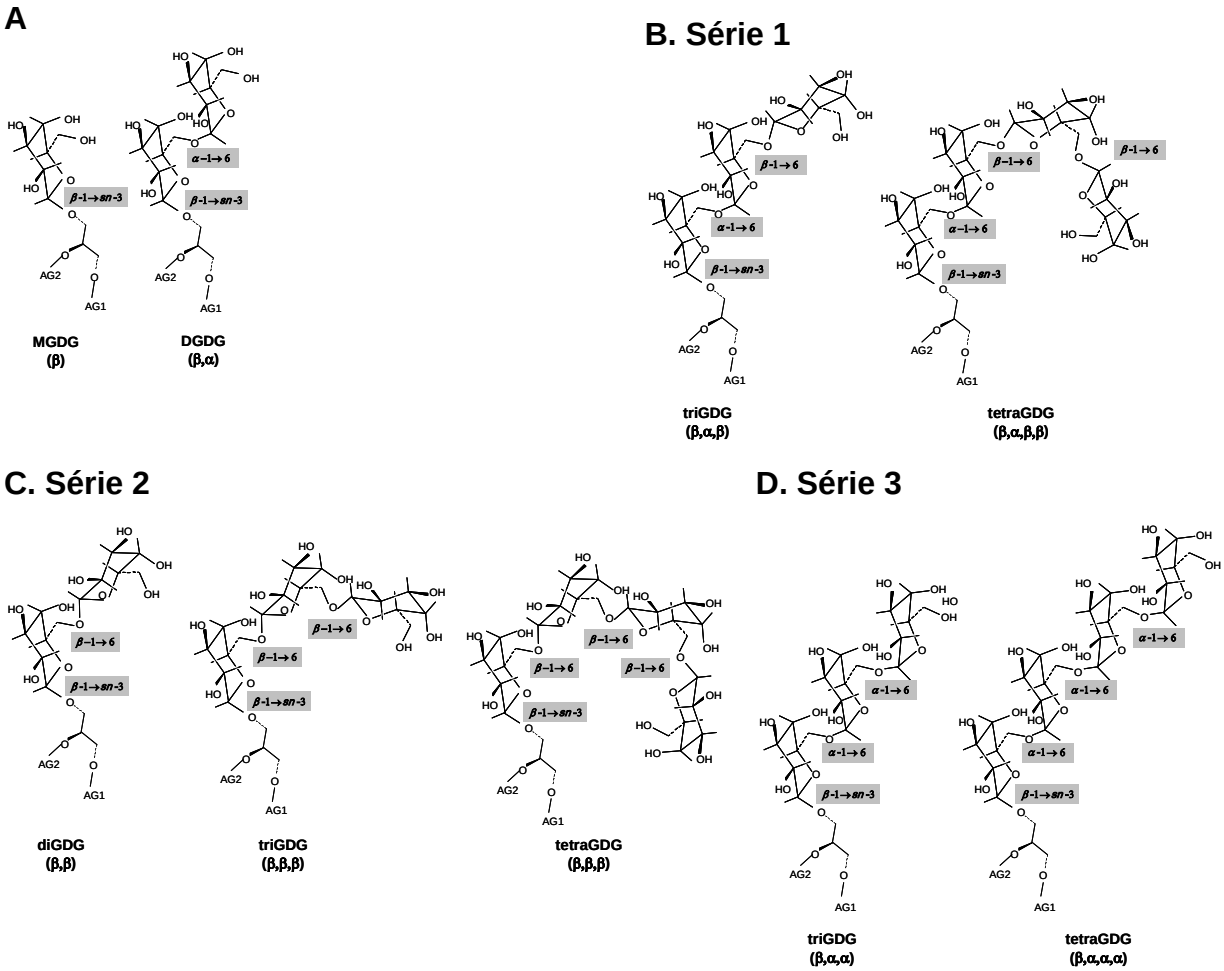


Figure 18 : Structure chimique des galactolipides de plantes. (A) Isomères communs du MGDG et du DGDG. (B-D) Séries des oligoglalactolipides peu communs rencontrés chez certaines plantes. L'anomérie de la liaison osidique est notée entre parenthèse. D'après Kelly et Dörmann 2004.

- ***Synthèse des galactolipides MGDG et DGDG par l'enveloppe plastidiale***

Les galactolipides végétaux sont synthétisés au niveau de l'enveloppe de plaste à partir du DAG et de l'UDP-Galalctose (Awai et al 2001, Miège et al. 1999, Froelich et al 2001, Kelly et al. 2003). Néanmoins, leurs précurseurs ne sont pas nécessairement issus du plaste. Le DAG peut être issu de la voie plastidiale dite « procaryotique ». Il porte alors une chaîne d'acide gras en C16 sur la position *sn*-2 du glycérol. Il peut aussi être issu de la voie dite « eucaryotique » réalisée dans le réticulum. Il porte alors deux chaînes à 18 atomes de carbones.

- *Synthèse du MGDG*

La première étape de synthèse des galactolipides est la synthèse du MGDG. Elle est catalysée par la MGDG synthase (MGD) qui permet le transfert d'une unité galactose provenant d'un UDP-Gal sur la position *sn*-3 d'un DAG. La réaction de galactosylation est accompagnée d'une inversion de l'anomérie du sucre, α sur l'UDP-Gal et β sur le MGDG.

Les glycosyltransférases répertoriées, dont fait partie la MGD (MGDG synthase), ont été classées par familles, sur la base de leurs similarités de séquence (Coutinho et Henrissat 1999 ; [CAZY]). Les MGDG synthases de plantes font partie de la famille GT28. Les séquences des MGDs montrent de fortes similarités avec celles d'une famille de glycosyltransférases bactériennes appelées MurG, impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne des bactéries E*. coli, B. subtilis* et *S. aureus* (Shimojima et al. 1997, Jorasch et al. 1998 et 2000).

Chez *Arabidopsis*, il existe 3 gènes codant pour des MGD, classées en deux familles (type A et B) selon qu'elles possèdent un transit peptide chloroplastique clivable en N-terminal (type A) ou une séquence d'adressage plus courte (type B). Pour le type A, la MGD1 d'*Arabidopsis* est fortement exprimée durant l'ensemble des stades de développement de la plante (Awai et al., 2001). Elle est responsable de la synthèse de la majeure partie du MGDG plastidial (Jarvis et al., 2000). L'activité des MGD de type A a été mesurée uniquement au niveau de la membrane interne de l'enveloppe (Awai et al 2001, Shimojima et al 1997). L'expression des enzymes de type B (MGD2 et MGD3) dépend du stade de développement de la plante et elle est restreinte à quelques organes, en particulier les tissus non photosynthétiques, comme les inflorescences (MGD2) et les racines (MGD3). Les MGD de type B semblent également impliquées au cours de la germination du grain de pollen et de la croissance du tube pollinique où les galactolipides contribuent à la croissance membranaire extraplastidiale (Kobayashi et al 2004). Les enzymes de type B semblent exclusivement ancrées dans la membrane externe de l'enveloppe.

Les propriétés biochimiques des MGDs analysées à partir des fractions membranaires de l'enveloppe d'épinard, ont montré que ces enzymes possèdent une affinité plus ou moins grande selon l'espèce de DAG utilisé comme substrat, la plus grande étant pour le 18:2/18:2, structure générée au niveau du réticulum (Maréchal et al. 1994 a et b). L'ensemble des données biochimiques accumulées lors de ces études est résumé sur la Figure 19. Par ailleurs, il semblerait que l'état redox de la MGD1 permette de réguler son activité (Yamaryo et al. 2003, Benning et Ohta 2005), probablement par l'intermédiaire d'une thiorédoxine de l'enveloppe (Yamaryo et al. 2006).

Aucune donnée concernant la structure tridimensionnelle ainsi que la topologie et le fonctionnement des différents sites actifs de l'enzyme n'étaient disponibles au début des travaux présentés dans ce mémoire.

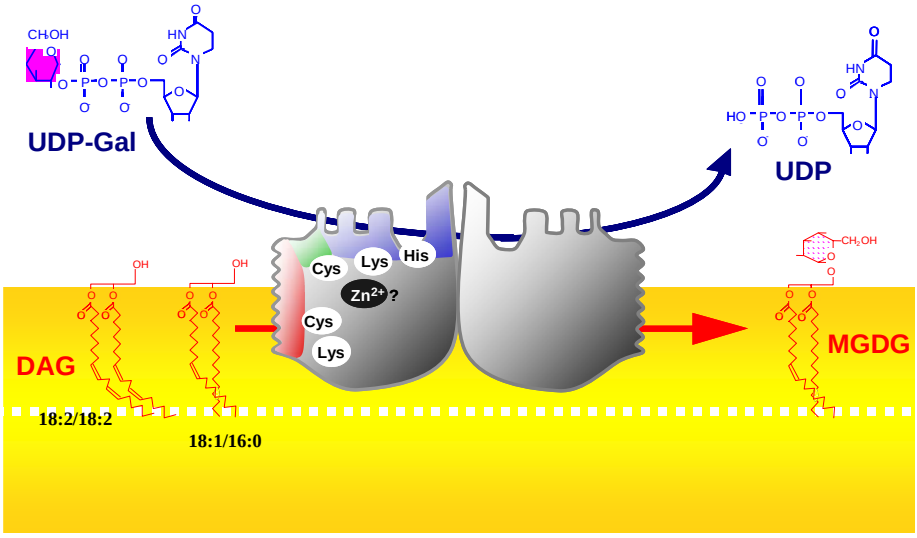


Figure 19 : La MGDG synthase de plantes est une galactosyltransférase qui permet le transfert d'un galactose sur un DAG accepteur. Les analyses enzymologiques et biochimiques de l'activité MGDG synthase de l'enveloppe de chloroplaste d'épinard ont montré que l'enzyme correspondante est monotypique, dimérique, qu'elle posséde des sites de fixations distincts pour le DAG et l'UDP-Gal. La MGDG synthase possède des cystéines, des lysines et des histidines au voisinage des sites de fixation des substrats ainsi qu'un cation divalent, probablement du Zn^{2+} (Maréchal et al., 2000)

Bien qu'une cyanobactérie ancestrale soit considérée à l'origine du chloroplaste et que la composition membranaire de l'ensemble des cyanobactéries étudiées à ce jour soit proche de celle du chloroplaste (Joyard et al. 1998), la synthèse de MGDG se déroule selon un processus différent chez les cyanobactéries. Sato et Murata (1982) ont montré en particulier que la synthèse du MGDG implique un mécanisme enzymatique en deux étapes, avec synthèse de monoglucosyldiacylglycérol (MGlcDG) dans un premier temps, puis conversion par une épimérase du MGlcDG en MGDG. La première étape de synthèse est catalysée par une MGlcDG synthase UDP-Glc dépendante, dont le gène a été récemment identifié, cloné et caractérisé après expression chez *E. coli*. Les MGlcDG synthases et les MGDs ne partagent qu'une très faible similarité de séquence (Awai et al. 2006) (Figure 20).

Cyanobactéries :

DAG + UDP-Glc → MGlcDG + UDP

MGlcDG → MGDG

Plantes supérieures:

DAG + UDP-Gal → MGDG

Figure 20 : Voies de synthèse du MGDG chez les cyanobactéries et chez les plantes supérieures. Chez les cyanobactéries, la première étape est catalysée par une MGlcDG synthase, la deuxième par une épimérase spécifique du MGlcDG alors que chez les plantes, la synthèse du MGDG est catalysée par une seule enzyme, la MGDG synthase décrite plus haut.

- *Synthèse du DGDG*

La deuxième étape de synthèse des galactolipides est elle aussi réalisée par une galactosyltransférase UDP-Gal dépendante. La réaction permet le transfert d'une unité galactose directement sur le MGDG, substrat de la réaction. Le mécanisme réactionnel permet la rétention de l'anomérie α du galactose provenant de l'UDP-Gal, par création d'une liaison osidique $\alpha(1\rightarrow6)$. Le produit de réaction est donc un DGDG β,α.

D'après la classification des glycosyltransférases (Coutinho et Henrissat 1999 ; [CAZY]), les DGDG synthases (DGDs) font partie de la famille GT4 des glycosyltransférases, à la différence des MGD faisant partie de la famille GT28. L'activité DGD a pour la première fois été identifiée *in vivo* grâce à la caractérisation du mutant *dgd1* chez *Arabidopsis* dont la teneur en DGDG est fortement réduite (Dörmann et al. 1995). Suite à cette étude, le gène codant pour l'enzyme correspondante, DGD1, a été isolé et démontré comme étant responsable de la synthèse de la majeure partie du DGDG cellulaire chez les plantes (Dörmann et al. 1999). Le mutant *dgd1* montre un sévère retard de croissance. L'activité DGD résiduelle chez les plantes mutantes *dgd1* a été attribuée au second gène DGD du génome d'*Arabidopsis*, DGD2, qui a été identifié par similarité de séquence avec DGD1 (Kelly et Dörmann 2002, Klaus et al. 2002). Le mutant *dgd2* ne semble pas être affecté au niveau de sa croissance ni au niveau de son contenu en DGDG. L'inactivation des deux DGDs chez le mutant *dgd1-dgd2* a pour résultat la perte totale du DGDG, démontrant que ces deux gènes sont nécessaires et suffisants à la synthèse du DGDG *in vivo* chez *Arabidopsis* (Kelly et al. 2003). Les deux enzymesDGD1 et DGD2 possèdent un transit peptide. Elles ont été localisées au niveau de la membrane externe de l'enveloppe du plaste (Kelly et al., Froehlich et al. 2001).

- *Synthèse des oligogalactolipides*

Les études menées sur les DGDs ont permis de les distinguer d'une galactolipide:galactolipide galactosyltransférase (GGGT). Cette enzyme catalyserait le transfert d'une unité galactose provenant d'un MGDG sur un autre MGDG, formant ainsi du DGDG. Suivant le même procédé, les galactosylations supplémentaires de ce DGDG seraient à l'origine des oligogalactolipides triGDG et tétraGDG de type $\beta(1\rightarrow6)$ (Van Besouw et al. 1978, Wintermans et al. 1981, Heemskerk et al. 1990, Xu et al. 2003). Cette activité enzymatique est totalement indépendante de DGD1 et DGD2 et son rôle dans la synthèse des galactolipides reste obscure.

- *Trafic des galactolipides suite à leur synthèse*

La localisation des différentes enzymes de biosynthèse des galactolipides au niveau des membranes externes et internes de l'enveloppe soulève la question du transport des galactolipides entre les membranes de l'enveloppe ou vers les membranes du thylacoïde. Il existe nécessairement des systèmes de transport afin d'acheminer les galactolipides vers leur destination finale (Figures 21 et 22) mais aussi afin d'assurer le transport des précurseurs vers les différents sites de synthèse du chloroplaste.

Comme décrit précédemment, la MGD1 est responsable de la synthèse de la majeure partie du MGDG au niveau de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste. La membrane externe semble constituer un site secondaire de synthèse du MGDG par la présence MGD2 et MGD3 à ce niveau. Les mécanismes de transfert du MGDG entre les membranes de l'enveloppe restent inconnus à ce jour. Le MGDG produit à la membrane externe pourrait servir de précurseur au DGDG produit à la membrane externe par DGD1. Il a été suggéré que DGD1 pourrait être impliquée dans le transport du DGDG vers la membrane interne (Dörmann et al. 1999). Récemment, le transporteur de type ABC (ATP binding cassette) de *E. coli*, MsbA, a été démontré comme responsable du transport des lipides depuis la membrane plasmique jusqu'à la membrane externe (Doerrler et al 2001, Chang et Roth 2001). Des protéines similaires à ce transporteur étant abondantes chez *Arabidopsis* (Sánchez-Fernández, et al. 2001), il a été suggéré qu'elles pourraient être impliquées dans le transport des galactolipides de la membrane externe vers la membrane interne de l'enveloppe. Enfin, le transport des galactolipides depuis l'enveloppe vers les membranes des thylakoïdes est probablement réalisé par transport vésiculaire grâce à la protéine VIPP1 (vesicle inducing plastid protein 1). En effet, le mutant *vipp1* est incapable de former des vésicules normalement visibles dans le stroma. Il se retrouve largement déficitaire en membrane thylakoïdiennes (Kroll et al 2001). Cette protéine possède un homologue chez la cyanobactérie dont l'inactivation du gène provoque une déficience dans la mise en place des thylakoïdes de la même manière que chez les plantes. La Figure 21 synthétise le modèle actuel du transport des galactolipides synthétisés par l'enveloppe vers les thylacoïdes.

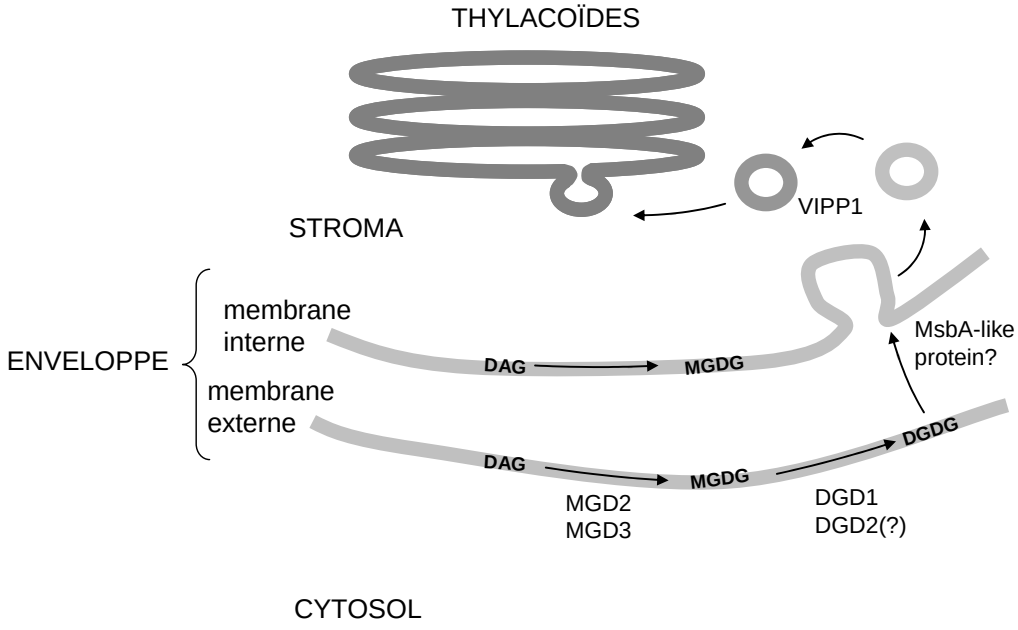


Figure 21 : Un réseau de transport complexe est nécessaire pour le transport des galactolipides depuis leur lieu de synthèse vers les membranes des thylacoïdes. Le schéma montre la localisation des différentes enzymes de synthèse des galactolipides (MGD1, MGD2, MGD3, DGD1, DGD2) ainsi que des protéines qui pourraient être impliquées dans leur transport (MsbA-like protein, VIPP1). D'après Dörmann et Benning 2002.

Les précurseurs d'origine « eucaryotique » à la synthèse des galactolipides (AP et DAG) proviennent du réticulum endoplasmique (Figure 22). Leur import semble facilité par des zones privilégiées de contact entre le réticulum et le plaste, zones appelées PLAM (plastid associated membranes) (Jouhet et al. 2006). Le transport à proprement dit est régulé de manière à exclure les lipides issus du réticulum (comme la PE et la PS). TGD1, une protéine homologue à une perméase bactérienne appartenant à la famille des transporteurs ABC, semble impliquée dans le transport des lipides du RE, i.e lipides eucaryotiques, vers le chloroplaste. En effet, le mutant *tgd1*, knock-out du transporteur, montre une réduction drastique dans sa composition en galactolipides d'origine « eucaryotique », compensée par une augmentation des galactolipides de type « procaryotique » (Xu et al. 2003). De plus, le mutant est fortement affecté au niveau de la teneur du chloroplaste en AP eucaryotique, ce qui est essentiel pour le développement embryonnaire (Xu et al. 2005). Cette déprivation provoque les mêmes conséquences que lors d'une inactivation des gènes de synthèse de l'AP (Yu et al 2004).

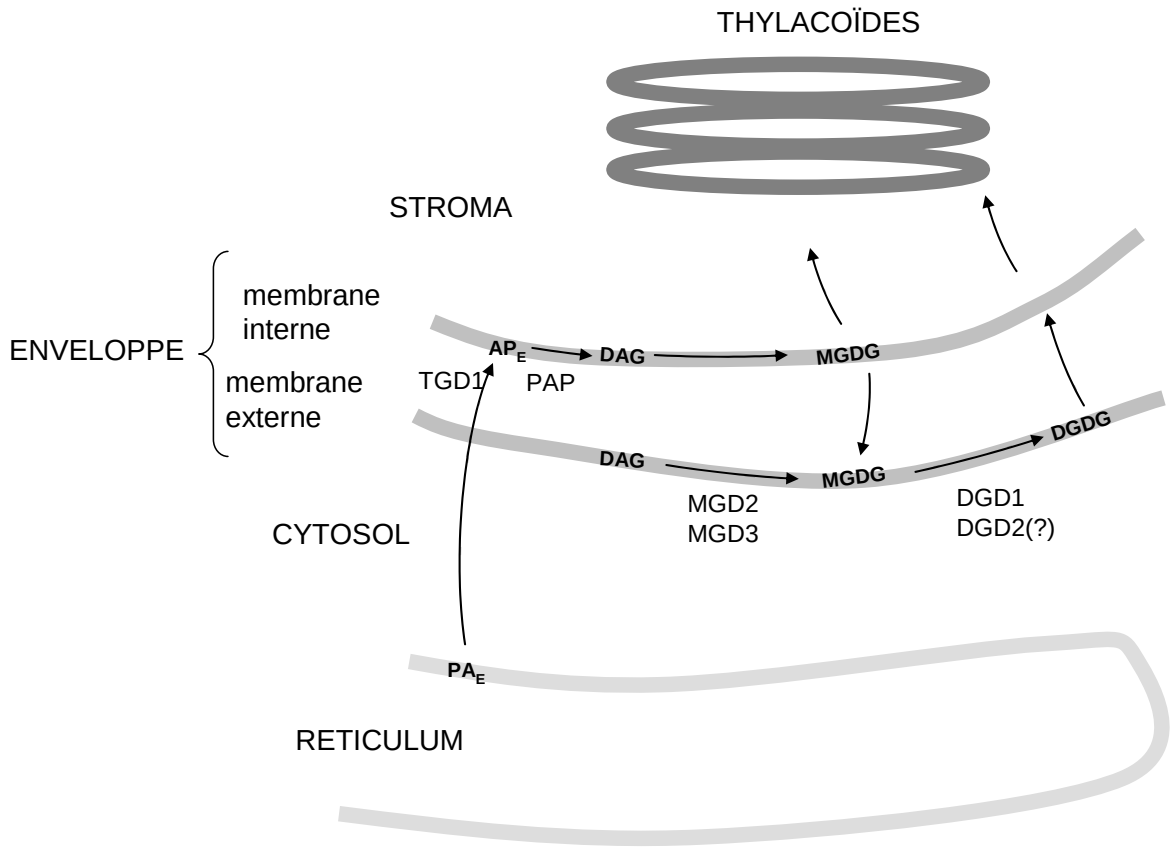


Figure 22 : Modèle du transport et de la destinée des galactolipides selon l'origine des précurseurs au niveau d'un PLAM (seules les enzymes principales de synthèse sont indiquées). L'acide phosphatidique eucaryote (AP_E) serait transporté au travers de la membrane interne du plaste par le transporteur TGD1 et rejoindrait le pool d'AP d'origine platidiale (AP de type « procaryotique » ou AP_P) avant d'être convertit en DAG.

- ***Rôle des galactolipides synthétisés par l'enveloppe plastidiale***

- *Rôle structural des galactolipides dans l'architecture membranaire*

De par la petite taille de sa tête polaire, le MGDG possède une forme conique supposée déstabiliser les bicouches lipidiques. Au contraire, le DGDG possède une forme cylindrique favorable à la formation des bicouches (Figure 23). On sait que le rapport entre lipides stabilisants et lipides déstabilisants des membranes est crucial pour le repliement, l'insertion (Gounaris et Barber 1983, Bogdanov et Dowman 1999) ainsi que pour le trafic intracellulaire des protéines (Kusters et al. 1994) et ce, pour l'ensemble des organismes vivants.

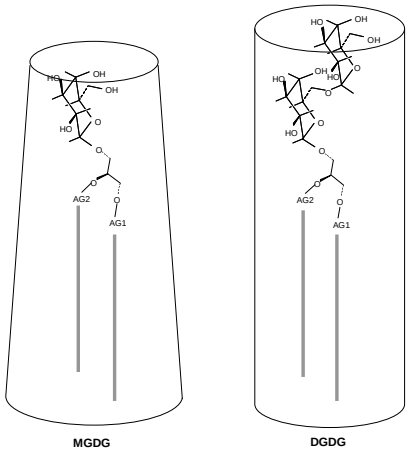


Figure 23 : La structure chimique des lipides est essentielle pour les caractéristiques structurales de ceux-ci au niveau de l'architecture membranaire. Le MGDG présente une forme générale « conique » supposée déstabiliser les membranes. Le DGDG possède une forme en cylindre plus favorable à la formation des bicouches lipidiques. D'après Fantini et al. 2002

Le mutant *dgd1* montre un défaut pour l'import des précurseurs de protéines du chloroplaste (Klaus et al. 2002). Le ratio entre MGDG et DGDG chloroplastique nécessite d'être régulé. La régulation de la synthèse des lipides stabilisant et déstabilisant les bicouches a été étudiée chez *Acholeplasma laidlawii*, un procaryote qui accumule du MGlcDG et du DGlcDG dans ses membranes. Les caractéristiques structurales de ces lipides sont semblables à celles du MGDG et du DGDG. Il a été montré que les enzymes responsables de la synthèse du MGlcDG et du DGlcDG sont régulées par des métabolites et des lipides contenant un groupement phosphate tels que le PG, le phosphate inorganique (Pi), le fructose 1-6 biphosphate et l'ATP (Vikström et al. 2000, Berg et al. 2001). La composition membranaire et le statut métabolique de la cellule semblent être à l'origine de la balance entre MGlcDG et DGlcDG de ce procaryote. On ne sait actuellement pas si les enzymes de synthèse des galactolipides de plantes sont régulées de manière similaire.

- *Rôle des galactolipides dans la photosynthèse*

L'abondance des galactolipides au niveau des membranes du thylacoïde suggère qu'ils joueraient un rôle important, en particulier pour la photosynthèse. La cristallisation du photosystème I (PSI) a révélé que chaque monomère formant ce complexe contient quatre molécules lipidiques, trois PG et un MGDG, et que ceux-ci forment des liaisons hydrogènes avec les sous-unités PsaA et PsaB au niveau du côté stromatal de la membrane du thylakoïde (Klukas et al 1999, Jordan et al 2001). La cristallisation du photosystème II (PSII) de la cyanobactérie *Thermosynechococcus elongatus* montre que chaque monomère est étroitement associé à six MGDG, quatre DGDG, trois SQDG et un PG, localisés autour du centre réactif ou à l'interface entre monomères (Loll et al. 2005). Le complexe collecteur de lumière II (light harvesting complex), LHCII, a lui aussi été cristallisé chez l'épinard et chez le pois (Liu et al. 2004, Standfuss et al. 2005). L'épinard possède deux molécules de DGDG situées sur les zones de contact entre monomères ; le pois possède trois molécules de DGDG localisées dans une cavité hydrophobe de la protéine. L'ensemble de ces données est résumé sur la Figure 24.

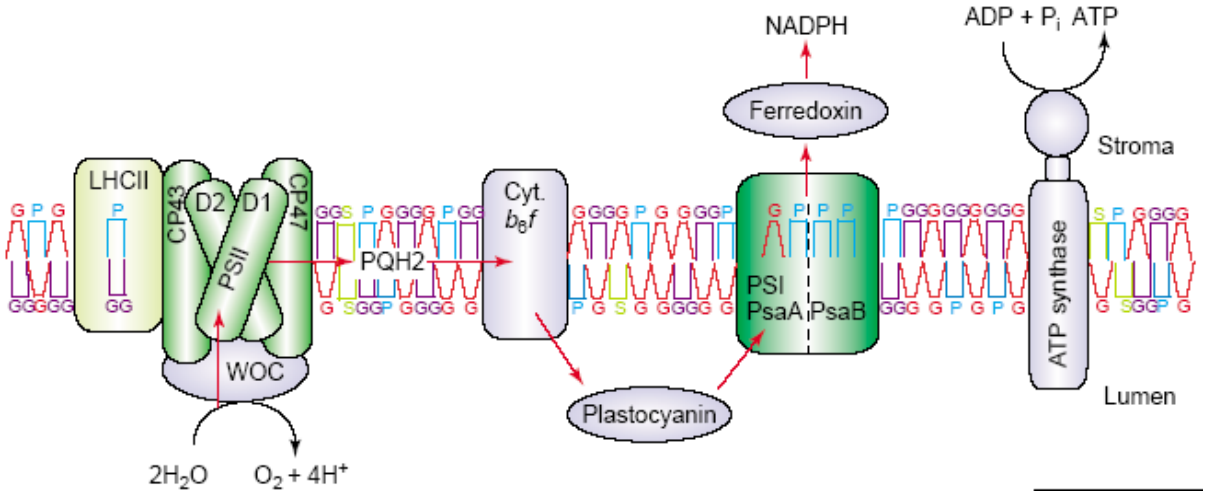


Figure 24 : Localisation des galactolipides de la membrane du thylakoïde au niveau de la chaîne de transporteurs d'électrons. Le MGDG et le PG font partie intégrante du PSI. Le DGDG et le PG sont associés avec le LHCII. G (rouge) : MGDG ; GG (violet) : DGDG ; P (bleu) : PG ; S (vert) : SQDG, PQH2: plastoquinone ; Cyt. b6f : cytochrome b6f ; WOC : water oxidizing complex. D'après Dörmann et Benning 2002.

Malgré le fait que le DGDG n'ait jamais encore été détecté en présence du PSI chez les plantes, on sait que ce galactolipide est important pour la stabilité et le bon fonctionnement des PS I et II (Härtel et al. 1997, Reifarth et al. 1997, Steffen et al. 2005, Ben-Shem et al. 2003, Guo et al. 2005, Hendricksson et al. 2006, Ivanov et al 2006). De plus, le MGDG est requis pour l'activation de la violaxanthine déepoxydase, une enzyme de synthèse de la voie

des caroténoïdes (pigments essentiels, avec la chlorophylle, pour la captation de la lumière et l'initiation de la chaîne de transporteurs d'électrons au niveau des photosystèmes I et II).

- *Rôle des galactolipides pour l'ensemble des membranes des cellules végétales : cas de la carence de phosphate*

Un tiers du phosphate lié des cellules d'*Arabidopsis* est associé aux phospholipides. En carence de phosphate, les phospholipides sont massivement hydrolysés et le DGDG semble compenser leur absence au niveau des membranes plastidiales et extra plastidiales (Li et al 2006, Härtel et al. 2000). En tant que lipide neutre et stabilisant des bicouches lipidiques, le DGDG peut remplacer la PC, la PE et le PG. L'avoine en carence de phosphate peut contenir jusqu'à 70% de DGDG dans ses membranes plasmiques (Andersson et al. 2003). Le même phénomène a été observé au niveau du tonoplaste (Andersson et al. 2005) et de la mitochondrie (Jouhet et al. 2004). Le transfert lipidique entre le chloroplaste et la mitochondrie est censé être favorisé au niveau de zones de contact entre les deux organelles (Jouhet et al 2004, pour revue Jouhet et al 2007). Le MGDG et le SQDG n'ont pas été observés en dehors du plaste. Les MGDG synthases de type B (MGD2 et MGD3) voient leur activité fortement augmenter lors de la carence en phosphate (Awai et al. 2001). Les DGDG synthases (DGD1 et DGD2) voient elles aussi une augmentation de leur activité lors de la limitation en phosphate (Kelly et al 2002).

En conclusion, les cellules végétales possèdent par rapport aux cellules animales et aux levures, des compartiments membranaires similaires (système endomembranaire et mitochondries) et des compartiments uniques (vacuole, plaste). Les plastes jouent un rôle prépondérant pour la synthèse des acyl-lipides. D'une part, ils sont le lieu de synthèse des acides gras ; d'autre part, ils sont, avec le réticulum, le lieu de synthèse des glycérolipides. Parmi les glycérolipides synthétisés par les plastes, au niveau de l'enveloppe limitante, les galactolipides jouent un rôle prépondérant, tant pour la biogenèse plastidiale que pour la composition des membranes de l'ensemble de la cellule.

IV. *Particularités de la synthèse, de la compartimentation et de la dynamique des lipides chez le parasite apicomplexe* Toxoplasma gondii

A. Compartimentation membranaire des cellules de T. gondii

Toxoplasma gondii est un protiste du phylum Apicomplexa. Ce phylum inclut de nombreux pathogènes d'importance médicale ou vétérinaire, parmi lesquels *Plasmodium falciparum*, responsable de la malaria chez l'humain et *Cryptosporidium parvum,* responsable de la cryptosporidiose chez l'homme. Ces eucaryotes unicellulaires sont des parasites intracellulaires. La plupart des Apicomplexes ont une gamme restreinte d'hôtes mais *T. gondii*

est virtuellement capable d'envahir tous les types de cellules nucléees de l'ensemble des Vertébrés à sang chaud. *T. gondii* est un parasite intracellulaire strict ; il ne peut se multiplier hors d'une cellule hôte. Après avoir envahi la cellule hôte de manière active, il se multiplie au sein d'un compartiment non fusogénique appelé la vacuole parasitophore (VP), qui joue un rôle de protection du parasite et de surface d'échange entre celui-ci et son hôte. *T. gondii* prolifère à l'intérieur de cette VP jusqu'à encombrement et lyse de la cellule hôte, laquelle est suivie par un cycle de ré-invasion/prolifération.

Comme l'ensemble des Apicomplexes, *T. gondii* est une cellule eucaryote fortement polarisée (Figure 25). Le tachyzoïte, forme parasitaire issue de la phase de division asexuée rapide chez l'hôte intermédiaire, a la forme d'un croissant mesurant environ 6 µm de long pour 2 µm de large. Le tachyzoïte est délimité par un système membranaire plus complexe que celui délimitant la plupart des cellules eucaryotes :

- comme toute cellule eucaryote, *T. gondii* possède les compartiments classiques du système endomembranaire : un réticulum endoplasmique (ER) périnucléaire (Hager et al. 1999), un appareil de Golgi réticulé (Coppens et al. 1999, Pelletier et al. 2002) et une membrane plasmique ;

- sous la membrane plasmique, un système de saccules applatis forme le complexe membranaire interne (IMC). L'ensemble membrane plasmique-IMC constitue une structure appelée pellicule. Cette pellicule contient la machinerie locomotrice de *T. gondii*. L'IMC est connecté au système endomembranaire ;

- *T. gondii* contient aussi trois types d'organites de sécrétion spécifiques de ce phylum : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses, tous nécessaires lors des étapes d'invasion et de mise en place de la VP ;

- *T. gondii* possède deux organites semi-autonomes : une mitochondrie unique dont le rôle n'est pas encore entièrement compris (Köhler et 2006) et un choroplaste vestigial non photosynthétique, l'apicoplaste. Cet organite d'origine végétale et délimité par quatre membranes, a été acquis au cours de l'évolution du parasite. Il a été démontré comme étant essentiel à la survie du parasite.

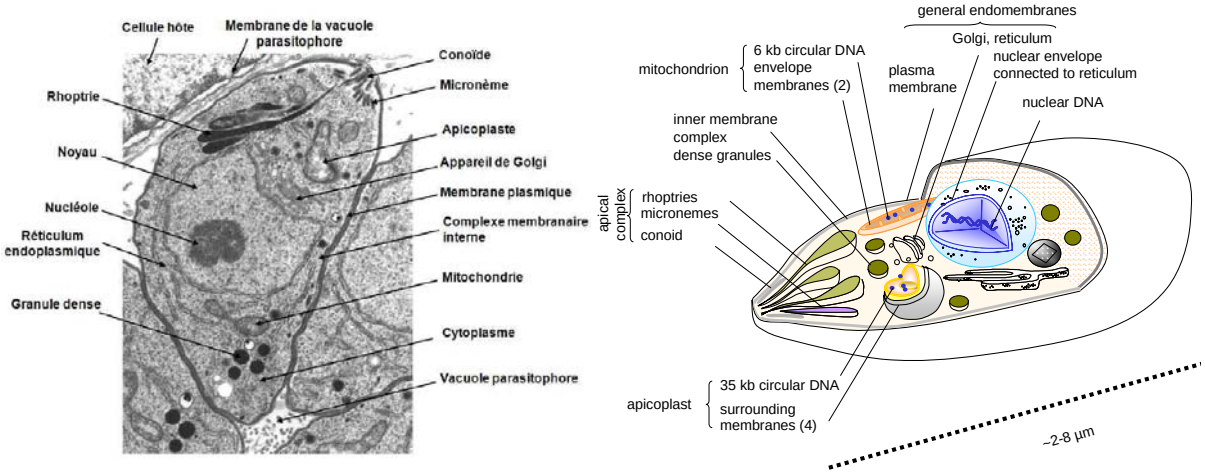


Figure 25 : Caractéristiques communes des parasites unicellulaires Apicomplexes. Comme tous les zoïtes de parasites Apicomplexes, le tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* est une cellule fortement polarisée. Dans la zone apicale, trois organites sécrétoires, les rhoptries, micronèmes et granules denses, participent à l'invasion et à l'élaboration de la vacuole parsitophore. Comme dans les cellules végétales, en plus du noyau et de la mitochondrie, un chloroplaste vestigial ou apicoplaste contient de l'ADN. L'ensemble rappelle la structure de certaines algues contenant une mitochondrie digitée unique et un seul chloroplaste. De plus, l'apicoplaste est entouré d'un système membranaire additionnel de nature endosomale. *Cliché d'un tachyzoïte intracellulaire par microscopie électronique à transmission par J.F. Dubremetz.*

Nous décrirons brièvement dans un premier temps, le rôle des différents compartiments membranaires. Nous nous concentrerons ensuite sur la manière dont *T. gondii* gère ses besoins lipidiques en tant que cellule parasitaire. En effet, *T. gondii* possède certaines voies métaboliques telles que les systèmes FASI et II qui lui permettent la néosynthèse des lipides mais on sait aussi qu'il est capable de dérober de nombreux lipides de la cellule hôte. Un des aspects de la relation parasitaire réside donc dans cet équilibre entre synthèses *de novo* et détournement de précurseurs provenant de l'hôte parasité. Nous ferons enfin l'inventaire de l'ensemble des voies métaboliques mises en évidence au niveau de la synthèse lipidique chez *T. gondii*.

1. Le système endomembranaire

T. gondii possède un système endomembranaire, souvent assimilé à un système de sécrétion vésiculaire, permettant l'adressage de protéines (avec ou sans modification) vers l'ensemble des organites de la cellule. Cette voie emprunte classiquement trois grands compartiments membranaires : l'enveloppe nucléaire, le réticulum endoplasmique, et l'appareil de Golgi.

Le réticulum, qui est aussi le site de synthèse de nombreux lipides (voir synthèses lipidiques de la cellule parasitaire, paragraphe III-C), est en continuité avec l'enveloppe nucléaire et il se situe dans la partie postérieure de la cellule Apicomplexe (Figure 25). Le flux membranaire vers le Golgi (Coppens et al. 1999, Pelletier et al. 2002) (qui se situe invariablement au dessus de la partie apicale du noyau) est réalisé par l'intermédiaire de vésicules recouvertes des protéines COP I et II pour les voies rétrogrades et antérogrades, respectivement, de la même manière que chez l'ensemble des eucaryotes (Hager et al. 1999). Le Golgi est constitué de 3 à 5 citernes et il assure le tri des protéines vers leur destination. La composition membranaire de l'enveloppe nucléaire, du RE et du Golgi est inconnue à ce jour. La compostion lipidique des vésicules lors du trafic dans le système endomembranaire est complètement inconnue à ce jour.

Connectés au système endomembranaire « classique », *T. gondii* possède des compartiments membranaires spécialisés impliqués dans la relation hôte parasite. Ces systèmes spécifiques aux Apicomplexes sont décrits dans les paragraphes ci-dessous.

2. Le complexe apical

La partie apicale de la cellule de *T. gondii* est spécialisée dans les fonctions d'invasion. De nombreuses structures y sont rattachées : le conoïde, les micronèmes, les rhoptries mais aussi les microtubules sub-pelliculaires et le complexe membranaire interne (dont nous détaillerons les fonctions avec la membrane plasmique).

- ***Le conoïde***

Le conoïde est localisé à la pointe apicale du parasite. Le conoïde a la forme d'un cylindre légèrement conique. Il est constitué de filaments de tubuline polymérisée. Les filaments de 26 à 30 nm de long sont enroulés en spirale (Figure 26A et B) (Hu et al., 2002). Il est limité à l'avant par deux anneaux préconoïdaux et à l'arrière, par deux anneaux polaires, denses aux électrons, qui l'entourent (Figure 26A et B). Il constitue le centre organisateur des 22 microtubules subpelliculaires qui s'étendent le long de la face cytoplasmique de l'IMC (voir plus loin, le paragraphe relatif aux microtubules sub-pelliculaire). En effet, cette zone contient des protéines homologues du complexe gamma-ring, à l'origine de la nucléation de la tubuline (Hu et al 2006). D'après les données structurales, il semblerait que ces anneaux polaires soient au contact de l'IMC. Ils pourraient donc être en partie constitués de matériel membranaire de l'IMC. Le conoïde comporte également deux microtubules centraux étroitement liés l'un à l'autre dont l'un des rôles serait de servir de rails de transport aux vésicules de sécrétion (Carruthers et Sibley 1997).

Cette région sert de point focal pour l'assemblage du cytosquelette des futures cellules filles (Morissette et Sibley 2002) ainsi que d'échaffaudage pour l'assemblage de leurs futures membranes (voir paragraphe IV. A. 6.) (Hu et al. 2006). Le conoïde est une structure rétractile qui effectue des mouvements de protrusion et de rétraction dans l'anneau polaire (Figure 26). L'extrusion du conoïde peut être stimulée par un flux de calcium induit par l'ionomycine (calcium ionophore) et elle peut être inhibée par un prétraitement par la cytochalasine D qui dépolymérise le cytosquelette d'actine. Lors de l'invasion, un flux de calcium déclenche la protrusion du conoïde et permet ainsi la formation à travers la membrane plasmique, d'un canal de sécrétion des protéines de micronèmes et de rhoptries. La rétraction du conoïde a lieu à la fin de l'invasion et implique les filaments d'actine (Mondragon et Frixione, 1996). L'extrusion du conoïde assurerait une poussée mécanique de la membrane plasmique de l'hôte et constituerait la première étape dans la formation de la VP.

Le conoïde et plus particulièrement lees anneaux polaires, constituent aussi, lors du processus de division (paragraphe IV. A. 6.), le point de départ de l'échaffaudage à l'origine de la mise en place de l'IMC. Ce processus intervient juste après la mise en place des conoïdes des cellules filles et met en jeu la protéine MORN1 (Hu et al 2006). Cette protéine rentrerait dans la constitution d'un anneau protéique qui coulisserait depuis le futur pôle apical jusqu'au futur pôle postérieur des cellules filles pour former l'IMC (paragraphe IV. A. 6., Figure 37).

Aucune donnée n'a été collectée sur l'assemblage des lipides lors du processus de division parasitaire mais il serait intéressant, pour comprendre les premières étapes de division du parasite, de connaître le mécanisme d'arrivée des lipides sur cet échaffaudage protéique.

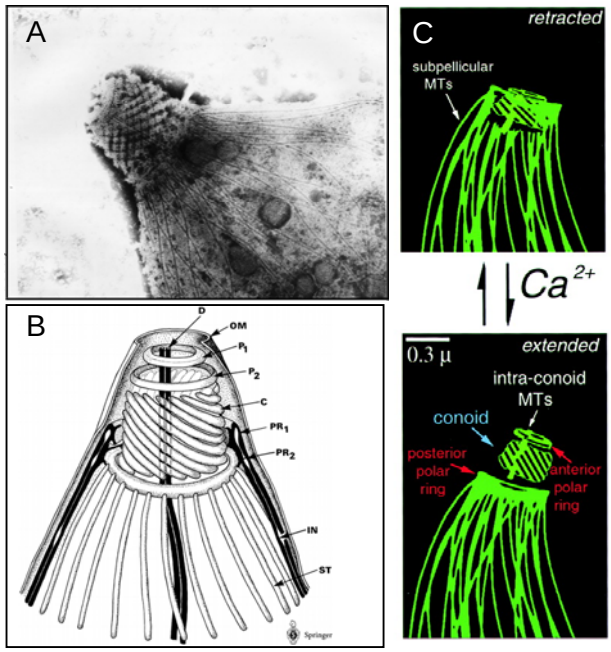


Figure 26 : le conoïde de *T. gondii*. (A) Cliché montrant la structure du conoïde par microscopie électronique à transmission.(Site internet D. Sibley). (B) Schéma de la structure du cytosquelette apical (d'après Monteiro et al.). Il est formé de haut en bas de 2 microtubules internes (D), de 2 anneaux polaires (P1 et P2,) de microtubules enroulés en spirale formant le corps du conoïde (C), des anneaux pré-conoïdaux (PR1 et PR2) dont le second est le centre organisateur des 22 microtubules subpelliculaires (ST) glissant le long de la face cytoplasmique de l'IMC (IN) accolé à la membrane plasmique (OM). (C) Mécanisme calcium dépendant de l'extrusion-protrusion du conoïde (d'après Hu et al 2002).

- ***Les micronèmes***

Les micronèmes sont de petites structures vésiculaires en forme de batonnets d'environ 250 nm de long pour 50 nm de large. Ils sont localisés dans la partie la plus apicale du parasite juste sous le conoïde (Figure 25). On peut en trouver jusqu'à 100 par cellule et ils apparaissent denses aux électrons. Les micronèmes sont des organites de sécrétion qui interviennent très précocemment dans le mécanisme de l'invasion de la cellule hôte par le parasite. Ils sont responsables de la sécrétion de protéines (TgMIC 1 à 12, TgAMA1, TgM2AP et TgSUB1, pour revue Dowse et Soldati 2004) dont la plupart sont des adhésines qui participent à l'attachement de *T. gondii* à la cellule hôte (Carruthers et al. 2000). Ces protéines sont sécrétées dès le contact du parasite avec la cellule hôte grâce à une élévation de la concentration intracellulaire en calcium (Carruthers et Sibley 1999), ce qui induit également l'extrusion du conoïde (voir paragraphe précedent). Les protéines sécrétées sont activées grâce à des protéases (Zhou et al 2005). Elles agissent de manière synergique et semblent multiplier les interactions récepteur-ligand entre le parasite et la cellule hôte. Certaines telles que TgAMA1, associées avec des protéines de rhoptries et le complexe TgMIC2-M2AP, sont indispensables à l'entrée du parasite dans la cellule hôte (pour revue Dowse et Soldati 2004).

Certaines des protéines secrétées par les micronèmes sont des protéines transmembranaires. Le complexe TgMIC2-M2AP s'ancre via le domaine trans membranaire

de MIC2 dans des zones précises et rigides de la membrane (voir plus loin, Figure 32). Cet ancrage fixe n'est pas cohérent avec la mosaïque fluide des bicouches lipidiques. Le complexe est donc probablement ancré *via* une interaction avec un domaine membranaire du type raft lipidique. Aucune étude n'a encore été réalisée dans ce domaine de l'ancrage des protéines par les lipides chez *T. gondii*. D'autre part, la composition lipidique de la membrane des micronèmes reste encore inconnue.

- ***Les rhoptries***

- *Structure*

Les rhoptries constituent le deuxième type d'organites de sécrétion du pôle apical. Elles sont plus grandes (0,25 µm de large et 1 à 4 µm de long) et moins nombreuses que les micronèmes (8 à 12 par cellule). Ces organites sont en forme de massues inversées (Figure 25) et présentent une partie allongée (le cou) qui traverse le conoïde et se termine au pôle apical ainsi qu'une partie plus large (le bulbe) situé dans la partie médiane du parasite. La forme de cet organite est toujour la même, même après sécrétion de son contenu mais on ignore le mécanisme qui permet de maintenir cette forme.

- *Biogenèse et sécrétion*

La biogenèse des rhoptries serait semblable à celle des lysosomes sécrétoires des eucaryotes qui ont pour propriété de sécréter leur contenu après stimulation via une machinerie unique (pour revue Blott et Griffiths 1992). La décharge du contenu des rhoptries est elle aussi déclenchée après stimulation mais le signal qui intervient lors de l'attachement à la cellule hôte est encore inconnu. Les rhoptries seraient donc des lysosomes modifiés, hypothèse renforcée par le fait que les rhoptries constituent le compartiment le plus acide de *T. gondii* (Ngo et al., 2004).

Chez les eucaryotes, la biogenèse des lysosomes sécrétoires est dépendante de la formation de corps multivésiculaires (MVB). Ces corps sont issus de la fusion de vésicules acides, provenant du réticulum endoplasmique, et de l'invagination de vésicules endosomales à l'intérieur de la vésicule acide en croissance (Denzer et al. 2000, Raposo et Marks 2002). Ce mécanisme permet la séquestration de vésicules, et donc de protéines membranaires, à l'intérieur même du MVB en formation. La destinée de ces protéines (internalisées ou non) dépend de leur association avec des domaines membranaires lipidiques qui permet leur ancrage à des zones bien déterminés. Les vésicules sont recouvertes de complexes adaptateurs tels que le complexe AP-1 et présentent à leur surface des protéines cargo transmembranaires qui possèdent des queues tyrosine cytoplasmiques ainsi que des signaux peptidiques d'adressage du type dileucine. Ce système de marquage permet le tri des vésicules déstinées à la fusion ou à l'invagination.

La biogenèse des rhoptries repose sur des organites précurseurs appelés pré-rhoptries. Ces larges vésicules contiennent un matériel dense et hétérogène. Elles se développent grâce à la fusion de petites vésicules provenant du Golgi. La biogenèse des protéines de rhoptries est

d'ailleurs sensible à l'action de la bréfeldine A (Soldati et al. 1998), un inhibiteur du trafic vésiculaire dans les endomembranes. Les structures membranaires internes des pré-rhoptries sont réminiscentes des structures retrouvées dans les MVB et les lysosomes sécrétoires (Coppens et Vielmeyer 2005).

Les Apicomplexes utilisent le système endosomal de protéines de surface (protéines rab similaires aux protéines COP de surface du système de transport du RE et du Golgi, Chaturvedi et al. 1999, Robibaro et al 2002, Stedman et al. 2003, Quevillon et al. 2003) et de protéines adaptatrices (ADP-1, Ngo et al. 2003) pour réguler le trafic vésiculaire à partir du trans-Golgi jusqu'aux rhoptries. De plus, l'adressage des protéines destinées aux rhoptries est médié par la reconnaissance des queues tyrosines cytoplasmiques ainsi que par les signaux dileucine. Les pré-rhoptries évoluent en organites matures après la condensation et l'élongation du pédoncule des rhoptries (Dubremetz, 2007) (Figure 27). Le transfert des pré-rhoptries vers les rhoptries semble être régulé grâce à la protéine chaperonne VPS4 (Yang et al. 2004).

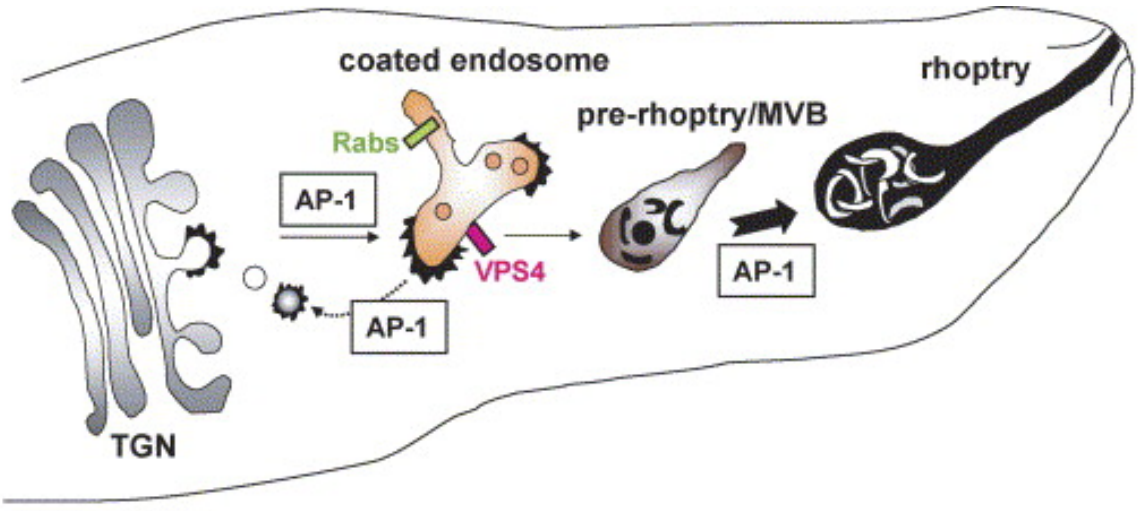


Figure 27 : Schéma de la biosynthèse des rhoptries. Après synthèse de son contenu par la voie RE/Golgi, des vésicules recouvertes de protéines AP-1 (spécifiques du transport vésiculaire lysosomal) se déplacent à partir du réseau trans-golgien (TGN) et fusionnent pour former les pré-rhoptries (qui correspondraient aux MVB). La protéine chaperonne VPS4 pourrait permettre de réguler le trafic vésiculaire et/ou permettre le transport du cholestérol vers les rhoptries matures (Coppens et Vielmeyer 2005).

- *Contenu et fonctions*

La purification des rhoptries a permis l'étude du protéome, constitué d'une trentaine de protéines (Bradley et al 2005). Il existe une ségrégation distincte entre les protéines du bulbe, *i.e.* les ROPs, et celles du cou des rhoptries, *i.e.* les RONs. Cette ségrégation est issue d'un tri latéral après leur stockage dans les pré-rhoptries (Dubremetz et al. 2007). L'ensemble de ces protéines joue un rôle durant l'invasion et notamment lors de la formation de la jonction mobile, étape qui suit l'attachement du parasite à la cellule hôte et qui précède la formation de la VP. Les protéines RONs 2/4/5 s'associent avec la protéine de micronèmes TgAMA1 lors de la sécrétion quasi-simultanée du contenu de ces deux organites (Alexander

et al. 2005, Lebrun et al. 2005). Cette association en synergie avec la machinerie de motilité actine-dépendante (Hakansson et al. 2001) permet la mise en place de la jonction mobile lors de l'invasion (Figure 28) puis de la membrane de la vacuole parasitophore. Certaines protéines ROPs sont des kinases, des phosphatases ou des protéases (Dubremetz 2007). On pense que celles-ci permettent la modification des protéines de sécrétion de *T. gondii* ou de celles de l'hôte, notamment pour créer de futures plateformes d'interaction entre l'hôte et le parasite par l'intermédiaire de la VP (comme l'ancrage des mitochondries hôtes sur la VP, pour revue Sinai 2007). Récemment, la kinase ROP16 et la phosphatase PP2C ont été montrées comme transportées dans le noyau de l'hôte (Saeij et al 2007, Bradley et al. 2007). ROP16 peut interférer avec la voie de signalisation STAT de l'hôte (Saeij et al. 2007). ROP18 est un facteur important de virulence de *T. gondii* puisque c'est une kinase qui permet de réduire la durée du cycle de réplication du parasite dans sa cellule hôte. (El Hajj et al. 2007).

Les rhoptries ont aussi un contenu riche en lipides. Les analyses préliminaires ont montré qu'elles contenaient de grandes quantités de cholestérol et de phospholipides tels que la PC et l'AP (Froussard et al. 1991). Le ratio entre cholestérol et phospholipides est proche de celui retrouvé au niveau des rafts lipidiques (1,4 dans les rhoptries ; 1,2 dans les rafts et 0,5 dans les membranes « normales », Coppens et Vielmeyer 2005). Le cholestérol pourrait servir au maintien de la forme des rhoptries car il est présent en très grande quantité dans les membranes limitantes des rhoptries (Coppens et Vielmeyer 2005). Il pourrait aussi servir au maintien des courbures vésiculaires à l'intérieur des MVB. Le cholestérol pourrait enfin participer à la formation des plateformes d'interaction sur la VP (Coppens et Vielmeyer 2005).

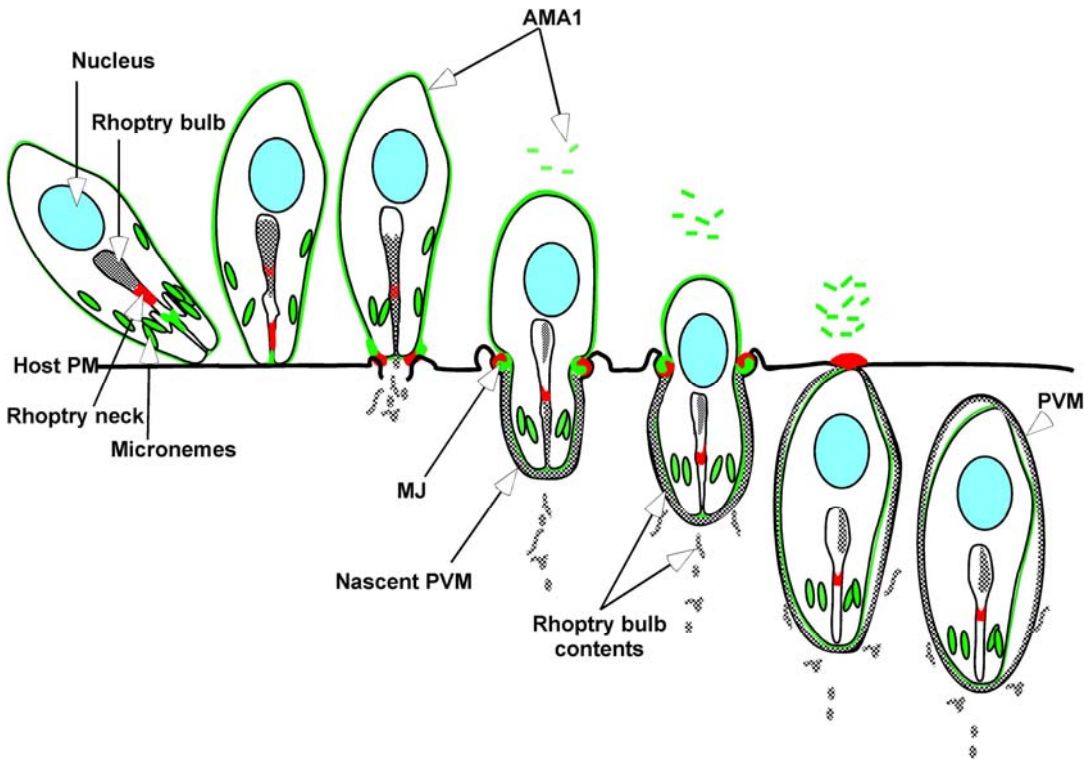


Figure 28 : L'invasion active de *T. gondii* requiert la sécrétion des protéines des micronèmes (en vert) et de rhoptries (en rouge et gris) pour la mise en place de la jonction mobile (MJ) à l'origine de la membrane de la vacuole parasitophore (MVP). Lors de la reconnaissance de la cellule hôte, le parasite décharge le contenu des micronèmes et des rhoptries. La protéine AMA1 (en vert) s'associe avec les protéines RON2/4/5 (en rouge) au niveau de points de contacts entre le parasite et la membrane plasmique de l'hôte qui constituent la jonction mobile. Cette association permet l'entrée active du parasite à l'intérieur de la cellule hôte. La protéine AMA1 est clivée et éliminée de la surface du parasite au fur et à mesure de son entrée dans la cellule hôte. Les autres protéines des rhoptries (en gris) contribuent à la formation de la MPV, tandis que d'autres sont exportées vers d'autres compartiments comme le noyau de l'hôte. (d'après Alexander et al. 2005)

3. La pellicule et les structures associées

La pellicule est un complexe membranaire qui délimite la cellule de *T. gondii*. Elle est constituée d'une unité externe, la membrane plasmique et d'une unité interne, le complexe membranaire interne (Figure 29). Les deux unités sont étroitement accolées par un mécanisme encore mal connu. Ces deux compartiments membranaires sont liés d'une part à des structures dérivées du cytosquelette, le « glideosome » qui est localisé entre la membrane plasmique et l'IMC et d'autre part, aux microtubules sub-pelliculaires localisés le long de la face cytoplasmique de l'IMC. La pellicule possède à la fois un rôle structural en tant qu'empilement de membranes délimitantes et de point d'ancrage pour le glideosome et les microtubules ainsi qu'un rôle d'interface pour les échanges métaboliques entre la cellule hôte et le parasite. La composition lipidique de ce compartimement constitue donc un des éléments essentiels permettant de comprendre son fonctionnement.

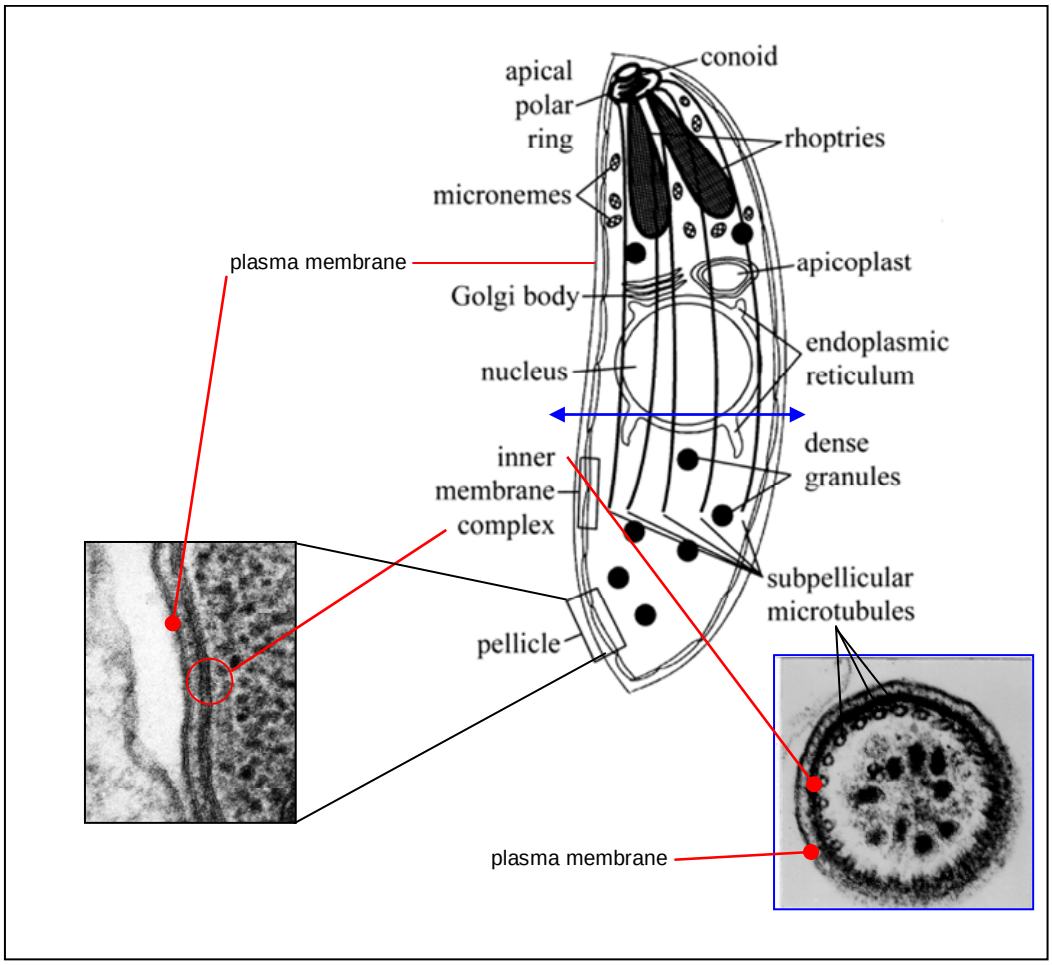


Figure 29 : La pellicule de *T. gondii* est une structure composée de trois membranes et associée aux microtubules sub-pelliculaires. L'encart de gauche est une photographie de microscopie électronique à transmission (R. Mondragon, CINEVSTAV, Mexico) qui montre la membrane plasmique et les deux membranes des vésicules applaties et suturées qui forment l'IMC. L'encart de droite correspond à la coupe transversale (vue en microscopie électronique à transmission, R. mondragon, CINEVSTAV, Mexico) symbolisée par la double flèche bleue sur le schéma de la structure du parasite (d'après Morrissette et Sibley 2002). On peut y voir des sections des microtubules sub-pelliculaires en association rapprochée avec la face cytosolique de l'IMC (membrane la plus sombre sur la photographie).

- *La membrane plasmique*

La membrane plasmique est au niveau structural, une simple bicouche lipidique. Lors de la vie extracellulaire du parasite, elle est en particulier responsable de la fixation de la cellule parasitaire sur son substrat et de l'ancrage des protéines transmembranaires du glideosome. Lors de la vie intracellulaire du parasite, elle est le site d'échange des éléments provenant ou allant vers l'espace de la VP. Bien que le fractionnement sub-cellulaire de la membrane plasmique de *T. gondii* soit possible (Lei et al. 2005), on n'en connaît pas la composition lipidique exacte. Les données relatives à ce sujet restent très fragmentaires.

La membrane plasmique possède de nombreuses protéines GPI-ancrées. C'est le cas de la protéine de surface SAG1 qui constitue l'antigène majeur de surface et qui contribue à

l'adhésion non spécifique du parasite lors de l'invasion (Mineo et Kasper 1994). On sait aussi que la membrane plasmique contient des microdomaines lipidiques resistants aux détergents, les DRMs. En effet, l'extraction de ces DRM, dont la composition lipidique et protéique sera détaillée dans la partie IV. B. 2., montre la présence des protéines GPI ancrées de surface SAG-1 et P35 (Azzouz et al. 2006). Les techniques actuelles pourraient permettre de déterminer le lipidome de la membrane plasmique, en tout cas pour les classes majoritaires de lipides.

- *Le complexe membranaire interne et le réseau sous-pelliculaire*

Le complexe membranaire interne (IMC) consiste en un réseau membranaire situé à une distance fixe, environ 15 nm sous la membrane plasmique. Il est formé par la fusion de vésicules applaties dont l'origine serait le réticulum endoplasmique (Vivier et Petitprez 1969). L'association entre la membrane plasmique et l'IMC est probablement médiée par des structures protéiques qui n'ont pas encore été identifiées à ce jour. L'IMC est interrompu au pôle apical, au niveau de l'anneau polaire externe, notamment pour permettre la protrusion du conoïde. On retrouve une deuxième zone d'interruption au pôle postérieur. A ce même niveau, on trouve l'anneau postérieur, une structure qui termine l'ensemble du réseau de cytosquelette sous-pelliculaire (actine et réseau sous pelliculaire). Enfin, une zone appelée micropore, correspondant à une invagination circulaire de la membrane plasmique, interrompt la pellicule dans la moitié apicale du parasite, juste au dessus du noyau. Cette structure se comporte comme un cystostome, c'est-à-dire une zone spécialisée dans l'endocytose (Nichols et al 1994). Une telle invagination pourrait être provoquée par la présence de lipides particuliers associés à des structures protéiques induisant une courbure membranaire.

L'IMC est un des composants membranaires majeurs de *T. gondii.* Sa composition lipidique reste inconnue. On sait cependant qu'il possède des microdomaines membranaires resistants aux détergents (DRMs) (Azzouz et al. 2006, Johnson et al. 2007). Dans la zone séparant la membrane plasmique de l'IMC, l'ancrage de la protéine GAP50, une des protéines pivot du glideosome (voir paragraphe glideosome), ne dépend pas d'interactions protéines-protéines mais est réalisé par l'intermédiaire des DRMs riches en cholestérol de l'IMC (Johnson et al. 2007).

L'IMC est associé au réseau sous-pelliculaire. Ce réseau correspond à un ensemble de protéines du cytosquelette, probablement des filaments intermédiaires (Mann et Con Beckers 2001). Il forme un motif régulier comme un grillage en deux dimensions (Morrissette et al. 1997). Les observations en cryofracture de la membrane de la face cytosolique de l'IMC montrent des rangées régulières de particules intramembranaires. Ces particules sont supposées représenter le domaine transmembranaire de protéines associées au réseau sous-pelliculaire de microtubules. Le réseau sous-pelliculaire aide à maintenir la forme crescente de la cellule, par l'intermédiaire de son interaction avec les microtubules sub-pelliculaires. Il impose également une tension mécanique à la cellule. A ce jour, trois protéines ont été décrites comme appartenant à l'IMC et associées au cytosquelette : TgIMC1, TgIMC2 (Mann

et Con Beckers 2001) et PhIL1 (Gilk et al. 2006). Il est possible d'extraire le réseau dans sa forme originelle (Figure 30) (Mann et Con Beckers 2001). L'étude des lipides associés à cette structure pourrait fournir des informations quant à la manière dont ces protéines sont ancrées dans l'IMC.

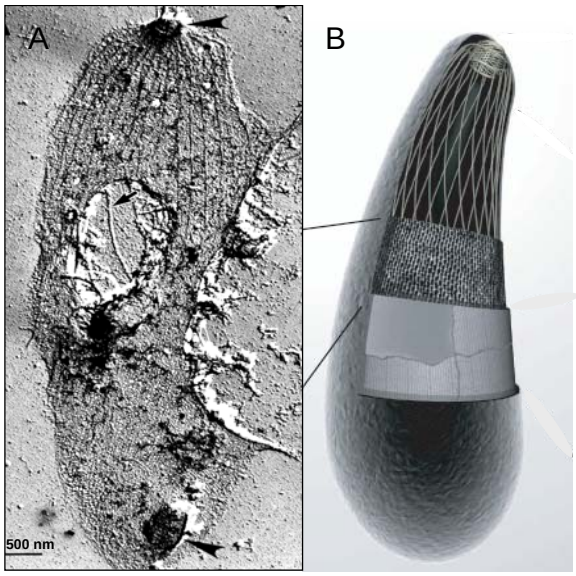


Figure 30 : Structure et localisation du réseau sous-pelliculaire. (A) Cliché du réseau sous-pelliculaire purifié (MES, R. Mondragon, CINEVSTAV, Mexico). Les anneaux antérieurs et postérieurs (pointes de flèches) ferment ce réseau au niveau du pôle apical et postérieur, respectivement. Le réseau de microtubules sub-pelliculaires (flèche) est intact et encore lié au réseau sous-pelliculaire. (B) Schéma de la structure de la pellicule et des microtubules sub-pelliculaires qui lui sont associés. Le réseau sous-pelliculaire, probablement formé de filaments intermédiaires, se situe entre l'IMC et les microtubules sub-pelliculaires. La membrane plasmique délimite la périphérie du parasite.

Enfin, l'IMC est le compartiment qui sert d'échaffaudage pour la mise en place des futures cellules filles lors de la division cellulaire (voir endodyogénie, B-6). Il est donc essentiel à la ségrégation des organites dans les cellules filles.

- *Les microtubules sub-pelliculaires*

T. gondii possède deux populations de microtubules : les microtubules du fuseau mitotique qui permettent la séparation du matériel génétique du noyau lors de la division cellulaire et les microtubules sub-pelliculaires (Figure 31). Ces derniers, au nombre de 22, s'étendent depuis l'anneau polaire externe du conoïde jusque sous le noyau. Cet anneau polaire constitue d'ailleurs le centre organisateur de ces microtubules. En effet, l'analyse du protéome du conoïde (Hu et al. 2006) a montré la présence de gamma-tubuline, à l'origine de l'anneau gamma, structure de base des centres organisateurs (MTOC). Ces microtubules sont responsables de la forme en croissant de la cellule parasitaire grâce à la tension qu'ils imposent sur la face cytosolique de la pellicule. Leur association avec cette partie de l'IMC est réalisée par l'intermédiaire d'un réseau sous-pelliculaire. Ce réseau de microtubules est sensible uniquement aux inhibiteurs de polymérisation des microtubules de type végétaux, les dinitroanilines (Stokkermans et al 1996). On retrouve cette structure architecturale chez certaines algues du type euglenoïde (Mann et Beckers 2001).

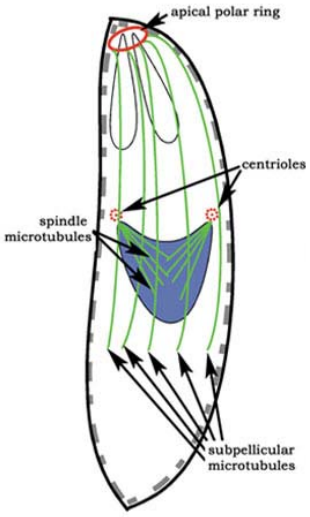


Figure 31 : Les deux populations de microtubules chez *T. gondii*. Les microtubules du fuseau mitotique ont pour centre organisateur la plaque polaire, qui est « incluse » dans l'enveloppe nucléaire à proximité des centrosomes (les microtubules sub-pelliculaires s'étendent depuis l'anneau polaire apical, (leur centre organisateur) jusqu'au 2/3 du parasite. D'après Morrissette et Sibley, 2002.

- *Le glideosome*

La pellicule abrite une structure responsable des mouvements du parasite pendant sa recherche de la cellule hôte (gliding) (Figure 32B) et lors de l'invasion. Cette structure appelée « glideosome » se trouve entre la membrane plasmique et l'IMC. Elle est actine-dépendante et utilise la myosine de classe XIV comme moteur moléculaire (Foth et al. 2006). Le glideosome est ancré par la protéine GAP50 au niveau de l'IMC et par le complexe MIC2-M2AP (protéines de micronèmes) dans la membrane plasmique. Lors de l'invasion de la cellule hôte et la formation de la jonction mobile, le complexe MIC2-M2AP serait associé à la protéine AMA1 (protéine de micronèmes) (Figure 32A). Les protéines transmembranaires MIC2, AMA1, GAP50 sont importantes en tant que points de pivot du complexe de motilité chez *T. gondii*. Elles doivent donc avoir une position précise et fixe. Ce type d'immobilisation n'est possible que par une interaction protéine-protéine ou par un ancrage *via* des microdomaines de la membrane. Les nombreuses études menées sur ces protéines ne mettent pas en évidence d'autres interactions qu'avec celles du glideosome lui-même. On peut donc supposer que la position de ces protéines dans leurs membranes respectives est stabilisée grâce aux microdomaines membranaires. C'est d'ailleurs ce qui semble être le cas pour la protéine GAP50 localisée dans les DRMs riches en cholestérol (Johnson et al 2007). La composition précise de ces DRMs est encore à déterminer.

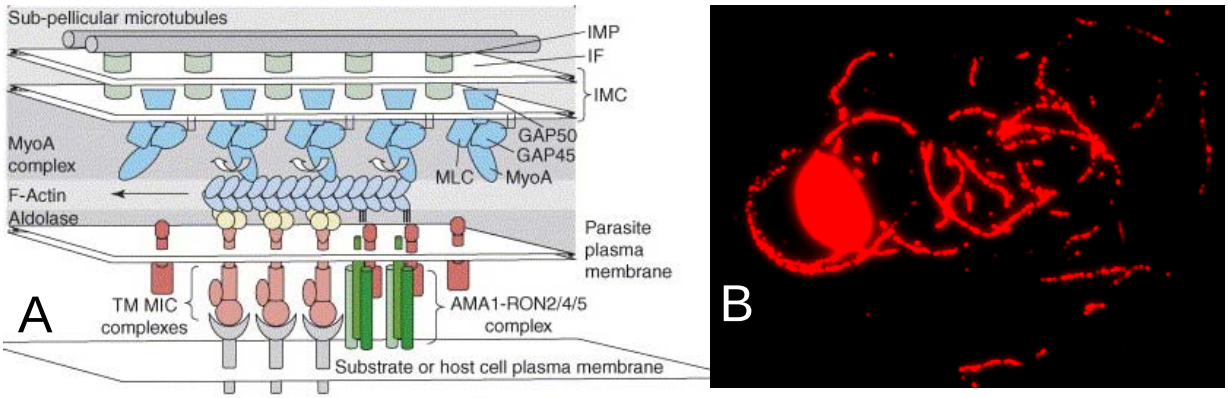


Figure 32 : Le glideosome est responsable des mouvements de gliding et de l'invasion active de *T. gondii*. (A) Modèle du glideosome lors de l'invasion active (d'après Carruthers et Boothroyd 2005). La myosine (MyoA) entraine les protéines de micronèmes (TM MIC = MIC2/M2AP) vers la partie postérieure du parasite ce qui permet au parasite de se propulser à l'intérieur de la cellule hôte. Le complexe AMA1-RON2/4/5 s'associerait au complexe TM MIC au niveau de la jonction mobile (AMA1-RON2/4/5 est absent lors du gliding simple). (B) Mouvements de gliding de *T. gondii* visualisées par immunofluorescence grâce à un anticorps anti-SAG1 sur une lame de verre (C. Botté, ce travail). Le parasite encore présent est visible au niveau du point le plus lumineux sur la lame.

4. La vacuole parasitophore et sa membrane

La membrane de la vacuole parasitophore (MVP) constitue l'interface d'échange entre le parasite intracellulaire et le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 33). Elle est constituée d'une part de la membrane cytoplasmique invaginée lors de l'invasion et de matériel issu du parasite lors de la sécrétion des rhoptries puis des granules denses. On connaît peu de choses sur son fonctionnement car il n'est actuellement pas possible de purifier la VP mature à partir d'une cellule infectée. Il en est de même de sa composition ainsi que de l'origine de ses composants lipidiques. On sait tout de même que la mise en place de cette VP est à l'origine de nombreux changements comme le recrutement des mitochondies et du réticulum endoplasmique ou encore le bouleversement du cytosquelette de l'hôte.

Toxoplasma se divise toutes les 6 à 9 heures jusqu'à l'obtention exponentielle de 64 à 256 parasites dans une seule VP. La VP est donc un compartiment dynamique, qui comprend de nombreuses structures membranaires : la MVP, les HOST et le RNM. Les HOST (host organelles sequestering tubulo-structures) sont des invaginations de la MVP qui permettraient de séquestrer les vésicules d'endocytose de l'hôte. Elles seraient issues de l'association de certaines protéines des granules denses (GRA7) avec la membrane de la VP (Coppens et al. 2006). Le RNM (réseau de nanotubes membranaires) consiste en un ensemble de structures membranaires tubulaires (Magno et al. 2005) dont une partie des protéines sont issues des granules denses et dont la nature lipidique reste totalement inconnue (Mercier et al. 2005). Le RNM constitue une structure qui remplit une partie de l'espace de la VP.Il serait impliqué dans les échanges trophiques avec la cellule hôte (Coppens et al. 2006, Mercier et al. 2007) et jouerait un rôle structural pour maintenir l'organisation des parasites dans la VP (Muniz et al. soumis, Travier et al. 2007).

Toxoplasma récupère de nombreux types de lipides depuis la membrane plasmique, les corps lipidiques, le Golgi et les endo-lysosomes de l'hôte. Il détourne des phospholipides et des lipides neutres comme le cholestérol ou le ganglioside GM1 (Coppens et al. 2006 ; Nishikawa *et al*., 2005 ; Charron and Sibley, 2002 ; Martin *et al*., 2007). Plus particulièrement, le cholestérol serait récupéré depuis la voie des LDL (low-density lipoprotein) (Coppens et al. 2000) *via* les HOST (Coppens *et al*., 2006). Les autres lipides sont directement incorporés dans la MVP lors de l'invasion (Coppens and Joiner, 2003 ; Charron and Sibley, 2004).

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

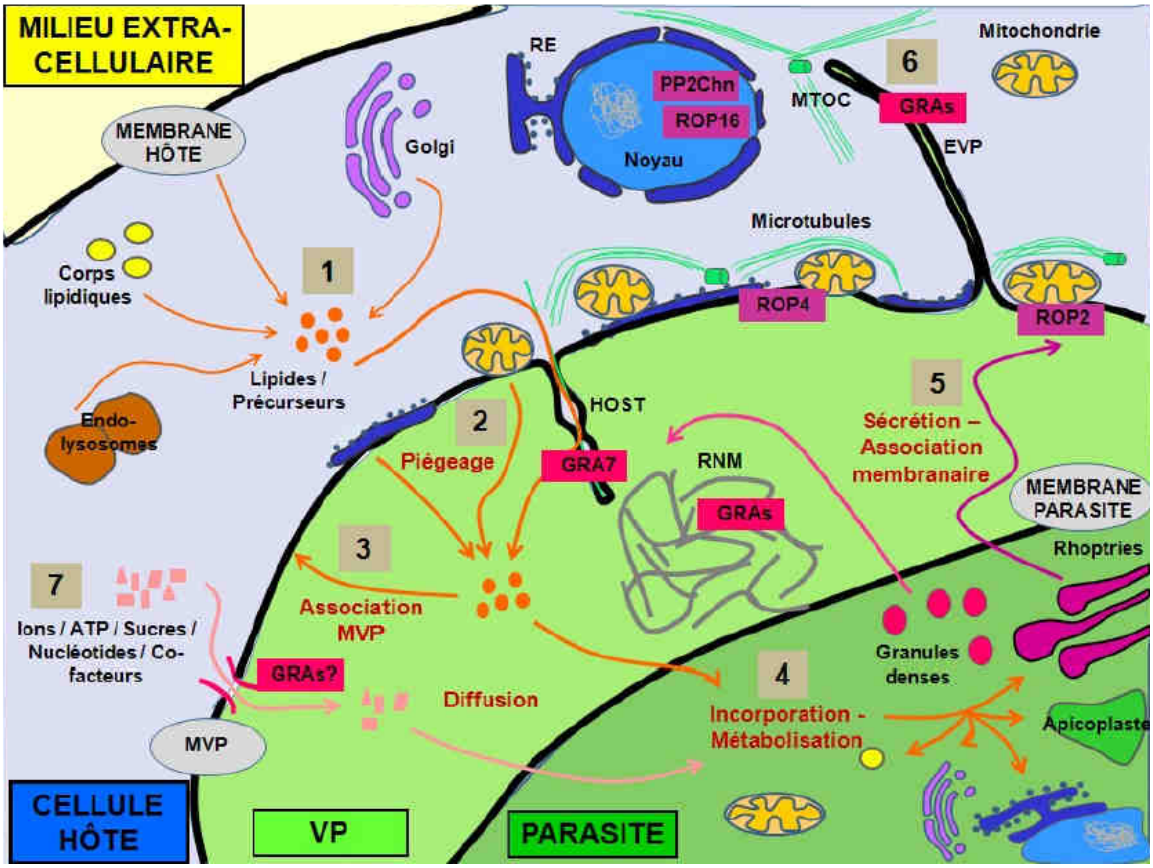


Figure 33 : La MVP, interface d'échange entre le parasite et la cellule hôte. (1) Le parasite récupère de nombreux lipides et précurseurs lipidiques depuis la membrane plasmique, les corps lipidiques, les endolysosomes et le Golgi de l'hôte. Ce piégeage est notamment possible grâce aux HOST et à la protéine de granules denses GRA7 associée aux HOST. (2) Les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE) cellulaires recrutés contre la MVP, *via* ROP2 pour les mitochondries, pourraient aussi constituer des sources de lipides. (3) Certains de ces lipides sont directement incorporés dans la MVP lors de la formation de la VP. (4) Lipides et précurseurs lipidiques récupérés depuis la cellule hôte sont métabolisés dans le parasite et ciblés vers les corps lipidiques, le réticulum endoplasmique/Golgi et les rhoptries. (5) Les lipides et protéines des rhoptries sont sécrétés dans la VP et s'associent à la MVP dont ils modifient la composition. (6) Certaines protéines de rhoptries sont détectées au delà de la MVP, dans le noyau de la cellule hôte. Elles pourraient y être ciblées *via* les EVP qui semblent aussi être impliquées dans le recrutement des MTOC de l'hôte contre la VP. (7) Le parasite bénéficie aussi de petits solutés dont le poids moléculaire inférieur à 1300 Da les laisse librement diffuser au niveau de pores dans la MVP. Ces pores pourraient être constitués de protéines de granules denses (GRAs). D'après Travier, 2007

5. Les organites semi autonomes

- ***La mitochondrie***

T. gondii possède une mitochondrie unique dont la structure est tubulaire. Mise à part cette forme allongée, la mitochondrie est structuralement semblable aux autres mitochondries, à savoir qu'elle possède une enveloppe mitochondriale constituée de deux membranes. Chez *T. gondii*, la mitochondrie semble avoir été acquise par endosymbiose simple, à l'instar des autres eucaryotes. L'import des protéines mitochondriales codées par le noyau se fait par les complexes protéiques TOM (Translocon of the Outer Membrane) et TIM (Translocon of the

Inner Membrane) permettant le passage de la membrane externe et interne, après reconnaissance d'un peptide d'adressage, clivé après import. Les apicomplexes sont connus pour posséder le génome mitonchondrial le plus réduit des organismes eucaryotes : sa taille est d'environ 6-7 kb (Gray 2003 ; [ToxoDB]). Il semblerait que de manière similaire à d'autres Apicomplexes, la mitochondrie de *T. gondii* ne code que pour trois gènes. La division de la mitochondrie est intimement liée à celle de l'apicoplaste (voir apicoplaste).

La mitochondrie est responsable de fonctions classiques de la cellule eucaryote comme la respiration (*via* la chaîne de transporteurs d'électrons), la phosphorylation oxydative ou encore la synthèse des hèmes. Les enzymes responsables du cycle de Krebs sont présentes dans le génome de *T. gondii* mais leur localisation et leur fonctionnement restent à découvrir. Il a été proposé que la mitochondrie pourrait abriter la voie métabolique de synthèse des acides gras de type I, la FASI (Coppens 2006). Cependant, au vu de la taille massive du complexe protéique FASI chez *T. gondii* (>10.000 kDa), et ce malgré une localisation proche ou interne à la mitochondrie, il semble peu vraisemblable que la mitochondrie puisse contenir une telle structure. Alternativement, le complexe FAS I pourrait être localisé au niveau d'invaginations des membranes de la mitochondrie englobant une portion du cytosol que l'on retrouve toujours à proximité du réticulum endoplasmique et du Golgi : l'OMC (ovoïd mitonchondrial cytoplasmic complex) (Köhler 2006). *T. gondii* est capable d'effectuer la synthèse du PG et du DPG et la mitochondrie possède les enzymes nécessaires à leur synthèse. Elle semble aussi posséder une des acyltransférases pemettant la synthèse de l'AP : l'ACT2 (Bisanz et al. 2006).

- ***L'apicoplaste***

Une des caractéristiques des Apicomplexes, à l'exception notable des cryptosporidies, est l'existence d'un plaste vestigial non photosynthétique, l'apicoplaste. Cet organite qui possède un génome circulaire de 35 kb, a été initialement décrit par ses caractéristiques morphologiques, à savoir la présence de quatre membranes délimitantes (pour revue Siddall 1992). Dans la fin des années 1990, deux groupes ont finalement donné la preuve de l'origine végétale de l'apicoplaste par hybridation *in situ* de sondes ARN et ADN et analyses de phylogénie moléculaire (McFadden et al. 1996, Köhler et al. 1997). Des études de mutants de division montrent que l'apicoplaste est indispensable à la survie du parasite, (Fischera et Roos 1997, He et al. 2001) et qu'il remplit de ce fait, des fonctions essentielles, en particulier pour la synthèse de lipides.

- *Origine de l'apicoplaste*

L'apicoplaste est issu de l'endosymbiose secondaire d'une algue, probablement de la lignée rouge (Figure 34) (pour revue Waller et McFadden 2005). L'endosymbiose primaire a donné naissance aux deux membranes plastidiales des plantes supérieures, des algues vertes, des algues bleues et des algues rouges (voir paragraphe III. B.). L'endosymbiose secondaire a pour conséquence, la formation et la conservation de membranes supplémentaires : les plastes complexes issus de ce type d'évolution possèdent donc trois ou quatre membranes. La

membrane la plus externe serait rémanente de la membrane du phagosome et donc issue du système endomembranaire. La membrane sous-jacente, aussi appelée membrane périplasmique (PPM), correspondrait à la membrane plasmique de l'endosymbionte secondaire (Cavalier-Smith 2003), elle aussi issue du système endomembraire.

Ce type de plaste secondaire aux membranes sur-numéraires, est retrouvé entre autres parmi les Dinoflagellés, très proches des Apicomplexa du point de vue de l'evolution (Zhang et al. 2000), les cryptomonades, les euglénoïdes et les chloroarachniophytes, tous deux possédant des plastes secondaires issus de la lignée verte. Les cryptomonades, dont le plaste est issu de la lignée rouge, et les chloroarachniophytes possèdent un noyau rémanant de l'endosymbionte secondaire : le nucléomorphe, coincé entre la deuxième et la troisième membrane du plaste secondaire. Cette singularité, non présente chez les Apicomplexa, a permis se soutenir l'hypothèse de l'endosymbiose secondaire comme origine de l'apicoplaste (Cavalier-Smith 2003, Archibald et Keeling 2002). La Figure 34 résume le modèle évolutif à l'origine des plastes secondaires traités dans ce paragraphe.

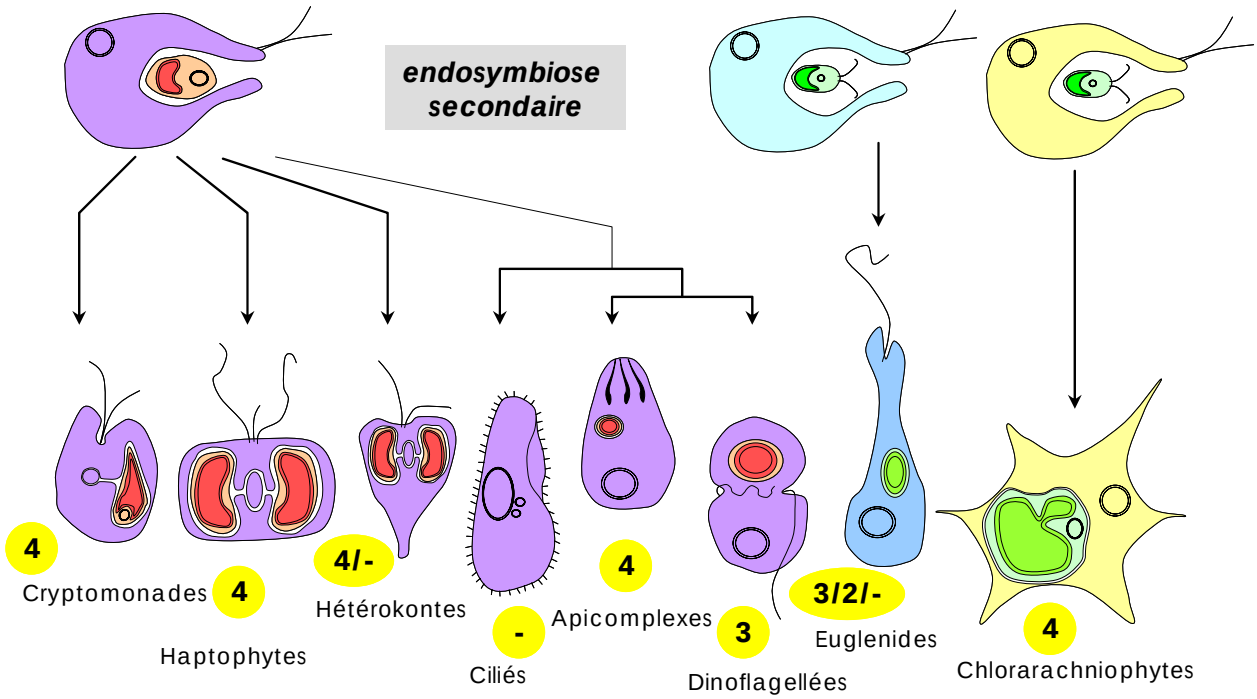


Figure 34 : Origine de grands phylums de protistes suivant l'hypothèse d'endosymbioses secondaires. (d'après Archiblad et Keeling, 2002).

- *Localisation et import des protéines de l'apicoplaste*

Le génome circulaire de l'apicoplaste constitue le plus petit ADN plastidial connu, car il ne code que pour une trentaine de protéines (Köhler et al. 1996, Wilson et al. 1996). La grande majorité des gènes des protéines plastidiales ont donc été transférées dans le génome nucléaire au cours de l'évolution de l'apicoplaste. Chez *Plasmodium*, les prédictions bioinformatiques, basées sur les séquences d'adressage à l'apicoplaste, ont montré qu'il existe 545 protéines putativement localisées dans l'apicoplaste et codées dans le noyau. Les gènes d'origine plastidiale représenteraient donc environ 10 % du génome (Ralph et al. 2004). L'ensemble de ces protéines dont 70% ont un rôle inconnu, est importé vers l'apicoplaste (Foth et al. 2003).

Les plastes primaires voient leurs protéines importées grâce à la présence d'un transit peptide localisé en général, en position N-terminale. Du fait de la dualité ontogénique des membranes de l'apicoplaste, le parasite requiert une séquence d'adressage supplémentaire afin qu'elles puissent traverser les membranes supplémentaires, issues du système endomembranaire. La séquence peptidique requise est un peptide signal, comme pour les protéines destinées à la voie de sécrétion. Le peptide signal et le transit peptide associés forment la séquence bipartite nécessaire et suffisante à l'import des protéines vers l'apicoplaste. La suppression du transit peptide empêche l'import vers l'apicoplaste et dirige les protéines vers la voie de sécrétion ; la suppression de peptide signal empêche l'entrée des protéines dans l'apicoplaste ; celles-ci restent alors cytosoliques (DeRocher et al. 2000, Harb et al. 2004, Waller et al. 2000).

Plusieurs modèles ont été proposés concernant le trafic des protéines depuis le RE jusqu'à l'apicoplaste. Le premier proposait un transfert depuis le Golgi (voire le trans Golgi), mécanisme le plus répandu chez les protéines adressées vers d'autres systèmes membranaires post- voie de sécrétion. Ce modèle a récemment montré ses limites. En effet, ni la Bréfeldine A, un inhibiteur du transport vésiculaire entre le RE et le Golgi, ni un abaissement de température (lui aussi connu pour inhiber le trafic golgien) n'ont empêché l'adressage des protéines jusqu'à l'apicoplaste (DeRocher et al 2005). De plus, des constructions protéiques contenant une séquence bipartite avec un transit peptide de l'apicoplaste et une séquence de rétention dans le RE, sont tout de même dirigées vers l'apicoplaste (DeRocher et al. 2005, Tonkin et al. 2006). Il semblerait donc que l'import des protéines de l'apicoplaste ne transite pas par l'appareil de Golgi.

Deux autres possibilités sont envisageables (Figure 35) :

(i) la présence de l'apicoplaste à l'intérieur même du RE, la membrane externe de l'apicoplaste correspondrait alors à celle du RE (Figure 35B);

(ii) l'apicoplaste serait un branchement latéral et terminal d'un système endomembranaire possédant un transport vésiculaire spécifique (Figure 35A).

Le premier modèle est toujours possible car plus parcimonieux. Les observations de l'apicoplaste faites en microsopie électronique et de fluorescence montrent une association physique intime entre l'apicoplaste et le RE (Tonkin et al. 2006) mais aucun contact physique réel n'a encore été décrit et aucun ribosome n'est visible sur la membrane externe de l'apicoplaste, l'excluant ainsi du RE granulaire. De plus, Karnataki et al. (2007) ont récemment décrit la présence d'une protéine membranaire de l'apicoplaste incluse dans des vésicules autour de l'apicoplaste chez *T. gondii*. Cette découverte renforce le modèle d'un apicoplaste hors du RE. Le second modèle nécessiterait la présence d'un récepteur du RE encore inconnu qui reconnaitrait les ~500 protéines de l'apicoplaste parmi l'ensemble des protéines empruntant cette voie et autorisant leur empaquettage dans un système de vésicules spécialisées. Quel que soit le modèle, il semble que l'apicoplaste soit maintenu localisé dans la continuité du RE. Cette localisation serait-elle due aux fonctions que doit remplir l'apicoplaste au sein de la cellule parasitaire, comme l'approvisionnement en certaines classes d'acides gras ou bien de lipides ?

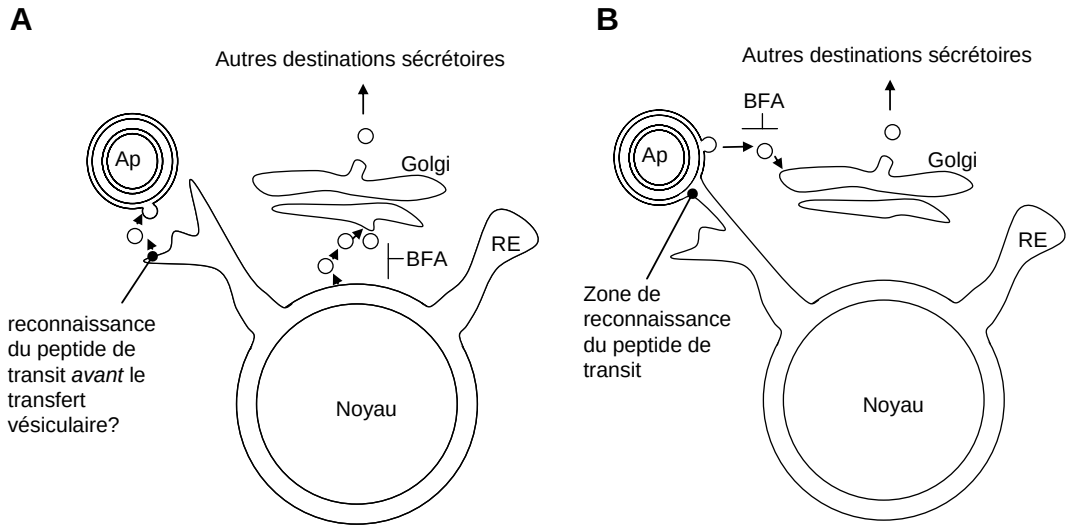


Figure 35 : Modèles de la localisation de l'apicoplaste et de l'import de ses protéines chez *T. gondii*. (A) L'apicoplaste est un branchement terminal du RE. La reconnaissance des protéines à destinée plastidiale est déterminée avant le transport vésiculaire vers l'apicoplaste. (B) L'apicoplaste est localisé dans le RE. Sa membrane externe est commune avec celle du RE. La reconnaissance des protéines est réalisée à la surface de la membrane périplasmique, seconde membrane de l'apicoplaste.

Mises à part les nombreuses études sur les séquences d'adressage requises pour l'import des protéines dans l'apicoplaste, très peu de choses sont connues sur le mécanisme d'import en lui-même. Quelque soit le modèle utilisé, l'entrée dans le réticulum se fait par reconnaissance du peptide signal *via* le complexe protéique Sec61 (Tonkin et al. 2007). Après clivage du peptide signal, les protéines doivent encore traverser trois membranes : la PPM (membrane périplasmique), la membrane externe et la membrane interne. Pour la PPM, Tonkin et al. (2007) proposent que de manière similaire aux cryptomonades (Sommer et al. 2007), il existerait un complexe, Der1, sur la PPM,. Ce complexe initialement prévu pour

renvoyer les protéines mal pliées du RE vers le cytosol, permettrait leur import vers l'intérieur de l'apicoplaste.

Chez les plantes, la traversée de l'enveloppe du plaste se fait par l'intermédiaire des complexes de translocation TOC et TIC qui reconnaissent le transit peptide. Chez les Apicomplexa, la fonction de reconnaissance du transit peptide se retrouve au niveau de la PPM. De nombreuses protéines analogues à celles participant au complexe TOC ont d'ailleurs été retrouvées sur cette membrane. Le composant central du complexe, Toc75, reste introuvable. La encore, Tonkin et al. (2007) proposent que le passage se fasse grâce à un deuxième analogue de Der1 retrouvé chez les cryptomonades (Sommer et al. 2007). Enfin, l'import à travers la membrane interne de l'apicoplaste semble réalisé par un analogue du complexe TIC, identifié dans le genome de *T. gondii* (Tonkin et al. 2007).

- *Fonctions métaboliques de l'apicoplaste*

Le rôle de l'apicoplaste a été débattu depuis sa découverte. Les premières hypothèses étaient basées sur les connaissances des plastes non photosynthétiques, à savoir la synthèse des hèmes pour la respiration mitochondriale, la synthèse des acides gras, le stockage de l'amidon ou encore la synthèse d'acides aminés aromatiques (Wilson et al. 1991, Palmer 1992, Kölher et al. 1997). On a vite découvert que l'apicoplaste est indispensable à la cellule. En effet, les antibiotiques dirigés contre la réplication, la transcription et la traduction du génome de l'apicoplaste entrainent la mort du parasite (Fishera et Roos 1997, Ralph et al. 2001). De plus, des mutants dont la ségrégation de l'apicoplaste est altérée voient les parasites dépourvus de plastes mourir (He et al. 2001). Enfin, la voie FASII est essentielle pour la survie du parasite (Bisanz et al., 2006 ; Mazumdar et al. 2006).

L'invalidation de l'apicoplaste entraine la mort du parasite après un délai, c'est-à-dire à la génération suivante. Ce phénomène qui est appelé « parasite delayed death » (la mort du parasite après délai), n'est toujours pas complètement élucidé. La solution réside dans la compréhension exacte du rôle de l'apicoplaste. Les produits fournis par l'apicoplaste sont en tous cas indispensables au bon fonctionnement de la cellule parasitaire, peut-être au niveau de la VP. L'apicoplaste pourrait aussi fournir une ressource requise lors de l'invasion de la cellule hôte. De nombreuses approches biochimiques et moléculaires ajoutées à une récente étude menée *in silico* sur les protéines adressées à l'apicoplaste (Ralph et al. 2004) ont permis de dresser une carte des fonctions métaboliques caractérisées chez l'apicoplaste (Figure 36). Les isoprénoïdes semblent être exclusivement synthétisés au niveau de l'apicoplaste par la voie du 1-déoxy-D-xylulose 5-phosphate présente chez les plantes, les algues et la plupart des eubactéries (Eisenreich et al. 2004). Ces composés sont à l'origine des résidus farnésyl et géranyl-géranyl qui peuvent être liés aux protéines de façon post-traductionnelle, ce qui leur permet d'interagir avec les membranes cellulaires. Ils ont un rôle dans la prolifération cellulaire et modifient la structure des ARNt pour une traduction correcte du génome de l'apicoplaste (Ralph et al. 2004). De plus, l'apicoplaste joue, comme le chloroplaste, un rôle essentiel dans la synthèse des acides gras grâce à la présence de la voie complète de la FASII. La synthèse des hèmes est en partie réalisée dans l'apicoplaste, l'autre partie dans la

mitochondrie, mais on ne connaît pas les voies métaboliques auxquelles ces composés participent dans l'apicoplaste.

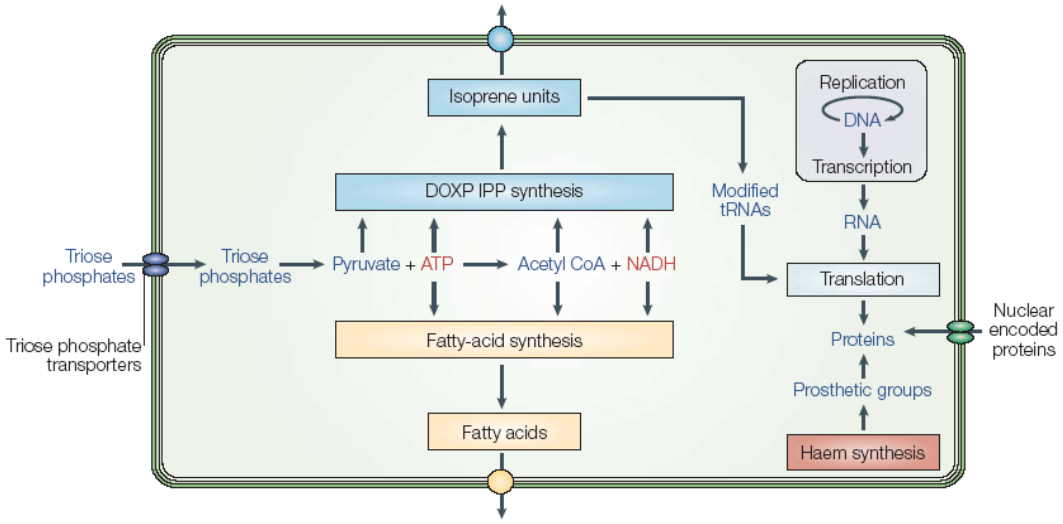


Figure 36 : Schéme des premières voies métaboliques élucidées chez l'apicoplaste (d'après Ralph et al, 2004)

L'apicoplaste est le second site de biosynthèse des groupements [Fe-S] après la mitochondrie (Ellis et al. 2001, Seeber 2002). Ceux-ci sont attachés aux protéines pour leur fournir un potentiel redox. Quatre protéines de l'apicoplaste possédent ce type de structure : 2 enzymes de synthèse des isoprénoïdes, la lipoate synthase et la ferredoxine (Ralph et al. 2004, Seeber et al. 2005). La présence de cette dernière est très surprenante car ellen'avait jusqu'alors été detectée que dans la chaîne de transporteurs d'électrons du chloroplaste des algues et des plantes. L'apicoplaste est aussi capable de la synthèse de l'acide lipoïque nécessaire à la lipoylation du complexe pyruvate deshydrogénase (PDH) (Ralph et al. 2004, Mazumdar et al. 2006).

L'apicoplaste serait aussi un lieu de synthèse de phosphoglycérolipides. Il possède en tous cas, l'ensemble des enzymes responsables de la synthèse du lyso-AP, précurseur de nombres d'entre eux (par la voie de l'AP ou voie de Kennedy ; voir paragraphe II). Des extraits totaux de *T. gondii* peuvent par ailleurs synthétiser des lipides dont les propriétés de migration sur chromatographie sur couche mince sont indiscernables de celles du MGDG et du DGDG, galactolipides caractéristiques du chloroplaste, en faisant usage des mêmes substrats que les MGDG synthases et DGDG synthases du chloroplaste, c'est-à-dire l'UDP-Gal (Maréchal et al. 2002) et le DAG dérivé d'un marquage métabolique avec de l'acétate (Bisanz et al. 2006). Bien que la composition lipidique exacte de l'apicoplaste soit encore inconnue, l'hypothèse de la présence des galactolipides dans les membranes de l'apicoplaste a donc été émise.

L'acquisition de l'apicoplaste par endosymbiose a permis l'apparition de voies métaboliques qui n'étaient pas présentes chez l'hôte de départ mais aussi de voies redondantes. Grâce aux processus « d'évolution réductrice », les gènes superflus ont pu

disparaître. De ce fait, mais aussi de par l'origine végétale et procaryotique de l'apicoplaste, celui-ci arbore de nombreuses voies métaboliques qui lui sont exclusivement spécifiques. Les protéines impliquées dans ces voies sont autant de nouvelles cibles potentielles pour des herbicides ou des antibiotiques aux propriétés anti-parasitaires.

6. Mode de vie de *T. gondii* et dynamique membranaire

• *L'invasion de T. gondii dans la cellule hôte*

Le succès intracellulaire des parasites *Apicomplexa* repose sur l'efficacité et la rapidité de leur processus d'invasion de la cellule hôte (moins de 20 secondes). Contrairement aux autres protozoaires, les *Apicomplexa* ne possèdent ni flagelle, ni cil, n'effectuent pas de mouvement amiboïde. Ils font pourtant preuve d'une très grande mobilité. Le mode de locomotion basé sur l'actine parasitaire, est différent de celui de nombreux pathogènes et il est indépendant du calcium extracellulaire. Le processus de glissement du parasite ou gliding de *Toxoplasma* n'entraîne pas de déformations du parasite, contrairement aux amibes et aux cellules de vertébrés qui émettent des lamellipodes et/ou des pseudopodes au cours de leur déplacement. Le gliding permet au toxoplasme de se rendre jusqu'à la membrane de la cellule hôte. Il pénètre alors dans la cellule hôte selon un processus différent de l'endocytose ou de la phagocytose qui sont utilisées par les virus, les bactéries ou par *Trypanosoma* (Antoine *et al*., 1998 ; Finlay et Cossart, 1997 ; Sibley et Andrews, 2000) : aidé par ses protéines de surface et par la sécrétion calcium-dépendante des protéines de micronèmes, le parasite utilise son moteur d'acto-myosine pour pénétrer dans la cellule hôte. Ce processus d'invasion active, différent de l'invasion induite par les bactéries, se déroule avec une apparente passivité de la cellule hôte : aucun renflement de la membrane, aucune réorganisation des microfilaments d'actine et aucune phosphorylation des tyrosines cellulaires ne sont en effet observés (Morisaki *et al*., 1995). L'invasion coïncide avec la formation de la VP *via* la sécrétion des protéines de rhoptries (Sibley, 2003 ; Dubremetz 2007 ;Lebrun *et al*., 2007) (Figure 28).

• *La division intracellulaire de T. gondii*

A l'intérieur de la cellule hôte, le parasite perd toute mobilité et commence à se multiplier par endodyogénie (Figure 37). Ce mode de division constitue une particularité de *Toxoplasma* puisque la grande majorité des parasites *Apicomplexa* se multiplient par schizogonie. L'endodyogénie permet la formation, à l'intérieur de chaque parasite, de deux cellules filles, à la suite d'une fission binaire après une simple réplication des chromosomes suivie d'une mitose et d'un bourgeonnement parasitaire. La division parasitaire implique un remodelage membranaire avec une intense production de lipides membranaires, une fission synchronisée des organites dupliqués comme la mitochondrie et l'apicoplaste, une duplication orchestrée des compartiments membranaires connectés au système endomembranaire. L'endodyogénie débute depuis le pôle apical. L'appareil de Golgi est le premier organite à se diviser par fission médiane. Il forme alors deux complexes au dessus du noyau (Dubey et al., 1998). La portion antérieure de l'IMC et les microtubules sub-pelliculaires apparaissent dans les cellules filles sous la forme de dômes, au dessus du noyau (Dubey et al., 1998). Ce

processus met en jeu la protéine TgMORN1 qui forme un anneau à la base du conoïde dupliqué et qui s'associe avec les microtubules subpelliculaire (Figure 37) (Gubbels et al 2006, Hu et al. 2006). Cet anneau sert d'echaffaudage pour la mise en place des membranes de l'IMC des futures cellules filles au fur et à mesure de l'allongement des microtubules et de l'IMC qui vont englober l'ensemble des organites néoformés. En fin de division, l'anneau protéique deviendra l'anneau polaire postérieur de chaque cellule fille, celui-la même qui permet la jonction des protéines du cytosquelette.

La récente découverte de cet echaffaudage protéique soulève la question de l'arrivée et de la mise en place des lipides pour l'allongement de l'IMC en interaction avec la protéine TgMORN1. Il a été suggéré que MORN permettrait les liaisons protéines-protéines ou protéines-phospholipides, notamment chez les plantes où MORN1 s'associe à la PIPK (PI-4P 5-kinase) (Ma et al. 2004) et durant la biogenèse du flagelle des spermatozoïdes (Ju et Huang 2004, Satouh et al. 2005). Gubbels et al. (2006) ont émis l'hypothèse que MORN1 pourrait jouer un rôle en tant que protéine linker entre des sous-domaines de l'IMC et le cytosquelette.

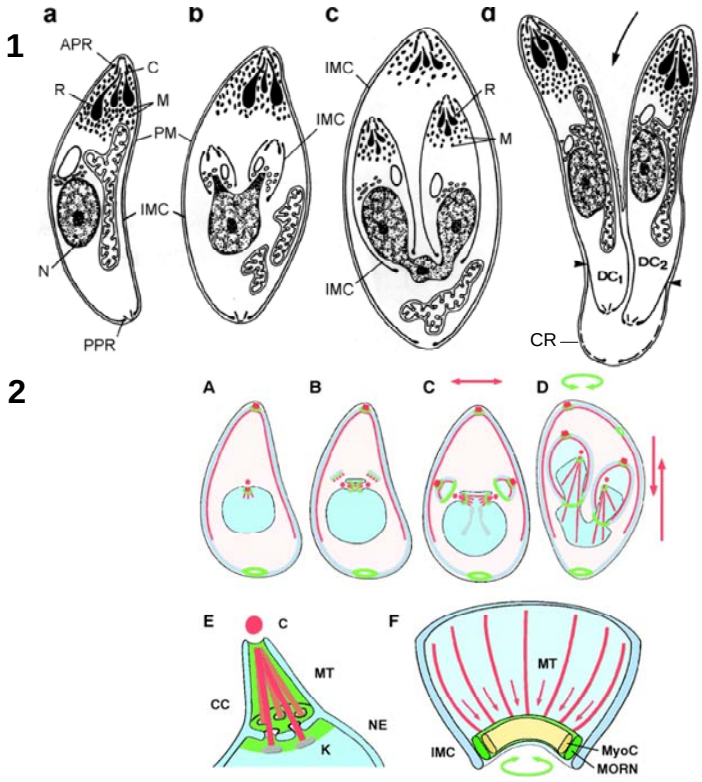


Figure 37 : Division asexuée par endodyogénie de *T. gondii.* (1) La formation d'un noyau (N) courbe s'accompagne de l'apparition sous la forme de dômes, des deux complexes membranaires internes (IMC) associés aux microtubules sous-pelliculaires des cellules filles (DC1 et DC2). Les cellules filles se développent entourées de leurs propres microtubules sous-pelliculaires et de leur propre IMC. APR, anneau polaire apical ; C, conoïde ; R, rhoptries ; M, micronèmes ; PM, membrane plasmique ; PPR, anneau polaire postérieur ; CR, corps résiduel (d'après Delbac et al. 2001). (2) TgMORN1 au cours de l'endyogénie. MORN1 est en vert, la tubuline et les centrosomes en rouge, l'IMC en bleu foncé sur le coté du parasite et le noyau en bleu clair. (A) le centrocône (structure associant centrosomes, microtubules et MORN1) persiste pendant l'interphase. (B) le centrosome se divise et permet la mise en place du fuseau mitotique. (C) La division a lieu et les anneaux apical et postérieur permettent la mise en place des cellules filles. (D) Pendant le bourgeonnement des cellules filles, les microtubules sub-pelliculaires poussent l'anneau de MORN1 vers le bas et les microtubules du fuseau

poussent le centrocone vers le haut (les mouvements des microtubules sont montrés par des flèches rouges et la constriction de MORN1 en vert). (E) Représentation schématique du centrocône, (C) centrosome, (CC) centrocône, (MT) microtubules du fuseau, (NE) enveloppe nucléaire, (K) kinetochores. (F) Modèle de structure fonctionnelle de l'anneau de MORN1 au cours de l'endodyogénie (d'après Gubbels et al. 2006).

La division de l'apicoplaste est concomittante de celle du noyau ; elle est aussi médiée par le fuseau mitotique. Les cellules filles s'accroissent jusqu'à atteindre la taille de la cellule mère. L'IMC de la cellule mère disparaît et sa membrane plasmique deviendrait celle des cellules filles. Cette hypothèse n'est étayée que par des observations mais aucune étude ne précise si la membrane plasmique des cellules filles fait également intervenir une synthèse *de novo* de lipides, ce qui est pourtant probable. La multiplication des parasites s'accompagne de la formation d'un corps résiduel issu du reste de la membrane plasmique de la cellule mère (Figure 37, 1). Ce corps résiduel relie la partie postérieure des tachyzoïtes dans la VP (Sibley, 2003).

Les souches virulentes se multiplient plus rapidement *in vitro* que les souches non virulentes (Marioka et Ohtomo, 1995) mais tous les parasites d'une même vacuole se divisent de manière synchrone. Au fur et à mesure des cycles d'endodyogénie, le volume occupé par la vacuole parasitophore s'accroît. Après six à huit cycles d'endodyogénie, 64 à 256 tachyzoïtes vont sortir de la cellule hôte et sont capables d'infecter les cellules environnantes. La perméabilité de la membrane de la VP augmente avec le développement des parasites, entraînant une hausse de la concentration calcique vacuolaire. Cette augmentation rapide et transitoire du calcium intra-vacuolaire suit une déplétion du taux de potassium de la cellule hôte qui accompagne la rupture de la membrane plasmique de l'hôte. L'augmentation du taux de calcium intravacuolaire s'accompagne d'une activation transitoire des NTPases vacuolaires et provoque l'induction de la sortie de la VP par le parasite. Juste avant la rupture de la membrane de la VP, les parasites alors immobiles s'activent, étendent leur conoïde et sont libérés de la cellule. La reprise des mouvements parasitaires semble liée aux variations de la teneur en calcium intracellulaire. Le parasite traverse d'abord la MVP *via* une jonction mobile différente de celle permettant l'entrée du parasite (jonction toujours formée des protéines RON mais dépourvue de la protéine AMA1). Le parasite traverse ensuite successivement le cytoplasme puis la membrane plasmique de la cellule-hôte, provoquant des dégâts irrémédiables au niveau de la membrane cellulaire (Sibley, 2003).

En présence d'une réponse immunitaire, les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes et s'enkystent. La modification de la structure de la VP conduit à la formation de la paroi du kyste (Weiss et Kim, 2000).

B. Etat des connaissances sur la composition lipidique des compartiments membranaires de *T. gondii*

Le maintien de *T. gondii* dans sa cellule hôte ainsi que la maintenance et la mise en place de nombreux compartiments cellulaires (noyau, RE, appareil de Golgi, mitochondrie,

apicoplaste, granules denses, rhoptries, micronèmes, membrane plasmique, pellicule, MVP) lors des divisions intracellulaires, requièrent un apport considérable de lipides. Pour répondre à ces besoins, *Toxoplasma* a recours à la synthèse *de novo* mais aussi au détournement de lipides et/ou de précurseurs lipidiques de l'hôte. Les singularités que possèdent les Apicomplexes dans les voies métaboliques de synthèse et les mécanismes de trafic de ces lipides depuis l'hôte ont récemment permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

1. Composition générale des membranes

Il n'existait au début des travaux présentés dans ce mémoire, aucune étude sur la composition lipidique précise des membranes de *T. gondii*. Les données concernant la répartition et l'existence des différentes classes lipidiques chez *Toxoplasma* sont fragmentaires, concernant un phénomène particulier tel que la présence de tel ou tel lipide pendant un processus donné. On sait par exemple que le cholestérol est présent dans les membranes de *T. gondii*, qu'il est plus abondant au niveau des rhoptries, qu'il est présent au niveau de la MVP et dans les rafts lipidiques (Coppens 2005). Ce composant lipidique est d'ailleurs l'un des mieux étudiés et on commence à percevoir certaines de ses fonctions dans la cellule parasitaire. On sait aussi que la PC représente environ 75% de la composition totale en phospholipides (Gupta et al. 2005). Viennent ensuite la PE (10%), le PI (7,5%), la PS (6%) et l'AP (1%) (Gupta et al. 2005). Le PG et le DPG, caractéristique de la mitochondrie existent chez le parasite intracellulaire et extracellulaire (Bisanz et al. 2006). Il existe aussi de nombreuses ancres GPI au sein de la membrane plasmique (Tomavo et al. 1989, Striepen et al. 1997, Zinecker et al. 2001). De nombreuses classes de sphingolipides sont présentes et notamment le GM1 ainsi que les glycosylcérébrosides (lacto- et galactocérébrosides) (Maréchal et al., 2002, Sonda et al. 2005, Bisanz et al. 2006).

Les approches analytiques qui ont récemment été développées, en particulier par chromatographie en phase liquide-gazeuse et spectrométrie de masse, permettent d'obtenir des profils lipidiques (appelés aussi lipidomes), après détermination de la composition et de l'abondance de chaque classe lipidique dans un échantillon donné. Ces méthodes ont été récemment utilisées afin d'obtenir une approche globale du lipidome des différents compartiments membranaires (voir annexe 1).

2. Rafts

Ce type de sous-domaine membranaire a été observé au niveau de la pellicule du parasite et dans la MVP (Johnson et al. 2007, Azzouz et al. 2006, Coppens et Vielmeyer 2005). Le rôle majeur qui leur a été attribué est l'ancrage de protéines telles que celles du glideosome et plus particulièrement, GAP50 (Johnson et al. 2007) ou encore l'antigène majeur de surface de *T. gondii*, SAG1 (Azzouz et al. 2006). Une méthode, dérivée de celles décrite chez les cellules animales, a récemment été developpée pour extraire ces rafts. Elle consiste en une extraction au triton-X100 à froid (Azzouz et al. 2006). Les auteurs ont ainsi isolé l'ensemble des domaines résistant aux détergents (DRMs) de la cellule parasitaire et en ont analysé le contenu lipidique par chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC). En

plus de la présence de phospholipides (PC, PE, PS), le profil lipidique de l'échantillon était clairement enrichi en cholestérol et en sphingolipides (GM1, sphingomyéline et galactocérébroside) de manière similaire aux DRMs de cellules animales. Dans ces fractions enrichies en rafts, trois tâches sont restées non identifiées, dont une à une distance de migration proche de celle du galactocérébroside. L'analyse des protéines associées à ces domaines membranaires a permis de détecter la présence de myosine, peut-être associée à GAP50 (par ailleurs montrée comme étant ancrée par les rafts de l'IMC, Johnson et al. 2007). Une subtilisine sérine protéase, ROP4, la tubuline β ainsi que d'autres protéines non identifiées ont été aussi recensées dans les rafts de *T. gondii* (Azzouz et al. 2006). Ces données suggèrent que les DRMs pourraient permettre d'une part, l'ancrage du complexe ROP2/4/5 lors de l'invasion active et d'autre part, l'ancrage de la tubuline au niveau de l'IMC par l'intermédiaire de protéines membranaires. La purification des différents compartiments membranaires puis l'isolement de ces rafts lipidiques permettrait probablement d'identifier des protéines ancrées dans des micro-domaines membranaires. De plus, la composition de tels sous-domaines n'est pas encore établie puisque de nombreux indices tendent à montrer l'existence de rafts autres que ceux resistant aux détergents (voir paragraphe IA3).

C. Métabolisme et dynamique lipidique chez *T. gondii*

1. Les acides gras

La biosynthèse des acides gras est une voie métabolique essentielle puisqu'elle permet de fournir les briques essentielles à la synthèse de la majeure partie des lipides de la cellule (paragraphes II. A. et B.). Il existe une grande diversité de chaînes d'acides gras chez *T. gondii* (Gallois et al., 1988) mais leur composition globale reste très largement inconnue. Afin de répondre à l'énorme demande en lipides pour le développement et la division du parasite, un apport continu en acides gras est nécessaire. Nous décrirons succinctement dans ce paragraphe les différents moyens mis en oeuvre par *T. gondii* pour répondre à cette demande.

- ***Biosynthèse de novo des acides gras chez* T. gondii**

Les eucaryotes réalisent la synthèse des acides gras suivant soit la voie de la FAS I, soit celle de la FAS II (paragraphe II. B.). Suite à l'acquisition de l'apicoplaste, *T. gondii* possède l'ensemble des enzymes de FAS II (pour revues Seeber et al. 2003, Ralph et al. 2004). *T. gondii* possède aussi un complexe protéique de type FAS I (Zhu et al. 2004, Ajioka et Soldati 2007), ainsi qu'une FAE (paragraphe II. B.) (Mazumdar et al. 2006). L'activité de ces trois systèmes pourrait conduire à des productions redondantes de chaînes d'acides gras. Grâce à des marquages métaboliques, Bisanz et al. (2006) ont montré que la synthèse *de novo* des acides gras par la voie FAS II constitue une source de groupements acyls pour la synthèse des glycérolipides. Mazumdar et al. (2006) ont analysé un mutant conditionnel d'un des composants central de la voie FAS II, en combinaison avec des marquages métaboliques ainsi que des traitements sélectifs de la voie FAS I et FAS II. Ils ont pu démontrer que la voie FAS

II est essentielle à la biogénèse du plaste mais qu'elle ne constitue pas la source majeure de groupements acyls pour la synthèse des glycérolipides. Ensemble, les résultats de ces deux études soulignent l'importance de :

(i) la production d'acides gras par les FAS pour la synthèse des glycérolipides ;

(ii) l'activité de la voie FAS II pour la biogenèse de l'apicoplaste (et par conséquent, pour survie du parasite, paragraphe IV. A. 5).

La voie de la FAS II est semblable à son homologue chloroplastique, à l'exception du processus d'approvisionnement en acétyl-CoA (Ralph et al. 2004). En effet, l'ACCase (paragraphe II. B. 1) de *T. gondii* est localisée dans l'apicoplaste (Jelenska et al. 2001) et l'acetyl-CoA ne peut pas traverser les membranes. Cette molécule doit donc être synthétisé *de novo* dans l'apicoplaste. Une des explications plausibles impliquerait l'import de phospho-énol-pyruvate (PEP) dans l'apicoplaste par un transporteur de triose phosphate présent sur les membranes de l'apicoplaste (Mullin et al. 2006), suivi d'une conversion du PEP en pyruvate grâce à une pyruvate kinase (Ralph et al. 2004). Le complexe de la pyruvate deshydrogénase de l'apicoplaste (Ralph et al. 2004) permettrait alors de génerer l'acétyl-CoA nécessaire à la production d'acides gras, à partir du pyruvate.

Le complexe protéique de la voie FAS I est moins bien compris. Il serait associé avec la mitochondrie (Ajioka et Soldati, 2007) ou encore une portion du cytoplasme englobé dans une invagination membranaire de la mitochondrie (Kölher 2006, paragraphe IV. A. 5).

- ***Détournement de précurseurs issus de l'hôte***

Toxoplasma gondii est aussi capable d'importer des acides gras issus de la cellule hôte (Tomavo et al. 1989, Quittnat et al. 2004). Les parasites intracellulaires peuvent accumuler dans leur cytosol (probablement dans le RE et/ou le Golgi,) l'analogue d'acide gras fluorescent C4-BODIPY-C9 lorsque celui ci est incorporé dans le milieu de culture (Charron et Sibley 2002). Cet analogue fluorescent ne s'accumule que sur la zone pelliculaire lorsque le parasite extracellulaire est incubé en sa présence (Charron et Sibley 2002). Ce résultat souligne la capacité de *T. gondii* à réaliser des incorporations différentielles d'acides gras exogènes selon son stade de vie. De plus, le parasite intracellulaire et extracellulaire peut sélectionner le type d'acides gras exogènes à incorporer (Quittnat et al. 2004). En effet, lors d'expérience d'incorporation d'acides gras radioactivement marqués (Quittnat et al. 2004), *T. gondii* incorpore préferentiellement l'acide palmitique plutôt que l'acide oléique, l'acide stéarique, l'acide linoléique ou encore l'acide arachidonique. L'acide gras est ensuite estérifié soit pour former du triacylglycérol (Quittnat et al. 2004), soit des esters de cholestérol (Nishikawa et al. 2005). De façon analogue, l'incorporation de l'acide butyrique radioactif par les parasites extracellulaires et intracellulaires permet de générer de la phosphatidylcholine (Charron et Sibley 2002). Enfin, les parasites extracellulaires peuvent incorporer de l'acide palmitique et myristique dans les ancres GPI de protéines telles que SAG1 (Tomavo et al. 1989).

2. Le cholestérol

A ce jour, aucune voie métabolique responsable de la synthèse du cholestérol n'a pu être identifiée chez *Toxoplasma gondii*. Cependant, la présence du cholestérol a pu être majoritairement détectée au niveau de la membrane plasmique et à l'intérieur des rhoptries (Coppens et Joiner 2003) du parasite. De plus, des esters de cholestérol sont présents au niveau de corps lipidiques cytosoliques (Charron et Sibley 2002, Quittnat et al. 2004). La présence du cholestérol et de ses dérivés met en jeu un système complexe de détournement des réserves de l'hôte. En effet, *T. gondii* est capable de re-diriger le flux de cholestérol lié aux LDL (Low Density Lipoprotein) de la cellule hôte, après un transit dans les lysosomes, afin d'être re-distribué vers l'ensemble des compartiments cellulaires (Coppens et al. 2000). Cette voie a été mise en évidence après incubation de cellules infectées par *T. gondii* avec du cholestérol marqué et incorporé dans les LDL. Ce mécanisme mettrait en jeu la MVP et ses extensions telles que les HOSTs (paragraphe IV. A. 4), mais on ne connaît pas les protéines mises en jeu lors de ce mécanisme (Coppens et Vielmeyer 2005, Coppens et al. 2007).

3. Les glycérolipides

- ***Biosynthèse de novo de glycérophospholipides chez* T. gondii**

Bisanz et al. (2006) ont montré par des études *in silico*, que *T. gondii* posséde l'ensemble des enzymes pour la synthèse *de novo* des trois précurseurs des glycérolipides (*i.e.* l'AP, le DAG et le CDP-DAG, paragraphe II. B. 2).

Concernant les glycérophospholipides, le parasite est équipé des enzymes nécessaires à la synthèse *de novo* de l'ensemble des aminoglycérophospholipides *via* la voie de synthèse de Kennedy (paragraphe II. B. 2). L'approche par marquages métaboliques suggère que les parasites extracellulaires et intracellulaires incubés avec de l'acétate radioactif, peuvent synthétiser la PC, la PE, la PS, le PI et le DPG (Bisanz et al. 2006). Le PG ne semble être synthétisé que chez le parasite extracellulaire (Bisanz et al. 2006).

Concernant les glycoglycérolipides, l'incorporation d'UDP-Gal radioactif dans des lysats de parasites extracellulaires a permis de mesurer la synthèse de deux galactolipides dont les caractéristiques biochimiques sont similaires au MGDG et DGDG de plantes (Maréchal et al. 2002). Ce résultat suggère que le parasite possède la machinerie nécessaire à la synthèse des galactolipides de types végétaux. Bisanz et al. (2006) ont recensé les enzymes initiales permettant la synthèse de glycérolipides selon la voie de Kennedy de type plastidiale jusqu'au lyso-AP. Cependant, aucun gène homologue des MGDG synthases et DGDG synthases n'a pu être détecté chez les Apicomplexa. Les marquages métaboliques effectués en présence d'acétate radiomarqué par Bisanz et al. (2006) sur le parasite extracellulaire ont de plus confirmé l'accumulation d'un lipide dont la migration en chromatographie de couche mince est indiscernable de celle du DGDG.

- ***Détournement de précurseurs issus de l'hôte***

D'après les mesures quantitatives de synthèse des glycérophospholipides, *T. gondii* peut synthétiser suffisamment de PE pour ses besoins, mais seulement 50 % de la quantité de PS et 5-10 % de celle de PC nécessaires lors d'une division parasitaire. (Gupta et al. 2005, Charron et Sibley 2002). Le parasite semble auxotrophe pour la choline et/ou la PC. En effet *T. gondii* peut incorporer des précurseurs de têtes polaires du milieu extracellulaire comme la sérine, l'éthanolamine et la choline pour la synthèse de glycérophospholipides (Gupta et al 2005, Charron et Sibley 2002). Charron et Sibley (2002) ont analysé l'incorporation et le devenir d'analogues fluorescents de glycérophospholipides chez *T. gondii*, le BODIPY-PA et le BODIPY-PC. Lorsque l'incorporation de ces analogues est réalisée après l'invasion du parasite dans la cellule hôte, le BODIPY-PC s'accumule au niveau de la membrane plasmique et dans des vésicules dispersées dans le cytosol du parasite alors que le BODIPY-PA est retrouvé dans des régions présumées correspondre au RE et/ou Golgi du parasite ainsi que sur la MVP. Si les cellules hôtes sont marquées avec ces deux analogues fluorescents préalablement à l'invasion des parasites, le BODIPY-PA s'accumule uniquement sur la MVP. Le BODIPY-PC reste lui, complètement exclu du parasite.

4. Les sphingolipides

- ***Biosynthèse de novo des sphingolipides chez* T. gondii**

Les glycosphingolipides tels que l'inositol phosphorylcéramide sont synthétisés *de novo* par la voie du 3-cétosphinganine à partir de la sérine et du palmimityl-CoA (Azzouz et al. 2002, Sonda et al. 2005). Des marquages métaboliques montrent que les parasites extracellulaires et intracellulaires peuvent incorporer l'acétate radioactif dans du glycosylcérébroside, du lactosylcérébroside et du globosylcérébroside alors que seuls les parasites extracellulaires peuvent former des globosides (Bisanz et al. 2006). Les parasites extracellulaires peuvent par ailleurs utiliser l'UDP-Gal radioactivement marqué pour former du galactosylcérébroside (Maréchal et al. 2002). L'anomérie exacte des groupements saccharidiques des têtes polaires n'est pas établie.

- ***Détournement de précurseurs issus de l'hôte***

Lors de l'incubation de la cellule hôte avec un analogue fluorescent de la céramide (NBD-C6-céramide) préalablement à l'invasion, le parasite accumule cet analogue au niveau de l'appareil de Golgi (de Melo et de Souza, 1996).

D. Métabolisme et dynamique des lipides comme cible de traitements anti-parasitaires

Le métabolisme des lipides, crucial pour la biogenèse membranaire du parasite, a concentré l'attention de nombreuses recherches visant à découvrir de nouveaux traitements thérapeutiques, pour lutter contre la toxoplasmose, mais aussi pour lutter contre les infections dues à d'autres Apicomplexes, en particulier la malaria. Le Tableau 6 résume l'ensemble des cibles issues du métabolisme lipidique de *T. gondii*, utilisées à des fins thérapeutiques.

Cible	Voie métabolique	Type de traitement et nom du composé	référence
Synthèse des acides gras			
ACCase apicoplastique (synthèse du malonyl-CoA)	FAS II	Herbicide : Aryloxyphneoxypropionate (ex : Haloxyfop)	Jelenska et al. 2002
FabI (Enoy-ACP réductase)	FAS II	Herbicide : Triclosan	Baldock et al. 1996 McLeod et al. 2001
FabH apicoplastique (β-cétoacyl-ACP synthase)	FAS II	Antibiotique : Thiolactomycine	Oishi et al. 1982
FabH (β-cétoacyl-ACP synthase)	FAS I et FAS II	Antibiotique : Cérulénine	Heath et al. 2001
Stérols			
?	Synthèse des cholesteryl esters	Anti-parasitaire : ?	Nishikawa et al. 2005
Stérol-24-méthyltransférase	Synthèse des cholesteryl esters	Anti-parasitaire : 22,26-azastérol et 24-25-(R,S)-épiminolanostérol (analogues de stérols)	Dantas-Leite et al. 2004
Glycérophospholipides			
?	Synthèse de la PC	Anti-parasitaire (analogue de la choline) : prodrogues de sels de bisthiazolium	Vial et al. 2004
Shingolipides			
Inositol phosphorylcéramide	Voie de la 3-cétosphinganine	Antibiotique : Auréobasidine A	Sonda et al. 2005

E. Objectifs du travail de thèse

Suivant une approche comparative de la synthèse des lipides chloroplastiques, par des eucaryotes dotés de plastes primaires et secondaires, les objectifs du projet de thèse étaient :

(i) de contribuer à l'étude de la structure jusqu'alors inconnue des MGDG synthases d'Angiosperme;

(ii) d'identifier et caractériser des inhibiteurs de MGDG synthases, et d'évaluer leur bioactivité potentielle en tant qu'herbicides et en tant qu'anti-parasitaires;

(iii) de contribuer à caractériser les glycolipides chez les apicomplexes, en particulier les lipides portant une tête polaire galactosylée, et d'explorer la localisation et le(s) rôle(s) que pourraient avoir ces lipides chez *T. gondii*.

Ce manuscrit présente d'abord la modélisation et l'analyse de la structure tridimensionnelle des MGDG synthases d'Angiosperme (Chapitre I). Le criblage de molécules inhibitrices de la synthèse de MGDG et la caractérisation des molécules sélectionnées, sur différents modèles d'eucaryotes dotés de plastes (un Angiosperme, *Arabidopsis thaliana*, une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii* et un Apicomplexe, *Toxoplasma gondii*), est ensuite présentée (Chapitre II). Puis une étude de la localisation sub-cellulaire chez *T. gondii* d'une classe de lipides, détectés par un serum dirigé contre un galactolipide chloroplastique de plantes, est détaillée (Chapitre III). Cette étude nous a amené à étudier si des galactolipides en surface du parasite pourraient présenter des propriétés immunogénique intéressantes dans une visée diagnostique et / ou thérapeutique (Chapitre IV).

Matériel et Méthodes

Ce chapitre décrit succinctement les méthodes correspondant aux chapitres II et IV des Résultats. Les chapitres I et III des Résultats, présentés sous forme d'articles publié ou soumis, possèdent une partie Matériel et Méthodes.

I. Organismes modèles étudiés et méthodes de culture : Arabidopsis*,* Chlamydomonas*, fibroblastes humains,* Toxoplasma*,* Escherichia coli

A. Choix des organismes modèles

Les phylums pour lesquels une synthèse de galactolipides de type chloroplastique est rapportée sont les cyanobactéries et les lignées eucaryotes dont les cellules contiennent des plastes primaires (telles que les algues vertes et les plantes supérieures) ou des plastes secondaires. Pour que notre étude aborde cette diversité, nous avons choisi certains organismes modèles dont la culture en laboratoire est maîtrisée et pour lesquels des données moléculaires sontt acquises. Ces organismes sont respectivement une plante supérieure, *Arabidopsis thaliana*, une algue verte unicellulaire, *Chlamydomonas reinhardtii*, un parasite apicomplexe, *Toxoplasma gondii*. *Escherichia coli* et les cellules humaines parasitées constituent des modèles d'organismes procaryote et eucaryote sans galactolipide de type plastidial. Les cultures ont été réalisées en conditions standard, ou en présence de molécules bioactives, présentant des propriétés cytotoxiques éventuelles pour chacun des modèles étudiés.

B. Méthodes de culture et traitements en présence de molécules bioactives

1. *Arabidopsis thaliana*

a. Méthode générale de culture

Des graines d'*Arabidopsis thaliana,* écotype *Columbia,* ont été stérilisées en surface (Barychlore 10%, v/v ; Triton-X100 0,5%, p/v dans de l'éthanol 90%) puis semées sur milieu MS gélosé (400 µl de milieu de Murashige et Skoog complémenté de saccharose 5 g/l, agar 15 %) en microplaque Cellstar de 48 puits stériles. Les plaques sont ensuite placées en vernalisation à 4°C pendant 48 h avant d'être transférées en chambre de culture (humidité 80

% ; 20°C ; lumière blanche de densité de flux de photons de 150 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) dans un cycle de type jour-long (12 h lumière/12 h obscurité) favorisant la croissance végétative.

b. Traitements en présence de composés candidats-herbicides

Un herbicide est un composé létal pour les plantes, provoquant un retard de croissance à faibles doses, et une mortalité très rapide à fortes doses. La culture en microplaque Cellstar de 48 puits stériles permet de mettre les graines semées en présence de concentrations variables de molécules effectrices (0 - 500 µM) et de DMSO (10%). A dose totalement létale, la germination n'est pas observée. A doses plus faibles, une plantule peut se développer et éventuellement mourir après plusieurs jours. Par convention, une concentration de molécule inhibant la croissance d'*Arabidopsis* de 50% par rapport à celle des plants non traités (IC50) est établie en mesurant le diamètre des plantules après 12 jours de culture.

2. *Chlamydomonas reinhardtii*

a. Méthode générale de culture

Une suspension de culture axénique de *Chlamydomonas reinhardtii* (10 µl) est déposée sur milieu TAP gélosé (400 µl de tampon Tris-Acetate-Phosphate, agar 15%), en microplaque Cellstar de 48 puits stériles. Les plaques sont ensuite placées en chambre de culture (humidité 80 %, 20°C, lumière continue 50 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$).

b. Traitements en présence de composés candidats-algistatiques ou algicides

La culture en microplaque Cellstar de 48 puits stériles permet de mettre les graines semées en présence de concentrations variables de molécules effectrices (0 - 500 µM) et de DMSO (10%). La croissance des cultures formant sur milieu solide un tapis cellulaire, une IC50 est déterminée pour la concentration à laquelle le tapis cellulaire présente 50% de la surface obtenue sans molécules. Pour l'analyse systématique de dérivés ayant un potentiel algicide, l'IC50 a été déterminée après croissance en milieu liquide (tampon TAP) avec numération de cellules en croissance.

3. Fibroblastes humains

a. Méthode générale de culture

Les cellules humaines (Human Foreskin Fibroblasts, HFF ; Human Epithelial cells (adénocarcinome du col de l'utérus), HeLa) étudiées dans ce mémoire ont été sélectionnées pour permettre la propagation simple de parasites, ainsi que leur étude par techniques d'imagerie cellulaire. Les cellules sont cultivées à 37°C, sous 5% de CO_2, en milieu D10 (Dulbecco Minimum Essential Medium, Gibco, additionné de sérum de veau fœtal 10% ; glutamine 1% ; pénicilline 50 $U.ml^{-1}$ et streptomycine 50 $\mu g.\mu l^{-1}$), jusqu'à former un tapis cellulaire.

b. Traitements en présence de composés potentiellement toxiques

Les molécules que nous avons étudiées possèdent des propriétés remarquables décrites dans le chapitre II, en tant qu'herbicides ou d'anti-parasitaires potentiels. L'optimisation de ces composés visant à développer des candidats herbicides et/ou médicaments requiert leur innocuité sur l'humain, au moins avec un index thérapeutique acceptable. La mise au point de conditions de culture de fibroblastes humains permettant de caractériser les effets, tant sur formes non proliférantes que sous forme proliférantes est détaillée au chapitre II.

Pour l'étude de l'effet sur la prolifération cellulaire, trois flasques de culture de 25 cm^2 chacune (T25, BD Falcon) contenant des tapis cellulaires confluents de cellules HFF sont rincées avec du PBS à 37°C. Les tapis cellulaires sont recouverts de trypsine (Dutscher, 0,05%) diluée au 1/5 dans du milieu PBS puis placés à 37°C pendant 2 min. La digestion enzymatique est stoppée par l'ajout de 5 mL de milieu D10 à 37°C dans chacune des flasques. Les cellules sont récupérées et mises en commun pour un comptage. Elles sont ensuite réparties dans 7 flasques T25 vides (QSP 5 mL de D10) et mises en culture à 37°C, sous 5% de CO_2 pendant 12 h. Les tapis peu confluents (20 à 25% de la surface de culture) sont alors incubés avec différentes concentrations de molécules (100 µM, 50 µM et 25 µM) diluées dans du milieu D10, avec 1% de DMSO. L'ensemble est remis en culture à 37°C, 5% de CO_2 pendant 24 h. Les tapis résultants sont observés, désolidarisés par traitement à la trypsine (comme décrit ci-dessus) et les cellules dénombrées.

Pour les mesures systématiques d'un grand nombre de composés, un test de prolifération d'érythroblastes a été mis en œuvre par N. Saïdani (Laboratoire PCV, CEA Grenoble, et UMR 5539, Université de Montpellier)

4. *Toxoplasma gondii*

Les souches de *Toxoplasma gondii* RH, RH-β1 (souche RH exprimant un gène rapporteur codant pour la β-galactosidase), Pru (Prugniaud), Pru-β1, ainsi qu'une souche de *Neospora caninum*, Neo-β1 ont été maintenues en culture par passages sur tapis de cellules HFF confluents dans du milieu D10. Certaines souches portent le gène *lacZ* (β-galactosidase) d'*E. coli* sous le contrôle du promoteur SAG 1 (McFadden et al. 1997).

a. Propagation sur tapis de fibroblastes humains

Le protiste apicomplexe *T. gondii* (souche RH) est propagé *in vitro* en cellules humaines (Human Foreskin Fibroblasts, HFF ; Human Epithelial cells (adénocarcinome du col de l'utérus), HeLa), cultivées à 37°C, sous 5% de CO_2, en milieu D10 (Dulbecco Minimum Essential Medium, Gibco, additionné de sérum de veau fœtal 10% ; glutamine 1% ; pénicilline 50 $U.ml^{-1}$ et streptomycine 50 $\mu g.\mu l^{-1}$). Les monocouches confluentes de HFF sont infectées par les parasites (500 µl de parasites extracellulaires) jusqu'à lyse complète des cellules hôtes.

b. Invasion cellulaire synchronisée des cellules hôtes

Les parasites sont déposés sur des lamelles de HFF. Après 1 min de sédimentation des parasites sur les cellules HFF par centrifugation à environ 100 g, les plaques de culture sont incubées à 37°C pendant 12 min. Le tapis cellulaire est ensuite lavé 5 fois avec du milieu PBS afin d'éliminer les parasites restés extracellulaires.

c. Traitements en présence de composés candidats anti-parasitaires

Les travaux présentés au chapitre II détaillent la mise au point d'un test pour doser les effets de composés ayant une activité anti-parasitaire. Du fait qu'il existe de très nombreux mécanismes par lesquels des composés peuvent induire la mort d'un parasite, il n'existe pas de condition standard. Nous décrirons ici les méthodes utilisées successivement pour aboutir à un test systématique valable pour la famille de composés étudiés dans ce mémoire.

- ***Méthode préliminaire de mesure de l'effet de molécules à 100 µM***

Cette méthode a permis une analyse sommaire initiale, par observation morphologique des parasites et numération. Pour les analyses pharmacologiques, suite à la lyse du tapis cellulaire, les parasites extracellulaires sont filtrés sur membrane nucléopore (diamètre du pore : 3 µm), centrifugés à 1000 g à 23°C, lavés avec du milieu PBS (Phosphate Buffer Saline : 120 mM NaCl, 0.08 M Na_2HPO_4 / 0.02 M NaH_2PO_4, pH 7.4) et une fraction aliquote est comptée en cellule de Thoma. Environ 2.10^8 toxoplasmes sont incubés pendant 1 h à 37°C sous agitation douce, avec les différentes molécules testées à concentration finale de 100 µM dans du milieu PBS en présence de DMSO 0,1% (300 µM dans du milieu PBS en présence de DMSO 0,1% pour la molécule contrôle, l'haloxyfop). Les parasites prétraités par les molécules sont déposés, à raison de 4.10^7 parasites par puits, sur des lamelles de verre recouvertes de tapis confluents de cellules HFF (lamelles elles-mêmes déposées au fond des puits de boites de culture cellulaire de 24 puits). Différents traitements sont appliqués : 1) développement à 37°C, 5% de CO_2, pendant 18 h dans 500 µl de milieu D10 ; 2) développement à 37°C, 5% de CO_2, pendant 18 h dans 500 µl de milieu D10 additionné de molécule (100 µM final) ; 3) après 10 min sur glace, incubation des boites de culture 5 min à 37°C (bain marie). Les parasites restés extracellulaires sont aspirés, les tapis de cellules sont lavés 8 fois avec du milieu PBS puis les cellules infectées sont replacées à l'incubateur 37°C, 5% CO_2 pendant 1 h avec 500 µl de milieu D10. Les parasites sont ensuite observés.

- ***Méthodes préliminaires de mesure de l'effet de molécules sur les formes extracellulaires et / ou intracellulaires de* T. gondii.**

Ces méthodes ont permis d'établir les conditions d'incubation des formes extracellulaires et / ou intracellulaires de *T. gondii* pour mettre au point le test systématique décrit plus loin. Environ 10^9 parasites sont préparés comme dansdécrit le paragraphe études préliminaires.

Pour les traitements extracellulaires, les parasites sont incubés pendant 1 h à 37°C sous agitation douce, avec les différentes molécules testées à différentes

concentrations dans du milieu PBS en présence de DMSO 0,1%. Les parasites prétraités par les drogues, sont déposés, à raison de 4.10^7 parasites par puits, sur des lamelles de verre recouvertes de tapis confluents de cellules HFF (lamelles elles-mêmes déposées au fond des puits de boites de culture cellulaire de 24 puits). Après une nuit de culture, les parasites sont fixés, mis en présence d'un un anticorps anti-SAG1 et visualisés selon la méthode d'immunofluorescence indirecte décrite plus loin.

Pour les traitements intracellulaires, les parasites sont déposés, à raison de 4.10^7 parasites par puits, sur des lamelles de verre recouvertes de tapis confluents de HFF (lamelles elles-mêmes déposées au fond des puits de boites de culture cellulaire de 24 puits). Le milieu de culture D10 est ensuite remplacé par un milieu contenant les molécules diluées à une concentration finale de 100 µM. Après une nuit de culture, les parasites sont fixés, mis en présence avec un anticorps anti-SAG1 et détectés par immunofluorescence indirecte.

Pour le traitement extra et intracellulaire (méthode dite « full treatment »), les parasites sont tout d'abord prétraités comme lors du traitement intracellulaire, puis transférés pour propagation dans des cellules HFF, sans arrêter l'incubation en présence de molécule. Après une nuit de culture, les parasites sont fixés, mis en présence avec un anticorps anti-SAG1 et détectés par immunofluorescence indirecte.

- ***Méthodes colorimétriques permettant la mesure de l'IC50 de molécules sur* Toxoplasma gondii *(souches RH-β1 et Pru-β1) et* Neospora canimum *(souche Neo-β1).***

A la différence des tests préliminaires, les méthodes suivantes permettent une mesure de la prolifération des parasites par colorimétrie. L'ensemble de ces tests a été réalisé sur plaques 96 puits microtitrées (Greiner). Le fond de chaque puits est recouvert par un tapis de cellules confluent suivant les méthodes de culture du laboratoire. Les souches RH-β1, Pru-β1 et Neo-β1 utilisées lors de ces tests, ont été maintenues en culture par passages sur tapis de cellules HFF confluents dans du D10.

Pour les traitements extracellulaires, les parasites fraîchement lysés sont filtrés, rincés par du tampon PBS et comptés. Les parasites sont incubés pendant 1 h à 37°C sous agitation douce, avec les gammes de dilutions (100 µM-5 nM) des différentes molécules à tester. Les parasites sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 1000 g et remis en suspension dans du PBS. Les tapis cellulaires des plaques 96 puits sont infectés avec 10^4 parasites par puits. Ces parasites sont mis à envahir suivant le protocole d'invasion synchronisé décrit plus haut. Après rinçages, les puits sont remplis avec 200 µL de milieu D10 sans rouge phénol. Les plaques sont mises en culture à 37°C, 5% de CO_2 pendant environ 48h. L'activité β-galactosidase est mesurée selon la méthode décrite par McFadden et al. (1997). Brièvement, les puits sont vidés du milieu qu'ils

contiennent, rincés une fois par du PBS afin d'éliminer un maximum de parasites extracellulaires. Le PBS est ensuite remplacé par 100 µL de tampon de lyse (100 mM HEPES pH8, 1 mM $MgSO_4$-$7H_2O$, 1% Triton X-100 et 5 mM DTT). Les plaques sont incubées pendant 30 min à 50°C. Puis 110 µL de tampon β-gal (100 mM β-mercaptoethanol, 9 mM $MgCl_2$ dans 100 mM de tampon phosphate pH7.3) sont ajoutés. Les plaques sont remises en incubation pendant 5 min à 37°C. 40 µL de substrat chromophore CPRG, dilués dans du tampon phosphate (1 mM final) sont ajoutés au milieu. Les plaques sont incubées à 37°C selon un temps dépendant de la quantité de parasites dans chaque puits (de 30 min à plusieurs heures). La mesure est effectuée à 570 nm sur un lecteur de plaques Bio-tek. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle par infection d'une autre plaque 96 avec des dilutions du parasite utilisé (0-10^7 parasite/puits) en triplicat. La concentration de molécule conduisant à 50% d'inhibition de prolifération cellulaire mesurée par colorimétrie est déduite graphiquement.

Pour les traitements intracellulaires, les parasites fraîchement lysés sont filtrés, rincés par du PBS et comptés. Les tapis cellulaires des plaques 96 puits sont infectés avec 10^4 parasites par puits. Ces parasites sont mis à envahir suivant le protocole d'invasion synchronisé décrit plus haut. Après rinçages, les puits sont remplis avec 200 µL de milieu D10 sans rouge phénol, contenant les différentes doses de molécules à tester (100 µM-5 nM), en triplicat. Les plaques sont mises en culture à 37°C, 5% de CO_2 pendant environ 48h. L'activité β-galactosidase est mesurée selon la méthode décrite ci-dessus.

5. *Escherichia coli*

La culture du modèle bactérien *Escherichia coli* (souche DH5α) est réalisée selon les techniques classiques de microbiologie, en milieu LB (Luria-Bertani) liquide ou gélosé (agar 15%) à 37°C. Pour les analyses de complémentation pharmacologique, les cellules ont été cultivées sur milieu gélosé (400 µl) en microplaque Cellstar de 48 puits stériles, en présence de concentrations variables de molécules effectrices (0 - 500 µM) et de DMSO (10%).

II. Systèmes recombinants bactériens

A. Souches recombinantes d'*Escherichia coli*

Les MGDG synthases recombinantes étudiées dans ce mémoire sont la MGDG synthase 1 de *Spinacia oleracea*, soMGD1 (Genbank AJ249607), ainsi que tous les membres de la famille multigénique d'*Arabidopsis thaliana*, atMGD1, atMGD2 et atMGD3 (Genbank AL031004, AJ000331 et AC007187). Les séquences codant pour les protéines recombinantes ont été insérées dans le vecteur d'expression pET-Y3a (Vauclare, 1996), dérivant du vecteur pET-3a (Novagen), auquel a été ajouté le gène *arg U* (*DNA Y*) codant pour un ARN de

transfert associé aux codons rares AGA/AGG. Le vecteur pET-y3a exprime un gène de résistance à la carbénicilline. Les MGDG synthases de type A (soMGD1 et atMGD1) ont été exprimées sous forme tronquée de leur peptide de transit chloroplastique (soMGD1 exprimé à partir de la Leucine 99 et atMGD1 à partir de la Glycine 105). Les MGDG synthases de type B (atMGD2 et atMGD3), dont la partie N-terminale est plus courte (~40 amino acides) et sans peptide de transit apparent, ont été exprimées sous formes complètes.

B. Méthodes d'induction de l'expression de protéines recombinantes chez *Escherichia coli*

Nous avons utilisé le système d'expression procaryotique pET développé par Studier et al. (1990). Les séquences codant pour les MGDG synthases recombinantes sont sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase T7. Le vecteur d'expression est transféré dans la souche d'*E. coli* BL21 (DE3) portant une copie chromosomique du gène *lacI* et du gène de l'ARN polymérase T7. Le produit de *lacI* bloque le promoteur *lacUV5* en amont du gène de la polymérase et empêche son expression. En présence d'IPTG, le répresseur produit par *lacI* est inactivé, le promoteur *lacUV5* devient alors actif et déclenche la synthèse de la polymérase T7 dont dépend l'expression des MGDG synthases recombinantes. Des bactéries transformées par choc thermique, contenant les constructions sauvages et mutées, sont sélectionnées après étalement sur milieu LB gélosé (15% d'agar), complémenté de carbénicilline (100 $\mu g.ml^{-1}$). Une colonie de chaque bactérie recombinante est mise en préculture pendant 16 h sous agitation à 37°C dans 5 ml de milieu LB (carbénicilline 100 $\mu g.ml^{-1}$). Les bactéries (400 µl) sont ensuite ensemencées dans 10 ml de milieu LB (carbénicilline 100 $\mu g.ml^{-1}$) et incubées sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO_{600nm} de 0,45. L'expression de protéines recombinantes est alors induite par addition de 0,4 mM d'IPTG et incubation pendant 4 h à 28°C. Les bactéries sont concentrées par centrifugation (15 min, 5000 g) puis stockées dans 1,35 ml de Tris 10 mM pH 7,8 à -20°C.

III. Méthodes d'étude des protéines

A. Dosage des protéines

La concentration des protéines est déterminée par la technique de Lowry et al. (1951). Le dosage s'effectue par comparaison avec une gamme étalon réalisée pour chaque série de dosage, avec la sérum albumine bovine (BSA). Les protéines sont dosées préalablement à tout essai enzymatique.

B. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide permet de séparer les polypeptides en fonction de la masse moléculaire. Les échantillons sont préalablement repris dans un tampon Tris 0,1 M, pH 7,8, glycérol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), DTT 25 mM, bleu de bromophénol 0,1% (p/v), ce tampon dénature et charge négativement les protéines. La dénaturation est

complétée par ébullition à 100°C pendant 5 min. Les protéines sont concentrées dans le gel supérieur (acrylamide 5 %, pH 6,5) puis séparées selon leurs tailles dans le gel de séparation (acrylamide 12%, pH 8,8) selon la méthode de Chua et al. (1980). Les protéines séparées sont colorées au bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma 2,5 $g.l^{-1}$, isopropanol/acide acétique 3:1, v/v). L'excès de colorant est ensuite éliminé par lavage. Des marqueurs témoins de masse moléculaire (standard Biorad) sont déposés sur le gel parallèlement aux échantillons. Le profil protéique des échantillons dosés enzymatiquement est systématiquement contrôlé.

C. Transfert de protéines et immunodétection (Western blot)

a. Electrotransfert de protéines sur membrane de nitrocellulose

Les polypeptides séparés par électrophorèse sont transférés électriquement sur une membrane de nitrocellulose (Biorad, Transblot Cell). Après équilibration du gel pendant 20 min dans le tampon de transfert (tampon de migration complété de méthanol 20%, v/v), le transfert est effectué pendant 1 h à voltage constant (90 V) dans le tampon de transfert complété de SDS 0,01%, p/v. Les protéines fixées sur la membrane sont transitoirement repérées par coloration réversible par le Rouge Ponceau-S (1%, p/v, acide acétique 5%, v/v).

b. Immunodétection par chemiluminescence

Après électrotransfert, la feuille de nitrocellulose subit les traitements successifs suivants : une saturation des sites libres de la nitrocellulose pendant 1 h dans le tampon TBS (Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 9 $g.l^{-1}$) additionné de lait écrémé commercial 50 $g.l^{-1}$ (TBS-lait) ; une incubation pendant 1 h en présence d'anticorps primaire (anticorps de lapin dirigé contre le DGDG, anti-DGDG, $100^{ème}$) dilué dans le TBS-lait ; un rinçage dans le TBS additionné de Tween-20 0,1%, p/v (TBS-Tween). Puis la feuille de nitrocellulose subit un traitement similaire en présence d'un anticorps secondaire (anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de lapin, Sigma, $10.000^{ème}$) couplé à la peroxidase de radis noir. L'activité peroxidase est révélée dans un tampon alcalin (Tris 100 mM, pH 8,5) contenant du luminol (3-aminophalhydrazine) 12,5 mM et de l'acide coumarique 0,2 mM en présence d'eau oxygénée. La peroxidase catalyse l'oxydation du luminol. Le luminol oxydé est dans un état excité et revient à son état fondamental par émission de lumière (chemiluminescence) détectée par autoradiographie (Hyperfilm ECL, Amersham).

D. Mesure de l'activité enzymatique des MGDG synthases

Nous avons utilisé plusieurs méthodes pour mesurer l'activité MGDG synthase, soit dans des micelles mixtes après addition du détergent CHAPS (le détergent déstructure les bicouches lipidiques et provoque la solubilisation sous forme de microsphères contenant détergent, lipides et protéines membranaires), soit dans des vésicules membranaires intègres.

a. Mesure de l'activité après apport de diacylglycérol dans des micelles mixtes

Les membranes de bactéries recombinantes qui contiennent des protéines de MGDG synthase actives, sont trop pauvres en DAG pour mesurer une activité *in vitro*. Elles sont donc déstructurées (solubilisées) par addition d'un détergent zwittérionique, le CHAPS, permettant l'apport de DAG exogène au voisinage de l'enzyme. Du DAG (50 µg) en solution chloroformique est introduit dans un tube en verre qui est évaporé à sec sous argon. Le milieu réactionnel est constitué comme précédemment en ajoutant 4,5 mM de CHAPS. Des micelles mixtes contenant les lipides bactériens, le DAG exogène, des protéines membranaires, dont la MGDG synthase, se forment. La réaction est alors mesurée comme décrit précédemment.

b. Mesure de l'activité en vésicules de membranes chargées en diacylglycérol

Bien que les membranes biologiques soient naturellement pauvres en DAG, des vésicules de membranes d'enveloppe chloroplastique d'épinard, préparées sans inhiber l'activité galactolipide:galactolipide galactosyltransférase, peuvent contenir des taux élevés de DAG qui suffisent à mesurer l'activité MGDG synthase de l'enveloppe sans apporter de DAG exogène (Maréchal et al., 1994b). De même, des échantillons de membranes bactériennes recombinantes contenant la MGDG synthase 1 d'épinard (soMGD1), traitées par la phospholipase C, contiennent des teneurs en DAG suffisantes pour mesurer l'activité de galactosylation (Maréchal et al., 1999 ; Nishiyama et al., 2003). Pour mesurer l'activité de ces échantillons, nous avons suspendu ces vésicules membranaires dans un milieu contenant 50 mM MOPS-KOH, pH 7,8, 1 mM DTT, 100 mM KH_2PO_4/ K_2HPO_4, 250 mM KCl (volume final 150 µl). Pour le test miniaturisé ayant permis de réaliser le criblage pharmacologique présenté au chapitre II, et pour les premières évaluations de l'effet potentiel de molécules effectrices, des concentrations variables de molécule (1-100 µM) sont ajoutées en présence de DMSO (10% final). Le mélange est stabilisé pendant 30 min à 30°C. La réaction est démarrée en introduisant de l'UDP-[^{14}C]-galactose (37 Bq/µmole, 400 µM) et est arrêtée après 10 min par addition de chloroforme/méthanol 1 :2, v/v ; les lipides sont ensuite extraits par la méthode de Bligh et Dyer (1959) et transférés dans un pot de comptage. La mesure de radioactivité est effectuée dans un compteur à scintillation liquide (Betamatic, Kontron).

IV. Méthodes d'étude des lipides

Dosage par méthanolyse et chromatographie en phase gazeuse

Afin de doser les glycérolipides utilisés pour évaluer la spécificité de l'anticorps anti-DGDG et pour doser le diacylglycérol fourni en substrat aux MGDG synthases, une quantification a été réalisée. Une méthanolyse des glycérolipides est tout d'abord effectuée pour séparer les acides gras du squelette glycérol et les méthyler. La réaction se fait pendant 1

h à 100°C, par addition aux lipides évaporés à sec sous argon de 3 ml d'acide sulfurique (2,5% dans du méthanol). La réaction est arrêtée par addition de 3 ml d'eau. Les acides gras méthylés sont récupérés par 2 extractions avec 3 ml d'hexane et évaporés à sec. Les acides gras méthylés sont ensuite solubilisés dans 10 µl d'hexane, injectés dans une colonne BPX70 (SGE) et chromatographiés. La phase mobile est l'azote, gaz vecteur qui traverse en permanence la colonne placée dans un four thermostaté (130-180°C). La phase stationnaire est un solide absorbant (cyanopropyl polysilphène-siloxane). Les acides gras entraînés par le gaz vecteur à des vitesses dépendantes de leur taille et de leur solubilité sont quantifiés par comparaison avec un témoin interne (acide gras à 21 carbones) ajouté avant la méthanolyse.

V. Méthodes d'observations des cellules

A. Observations par microscopie optique et immunofluorescence indirecte (IFI)

Des cellules HFF sur lamelles de verre, infectées ou non par *Toxoplasma gondii*, sont fixées pendant 20 min avec du formaldéhyde 5% en PBS. Après perméabilisation de 10 min par du Triton-X100 0,1%, dans du milieu PBS, les lamelles sont saturées par du sérum de veau fœtal (Gibco, FBS) 5% et du sérum de chèvre 5% (Gibco), dans du PBS. Les épitopes sont détectés par incubation d'une heure avec un anticorps primaire (anticorps monoclonaux de souris ou sérum de lapin, -voir Tableau 1- dans du milieu FBS 1%, suivie de 3 lavages de 10 min par du FBS 1% puis d'une incubation d'une heure avec un anticorps secondaire (anticorps de chèvre ou de lapin couplés au BODIPY, Texas Red, Alexa 488, Cy3 Molecular Probes, Invitrogen Tableau 1). Après 3 lavages de 10 min par du PBS-FBS 1% suivi d'un lavage par du milieu PBS, les lamelles peuvent être incubées dans une solution au 1/15000 de Hoechst (Bioprobe) dans du PBS, rincées de nouveau avec du PBS puis retournées sur lame de verre en utilisant une solution de montage qui préserve la fluorescence (kit Prolong Antifad, ou Mowiol, Molecular Probes). Les lames sont observées en épifluorescence, au grossissement x100, à l'aide d'un microscope Axioplan 2 (Zeiss) muni d'un contraste de phase. Les échantillons sont photographiés à l'aide d'une caméra noir et blanc (Axiocam MRn, Zeiss) et les images sont traitées à l'aide du logiciel Axiovision 3.2 (Zeiss).

Anticorps I	*Cible*	*source*	*Dilution*	*Anticorps secondaire*	*dilution*
Anti-DGDG	DGDG	Maréchal et al. 2002	1/100 à 1/25	Sérum de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin-Bodipy	1/500
mAbTG17.179	GRA2	Charif et al. 1990	1/500	Sérum de chèvre anti-IgG (H+L) de souris-Texas Red	1/500
mAbYL 1/2	Tubuline-Tyr (tyrosinée)	Lafanechère et al. 1994	1/5000	Sérum de chèvre anti-IgG de souris-Cy3	1/500
mAbLEF	Tubuline-Glu (détyrosynée)	Lafanechère et al. 1994	1/5000	Sérum de chèvre anti-IgG de souris-Alexa 488	1/500
mAb anti-vinculine	vinculine		1/500	Sérum de chèvre anti-IgG de souris -BODIPY	1/500
mAb TG05.54	SAG1	Rodriguez et al. 1985 Darcy et al. 1992	1/500	Sérum anti-IgG de souris-Texas Red	1/500

Tableau 1 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés (les anticorps utilisés pour l'ensemble des expérimentations du chapitre III sont indiqués dans le texte de l'article).

B. Observations par microscopie électronique à transmission

L'ensemble des expérimentations de microscopie électronique présenté dans le chapitre II de ce mémoire à été réalisé en collaboration avec R. Mondragon (CINVESTAV, Mexico). Les tachyzoïtes prétraités à forte concentration de molécules (100 µM) sont rincés 3 fois au PBS puis remis en suspension ((5-7.10^7/ml) pour être fixés pendant 1 h à température ambiante dans du paraformaldéhyde 4%, contenant 0.1% de glutaraldéhyde dans du milieu PBS. Une fois rincés, les parasites ont été déshydratés dans l'éthanol et incorporés dans une résine LR White (London Resin Co.) qui est mise à polymérisée pendant 16 h sous UV à 4°C. Les sections fines sont ensuite montées sur des grilles de nickel recouvertes de formvar (Sengupta et al. 98).

C. Etude de la motilité de *Toxoplasma gondii* (gliding)

Des lames en verre sont recouvertes de poly-D lysine (10µg/mL final enPBS) pendant 1 h à 37°C puis rincée une fois en PBS. Des tachyzoïtes fraîchement lysés (10^7) sont prétraités en absence ou présence de molécules bioactives éventuelles (protocole identique au traitement extracellulaire décrit plus haut), puis sont déposés sur lame et laissés à sédimenter pendant 10 min à température ambiante. Le liquide restant après sédimentation est éliminé avec du papier absorbant sans qu'il ne touche la lame. 500 µL de poly-D lysine (10µg/mL dans du milieu D10) sont ajoutés et la lame est mise en incubation pendant 25 min à 37°C. Les traces de déplacement (gliding) sont visualisées par le protocole d'IFI classique avec un anticorps anti-SAG1 en prenant les précautions nécessaires pour ne pas décoller les parasites de la surface de la lame.

D. Etude de la sécrétion du contenu des granules denses et des micronèmes (Protocole de préparation des ESA -excretory secretory antigens-)

Des parasites fraîchement lysés sont filtrés et rincés par du milieu PBS puis comptés (10^9). Ils sont ensuite mis en suspension en PBS contenant ou non des inhibiteurs de la MGDG synthase (DB-E-PDB et DB-BE-PDB) à IC50 et traités pendant 1h à 37°C sur roue orbitale. Les parasites sont ensuite rincés en PBS par trois fois et remis en suspension en PBS, pH 7,4 contenant 0,1% (v/v) de FBS (sérum de veau fœtal). Le milieu est ensuite complémenté par de l'éthanol (1% final (v/v)) et mis à 37°C pendant 30 min selon le protocole développé par Carruthers et al. (1999). Les parasites sont ensuite séparés du contenu des micronèmes par élimination du culot cellulaire après centrifugation à 2000 g. Le surnageant contenant les ESA est collecté et étudié par SDS-PAGE et western blotting.

Succinctement, les ESA et le culot de parasites sont chauffés à 90°C dans un tampon de SDS PAGE contenant 2% de β-mercaptoéthanol, séparés sur gels 10% polyacrylamide (Laemmli 1970) et transférés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes sont étudiées grâce à des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines MIC2 1/5000 (mAb T3.4A11.2b4,) et GRA1 1/5000 (mAb Tg 17.43.1, Charif et al. 1990) suivis d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à la phosphatase alcaline 1/10000 (H&L, Promega, France développé par Interchim, France).

V. Méthodes d'étude de l'activité immunologique portée par un sérum

Ce paragraphe décrit quelques méthodes préliminaires d'analyse de sérums polyclonaux potentiellement dirigés contre des structures et/ou des processus essentiels de *Toxoplasma gondii.*

A. Immunoagglutination de parasites vivants

Suite à la lyse d'un tapis cellulaire de HFF infecté, les parasites extracellulaires sont collectés et filtrés sur membrane nucléopore (Millipore, diamètre de pore 3 µm), centrifugés à 1000 g à 23°C, lavés en PBS et comptés. Les parasites (2.10^7 par condition) sont incubés vivants en présence de sérum anti-DGDG (1/1, 1/2, 1/5 et 1/10) dilué en PBS, ou du sérum pré-immun (mêmes dilutions, dans du milieu PBS), préalablement dé-complémenté pendant 30 min à 52°C, ou en PBS seul. Les différents milieux contenant les parasites sont déposés au fond de puits d'une plaque 24 puits et placés à 37°C. Des observations au microscope optique inversé (Zeiss) toutes les 2 min pendant 1h30, permettent de détecter les phénomènes d'immunoagglutination.

B. Immunoagglutination de parasites fixés

Le test d'immunoagglutination de parasites fixés est réalisé à l'aide du kit « Toxo-Screen DA » de BioMérieux. (ref 75 481), à partir des instructions du fournisseur. Ce test est détaillé dans le chapitre II.

C. Mesure de la phagocytose induite par l'opsonisation des parasites par les sérums

Des macrophages sont prélevés dans le péritoine de rats BN. Ces macrophages sont rincés et comptés sur cellule de Thoma. Pour chaque condition, 5000 macrophages sont déposés sur des lamelles, sur lesquelles ils adhèrent, au fond de puits de plaques multipuits, pendant 1 h à 37°C. Cette incubation s'effectue dans du milieu D10 contenant du Lysotracker (Molecular Probe, Invitrogen) à une concentration finale de 1/50.000 permettant de colorer les compartiments lysosomaux. En parallèle, des parasites extracellulaires fraîchement lysés, de souche RH-YFP (Gubbels et al. 2003 ; 50 parasites/macrophage dans chaque condition) sont filtrés sur membrane nucléopore (diamètre de pore 3 µm), centrifugés à 1000 g à 23°C, lavés en PBS et comptés. Les parasites (2.10^7 par condition) sont incubés vivants dans du sérum anti-DGDG (1/1, 1/2, 1/5 et 1/10) dilué dans du milieu PBS, ou dans le sérum pré-immun (mêmes dilutions, en PBS), un anticorps monoclonal anti-SAG1 (mAb Tg05.54) ou dans le PBS seul pendant 30 min, à 37°C, sur roue orbitale. Les parasites sont lavés par deux fois dans du PBS, mis en suspension dans du milieu D10 puis mis au contact avec les macrophages pendant au moins 3 h à 37°C dans le milieu D10-Lysotracker. Après cette incubation, les lamelles sont fixées, colorés avec du Hoechst selon le protocole de l'IFI (voir plus haut) puis montées sur lames en présence de Mowiol. Les parasites phagocytés et en voie de digestion sont repérés par leur double fluorescence.

D. Mesure de l'activation de la voie classique du complément induite par l'opsonisation de *T. gondii* par les différents sérums

Suite à la lyse d'un tapis cellulaire de HFF infecté, les parasites extracellulaires sont collectés et filtrés sur membrane nucléopore (Millipore, diamètre de pore 3 µm), centrifugés à 1000 g à 23°C, lavés en PBS et comptés. Les parasites (2.10^7 par condition) sont incubés vivants dans du sérum anti-DGDG (1/1, 1/2, 1/5 et 1/10) dilué dans du PBS, ou du sérum pré-immun (mêmes dilutions, dans du PBS) et dans du PBS seul pendant 30 min, à 37°C, sur roue orbitale. Les parasites sont lavés par deux fois dans du PBS, puis remis en suspension dans du PBS. 20 µL issus de chacune des conditions sont mélangés dans du sérum humain (NHS) séronégatif pour la toxoplasmose (Etablissement Français du Sang, Grenoble) contenant le complexe protéique C1q et l'ensemble des facteurs nécessaires à l'activation de la voie classique du complément. L'ensemble parasites-sérum-NHS est incubé pendant 1 h à 37°C afin d'activer le complément. L'activité du complément subsistant dans le sérum est ensuite mesurée selon le protocole de TH50 (time of 50 % of hemolysis) (Abbal et al. 1991). Brièvement pour le test de TH50, des érythrocytes de mouton (Ellitech) sont sensibilisés avec un anticorps anti-érythrocyte (Hémolysine, BioMérieux) au 1/4000 pendant 15 min à 37°C

pour former une particule sensibilisée (antigène-anticorps). L'ensemble parasites-sérum-NHS (20 µL) est mélangé avec 3 mL de solution d'érythrocytes sensibilisés (4.10^6/mL) dilués dans du milieu DGVB++ (2,5% glucose, 0.05% gélatine, 2.5mM veronal, 72,5 mM NaCl, 0.15 mM Ca^{2+}, 0.5% Mg^{2+}). La lyse est détectée par mesure de l'absorbance de l'hémoglobine à 660 nm en fonction du temps sur un spectromètre (Safas 190DES). Le point d'inflexion définit le temps nécessaire pour obtenir la lyse de 50% de la quantité d'hématies de départ. L'activation du complément par le sérum d'intérêt diminue la lyse érythrocytaire puisque les protéines du complément nécessaires à la reconnaissance des hématies sensibilisées ont été consommées lors de l'incubation initiale des parasites avec le sérum et le NHS. Le TH50 de référence est défini dans les conditions où il n'y a ni parasite, ni sérum (ici PBS+NHS). L'activité du complément restante après cette incubation initiale est exprimée par le ratio (TH50 contrôle/TH50 échantillon) x 100.

Résultats – Chapitre I

Etude structurale de la MGDG synthase chloroplastique de plantes par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée

Article 1

Cyrille Botté, Charlotte Jeanneau, Lenka Snajdrova, Olivier Bastien, Anne Imberty, Christelle Breton et Eric Maréchal (2005)

« Molecular modeling and site-directed mutagenesis reveal critical residues for activity »

The Journal of Biological Chemistry 280(41), 34691-34701

I. Préambule

La membrane des plastes des plantes possède une composition lipidique unique. En effet, elle contient jusqu'à 80% de galactolipides (*i.e*. le MGDG et le DGDG) alors que les membranes biologiques sont majoritairement constituées de phospholipides. La synthèse du MGDG est catalysée par la MGDG synthase (MGD) qui permet le transfert d'un β-galactose provenant de l'UDP-αGal sur la position *sn-3* du diacylglycérol. Chez *Arabidopsis*, il existe 3 gènes codant pour des MGD, classées en deux familles (type A et B). Le MGDG est synthétisé en majeure partie par la MGD1 (type A) (Jarvis et al. 2001) qui est fortement exprimée dans l'ensemble des tissus durant tous les stades de développement de la plante (Awai et al. 2001). Les MGD de type B (MGD2 et MGD3) voient leur expression induite dans les tissus non photosynthétiques (racines, inflorescences) et lors des stades de développement précoce (germination, croissance du tube pollinique) durant lesquels elles contribuent à la croissance des membranes extraplastidiales (Kobayashi et al. 2004). De plus, l'expression des enzymes de type B est fortement induite lors de la carence en phosphate (Awai et al. 2001).

De nombreuses études ont été menées au laboratoire et ont pu fournir des informations sur les caractéristiques biochimiques et structurales de l'enzyme. Les MGD sont responsables de la synthèse du MGDG de type procaryotique (à partir de DAG synthétisé dans le plaste) et eucaryotique (à partir de DAG synthétisé dans le réticulum) (Miège et al. 1999) mais elles possèdent une plus grande affinité pour certaines espèces de DAG (Maréchal et al. 1994). L'enzyme possède deux sites distincts pour la fixation de l'UDP-Gal et du DAG et des cystéines à proximité de ces sites de fixation (Maréchal et al. 1995). De plus, la sensibilité à l'*ortho*-phénanthroline suggère la présence d'un cation divalent, probablement du Zinc, dans la structure de l'enzyme dont l'absence induit une baisse de l'activité enzymatique (Miège et al. 1999). La MGD1 est une protéine monotopique (*i.e*. insérée dans un seul feuillet membranaire) qui est localisée au niveau de la membrane interne de l'enveloppe du

chloroplaste (Miège et al. 1999). Il semble que l'enzyme soit présente sous la forme d'un homodimère sur la membrane interne de l'enveloppe plastidiale (Miège et al. 1999). L'ensemble de ces études nous a amené à maîtriser la production de la MGDG synthase recombinante chez *Escherichia coli*, la purification de fractions actives pour des tests d'activité par incorporation d'UDP-Gal et pour le suivi du MGDG formé (Nishiyama et al. 2003). Depuis la première caractérisation moléculaire de la MGD de concombre (Shimojima et al. 1997), notre équipe a essayé d'élucider la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Les tentatives de cristallisation, reconnues pour être difficiles dans le cas des protéines membranaires, se sont soldées jusqu'à présent par des échecs (Nishiyama et al. 2003).

Dans l'article 1 présenté dans ce chapitre, nous avons utilisé la structure résolue par cristallographie de la protéine MURG d'*Escherichia coli* en tant que patron (template) pour déterminer un modèle de structure de la MGD de plantes. En effet, MURG est une glycosyltransférase bactérienne impliquée dans la synthèse du peptidoglycane. Elle catalyse le transfert du *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) provenant de l'UDP-GlcNAc, sur le lipide I. Cette enzyme fait partie du même groupe que la MGD dans la classification des glycosyltransférases (Coutinho et Henrissat, 1999) et elle partage 20% d'identité de séquence avec les MGD (Shimojima et al. 1997, Jorasch et al. 1998 et 2000).

Un modèle de structure des MGD a été déduit par comparaison des deux protéines et prédiction de repliements. Cette approche a été combinée avec les données enzymologiques disponibles et des comparaisons phylogénétiques. Le modèle structural de la MGD a ensuite été validé par mutations ponctuelles dirigées sur des acides aminés présumés comme pertinents durant l'analyse du modèle. Ces travaux nous ont permis d'établir une structure générale de double Rossman fold pour le monomère, d'identifier les résidus impliqués dans la fixation de l'UDP-Gal, de proposer des résidus impliqués dans la fixation du DAG, le mécanisme catalytique et la zone d'association avec la membrane interne de l'enveloppe plastidiale. La structure présentée dans l'article 1 pourrait servir de modèle pour étudier les mécanismes moléculaires d'inhibiteurs pharmacologiques de l'enzyme et de répondre à certaines questions concernant l'évolution des enzymes qui synthétisent le MGDG.

II. Article (page suivante)

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/cgi/content/full/M505622200/DC1

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 280, NO. 41, pp. 34691–34701, October 14, 2005
© 2005 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

Molecular Modeling and Site-directed Mutagenesis of Plant Chloroplast Monogalactosyldiacylglycerol Synthase Reveal Critical Residues for Activity*[S]

Received for publication, May 23, 2005, and in revised form, June 29, 2005 Published, JBC Papers in Press, July 11, 2005, DOI 10.1074/jbc.M505622200

Cyrille Botté[‡1], Charlotte Jeanneau[§1], Lenka Snajdrova[§], Olivier Bastien[‡¶], Anne Imberty[§], Christelle Breton[§], and Eric Maréchal[‡2]

From the [‡]UMR 5168 CNRS-Commissariat à l'Energie Atomique-Institut National de la Recherche Agronomique, Université Joseph Fourier, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, 17 rue des Martyrs, Commissariat à l'Energie Atomique, 38054 Grenoble cedex 9, the [§]Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales-CNRS, 38041 Grenoble, and the [¶]Gene-IT, 92500 Rueil-Malmaison, France

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), the major lipid of plant and algal plastids, is synthesized by MGD (or MGDG synthase), a dimeric and membrane-bound glycosyltransferase of the plastid envelope that catalyzes the transfer of a galactosyl group from a UDP-galactose donor onto a diacylglycerol acceptor. Although this enzyme is essential for biogenesis, and therefore an interesting target for herbicide design, no structural information is available. MGD monomers share sequence similarity with MURG, a bacterial glycosyltransferase catalyzing the transfer of *N*-acetyl-glucosamine on Lipid 1. Using the x-ray structure of *Escherichia coli* MURG as a template, we computed a model for the fold of *Spinacia oleracea* MGD. This structural prediction was supported by site-directed mutagenesis analyses. The predicted monomer architecture is a double Rossmann fold. The binding site for UDP-galactose was predicted in the cleft separating the two Rossmann folds. Two short segments of MGD (⟨β2–α2⟩ and ⟨β6–β7⟩ loops) have no counterparts in MURG, and their structure could not be determined. Combining the obtained model with phylogenetic and biochemical information, we collected evidence supporting the ⟨β2–α2⟩ loop in the *N*-domain as likely to be involved in diacylglycerol binding. Additionally, the monotopic insertion of MGD in one membrane leaflet of the plastid envelope occurs very likely at the level of hydrophobic amino acids of the N-terminal domain.

Membranes of plant plastids have a unique lipid composition. Whereas phospholipids are the major polar lipids of cellular membranes, plastids contain up to 80% galactosylglycerolipids, *i.e.* 1,2-diacyl-3-*O*-(β-D-galactopyranosyl)-*sn*-glycerol (called monogalactosyldiacylglycerol or MGDG)[3] and 1,2-diacyl-3-*O*-(α-D-galactopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranosyl)-*sn*-glycerol (called digalactosyldiacylglycerol or DGDG) (1, 2). Because chloroplast thylakoids constitute the largest membrane surface in photosynthetic plants and algae, galactosylglycerides are considered as the most abundant polar lipids in the biosphere (3). MGDG is generated by transfer of a β-galactosyl moiety from a water-soluble UDP-α-D-galactose (UDP-Gal) donor onto the *sn*-3 position of the hydrophobic 1,2-diacyl-*sn*-glycerol (DAG) acceptor (4, 5). This reaction is catalyzed by a UDP-α-D-galactose:1,2-diacyl-*sn*-glycerol 3-β-D-galactosyltransferase or MGDG synthase (TABLE ONE). Plastids derive from a single primary endosymbiosis between a cyanobacterium and a eukaryotic host (6, 7). Cyanobacteria share with plastids this unique galactolipid composition (8). However, synthesis of MGDG in cyanobacteria is a two-step process (9, 10). A first transfer of a β-glucosyl moiety from a UDP-α-D-glucose (UDP-Glc) donor onto DAG generates monoglucosyldiacylgycerol. Then an epimerase converts the β-glucosyl polar head into β-galactosyl, producing MGDG (TABLE ONE).

Evolution from a two-enzyme MGDG synthesis in cyanobacteria to the one-enzyme synthesis in algae and plants is one of the major puzzling questions to understand the history of plastids. As soon as the first MGDG synthase (csMGD1) was molecularly characterized in cucumber (*Cucumis sativa*), the search for potential cyanobacterial homologues was conducted (11). However, based on the primary sequences, no gene candidate for cyanobacterial galactolipid synthesis could be identified (TABLE ONE). It is possible that the MGDG synthetic machinery is phylogenetically unrelated between cyanobacteria and eukaryotes. The picture is likely more complicated, because the MGDG synthase evolution cannot be fully traced in eukaryotes either. A collection of MGDG synthase (MGD) genes is now well established in Angiosperms, molecularly characterized in spinach (*Spinacia oleracea*) (12), thale cress (*Arabidopsis thaliana*) (13), and rice (*Oriza sativa*) (14). TABLE ONE gives a summary of what is currently known about MGDG synthases and related enzymes involved in glycolipid syntheses. MGD orthologues have been identified in the moss *Physcomitrella patens*, the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Prototheca wickerhamii*, and the red algae *Cyanidioschyzon merolae*. In the case of glaucophytes like *Cyanophora paradoxa*, whose plastids preserved a cyanobacterial peptidoglycan wall, it is not clear yet if MGDG is synthesized owing to a one-enzyme or a two-enzyme process. In eukaryotes that contain complex plastids inherited from a secondary endosymbiosis (Euglenids, Chlorarachniophytes, Cryptomonads, Haptophytes, Heterokonts, Dinoflagellates, and Apicomplexa) (7), MGD orthologues could only be found in a Heterokont, the diatom *Thalassiosira pseudonana*. In Euglenids (*Euglena gracilis*) or Apicomplexans for which we have abun-

* This work was supported by Ministère de la Recherche and by Oseo Agence Nationale de la Valorisation de la Recherche Rhône-Alpes. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Fig. 1S.

[1] Both authors contributed equally to this work.

[2] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-38-78-49-85; Fax: 33-4-38-78-50-91; E-mail: emarechal@cea.fr.

[3] The abbreviations used are: MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; DAG, 1,2-diacylglycerol-*sn*-glycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; MGD, MGDG synthase; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid; WT, wild-type; UDP-gal, UDP-galactose; MGlcDG, 1,2-diacyl-3-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-*sn*-glycerol; MGDG, 1,2-diacyl-3-*O*-(β-D-galactopyranosyl)-*sn*-glycerol; MURG, UDP-α-D-(*N*-acetyl)-glucosamine:*N*-acetylmuramyl-(pentapeptide)pyrophosphoryl-undecaprenol-4β-D-(*N*-acetyl)-glucosaminyl transferase.

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

TABLE ONE

Summary of plant plastid MGDG synthases and related enzymes involved in glycolipid syntheses in algae, cyanobacteria, and bacteria

Function	Activity experimentally detected	EC number	Molecular characterization	Name	CAZy family	Three-dimensional structure	Sugar donor	Acceptor	Product
Synthesis of MGDG in cyanobacteria (*i.e. Synechocystis*)									
Synthesis of MGlcDG	UDP-α-D-glucose: 1,2-diacyl-*sn*-glycerol 3β-D-glucosyltransferase	2.4.1.157	No gene candidate		Other than GT-28[a]		UDP-α-D-Glc	DAG	MGlcDG
Synthesis of MGDG	1,2-Diacyl-3-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-*sn*-glycerol glucosyl isomerase	5.3.1.x	No gene candidate				dn[b]	dn	MGDG
Synthesis of chloroplast MGDG in glaucophytes (*i.e. Cyanophora*)									
Synthesis of MGDG	?								MGDG
Synthesis of chloroplast MGDG in plants (*i.e. Physcomitrella*, *Spinacia*, and *Arabidopsis*), green algae (*i.e. Chlamydomonas* and *Prototheca*), and red algae (*Cyanidioschyzon*)									
Synthesis of MGDG	UDP-α-D-galactose: 1,2-diacyl-*sn*-glycerol 3β-D-galactosyltransferase	2.4.1.46	exp. and sequence similarity[c]	MGD	GT-28	This work	UDP-α-D-Gal	DAG	MGDG
Synthesis of chloroplast MGDG in Heterokonts (*i.e. Thalassiosira*)									
Synthesis of MGDG	UDP-α-D-galactose: 1,2-diacyl-*sn*-glycerol 3β-D-galactosyltransferase	2.4.1.46	Sequence similarity	MGD	GT-28		UDP-α-D-Gal	DAG	MGDG
Synthesis of MGDG in Euglenids (*i.e. Euglena*)									
Synthesis of MGDG	UDP-α-D-galactose: 1,2-diacyl-*sn*-glycerol 3β-D-galactosyltransferase	2.4.1.46	No gene candidate				UDP-α-D-Gal	DAG	MGDG
Synthesis of MGDG in Apicomplexa (*i.e. Plasmodium* and *Toxoplasma*)									
Synthesis of MGDG	UDP-α-D-galactose: 1,2-diacyl-*sn*-glycerol 3β-D-galactosyltransferase	2.4.1.46	No gene candidate		Other than GT-28[d]		UDP-α-D-Gal	DAG	MGDG
Synthesis of MGlcDG in bacteria									
Synthesis of MGlcDG	UDP-α-D-glucose: 1,2-diacyl-*sn*-glycerol 3α-D-glucosyltransferase	2.4.1.157	Exp. and sequence similarity	MGS	GT-4[e]	Model	UDP-α-D-Glc	DAG	MGlcDG
Synthesis of Lipid II peptidoglycan in bacteria and cyanobacteria									
Synthesis of lipid II	UDP-α-D-(*N*-acetyl)-glucosamine: *N*-acetylmuramyl(pentapeptide) pyrophosphoryl undecaprenol 4β-D-(*N*-acetyl)-glucosaminyl transferase	2.4.1.227	Exp. and sequence similarity	MURG	GT-28	X-ray	UDP-α-D-GlcNAc	(*N*-acetyl)muramyl (pentapeptide)-pyrophosphoryl-undecaprenol (Lipid I)	β-(*N*-acetyl)glucosaminyl (*N*-acetyl)muramyl (pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol (Lipid II)

[a] In the Synechocystis PCC 6803 complete genome, the only recorded amino acid sequence of the CAZy GT-28 family is the cyanobacterial MURG homologue.
[b] dn, does not apply.
[c] Exp., experimental evidence.
[d] No GT-28 candidate in the *Plasmodium* or *Toxoplasma* predicted open reading frames.
[e] Model from Ref. 60.

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

dant genomic information (*Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*) no MGD candidate gene could be identified using classic bioinformatic tools. Lack of MGD orthologue in these organisms is surprising, because chloroplastic galactolipid syntheses could be assessed in *Euglena* (15) or in *Toxoplasma* and *Plasmodium* (16). Because fold is more conserved than sequence by evolution, three-dimensional structure comparison is a powerful means to establish relatedness of proteins (17), even in the absence of sequence similarity. Some clues to comprehend galactolipid synthesis in cyanobacteria, glaucophytes, euglenids, or apicomplexans might therefore benefit from the knowledge of the molecular structure of Angiosperm MGD.

Synthesis of MGDG is a key process for the biogenesis of plastid membranes, particularly for thylakoid expansion (12, 13, 18). MGDG is also involved in the functional integrity of the photosynthetic machinery (19). *Arabidopsis* mutants containing half the normal MGDG amount are consistently severely affected, with defects in chloroplast development, impairment of photosynthesis, and an overall chlorotic phenotype. MGDG is the substrate for another essential lipid, DGDG (20, 21), which is exported to plasma membrane (22) and mitochondria (23) under phosphate deprivation, likely to replace missing phosphatidylcholine (24, 25). In addition to plastid membranes, MGDG synthesis is therefore essential for the biogenesis of most cell membranes. Taken together, the roles played by MGDG are vital and imply that MGD enzymes are potent targets for herbicide screening (26). Therefore, the MGD three-dimensional structure would also be an important starting point to dissect the MGD molecular mechanism and orientate the rational design of herbicide candidates.

In Angiosperms, MGDG production is restricted to the two membranes of the envelope that surrounds plastids (27–29). Our current knowledge about MGDG synthase function, structure, and membrane topology is established from the enzymatic activity of purified chloroplast envelope from spinach (30, 31), latter attributed to soMGD1 (12). In *A. thaliana*, synthesis of MGDG is catalyzed by a family of three proteins (atMGD1, atMGD2, and atMGD3) of which activity and subcellular targeting to plastid were analyzed in depth (13, 18). Unfortunately, our attempts to crystallize MGD proteins from either of these models, spinach or *Arabidopsis*, after functional expression in *Escherichia coli* (26), were unsuccessful.

Glycosyltransferases have been hierarchically classified on the basis of sequence similarities and stereochemistry of the reactions (32). Despite their number and functional diversity, glycosyltransferases fall into two major protein fold superfamilies named GT-A and GT-B, respectively (32, 33). This classification is constantly evolving and updated (CAZy classification available at afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/) (34). From sequence alignments and fold recognition, MGD enzymes are members of the GT-B superfamily. The closest homologues of MGD proteins were found to be MURG glycosyltransferases (11), with whom they are classified in the GT-28 family of the CAZy systematics. To date the GT-28 family does only contain one three-dimensional structure, *i.e.* that of *E. coli* MURG (ecMURG) (35, 36). MURG catalyzes the last intracellular step in bacterial and cyanobacterial peptidoglycan biosynthesis, *i.e.* transfer of an *N*-acetyl-β-D-glucosaminyl from a UDP-α-D-N-acetyl-glucosamine (UDP-GlcNAc) donor onto lipid 1 (Table I). For both MGD and MURG activities, a β-glycosyl moiety is transferred from a UDP-α-sugar donor to a hydrophobic acceptor, after an (α→β) inversion of the anomeric configuration of the sugar (Table I). It is therefore tempting to suppose that MGD from algae and plants derived from a MURG sequence of the ancestral symbiotic cyanobacteria.

Here, we used the ecMURG structure as a template for secondary structure comparison and fold prediction. This approach was combined with enzymological data and phylogenetical comparisons to deduce molecular models for spinach soMGD1 and *Arabidopsis* atMGD1, atMGD2, and atMGD3, focusing particularly on the active site. The soMGD1 model was then challenged and sustained by site-directed mutagenesis analyses.

MATERIALS AND METHODS

Materials—Unlabeled and ^{14}C-labeled (11.0 GBq.mmol^{-1}) UDP-Gal were obtained from Sigma and New England Nuclear, respectively. 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycerol (DAG), isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, phosphatidylglycerol, and CHAPS were purchased from Sigma.

Wild-type soMGD1 Expression Vector and Site-directed Mutagenesis via PCR—The soMGD1 sequence used in this study was inserted in NdeI-BamHI cloning site of the pET-y3a vector (12). The full-length wild-type (WT) soMGD1 refers to the coding sequence truncated of its predicted chloroplastic transit peptides (12), *i.e.* from leucine 99 to alanine 522. Mutations were introduced into the cloned soMGD1 by using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Mutations were confirmed by sequencing (Genome Express, Grenoble).

Recombinant Wild-type and Mutated soMGD1 Functional Expression in E. coli at 28 °C —Isolated colonies of transfected *E. coli* (BL21-DE3) were inoculated in LB medium (2.5 ml, 100 μg/ml carbenicillin) and grown at 37 °C. When A_{600} reached 0.5, the cell suspension was transferred to 15 ml of LB medium (100 μg/ml carbenicillin) and grown at 37 °C until A_{600} reached 0.5. Cells were then transferred to 400 ml of LB medium (100 μg/ml carbenicillin) and grown until A_{600} reached 0.5. Isopropylthio-β-D-galactopyranoside (0.4 mM) was subsequently added to induce soMGD1 expression, and the suspension was incubated at 28 °C for 4 h. Cells were harvested by centrifugation and stored at −20 °C.

Detergent Solubilization of Wild-type and Mutated soMGD1 and Purification by Hydroxyapatite Chromatography —All the operations were carried out at 4 °C. After expression of soMGD1, bacteria pellets (1 mg of proteins) were incubated for 30 min in 1 ml of medium A (6 mM CHAPS, 1 mM dithiothreitol, 10 mM MOPS-KOH, pH 7.8) containing 50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4. The mixture was centrifuged for 30 min at 7,000 × *g*. The pellets containing inclusion bodies of improperly folded and inactive soMGD1 polypeptides (26) were discarded. The supernatants, containing soMGD1 enzymes extracted from bacterial membranes by CHAPS and solubilized in mixed micelles (12, 13, 26), were loaded onto the top of a 5- × 15-mm column containing 500 μl of a Hydroxyapatite-Ultrogel (LKD) matrix equilibrated with buffer A, at a 1 ml/min flow rate (37). The column was washed with 2 ml of buffer A. The matrix-bound soMGD1 wild-type and mutated proteins were eluted with 2 ml of 500 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 in buffer A. Fractions were collected and used for enzymatic assays and protein determination.

MGDG Synthase Enzymatic Assay—Enzyme activity was assayed in mixed micelles at 25 °C (30). Phosphatidylglycerol (1.3 mM) and DAG (160 μM) dissolved in chloroform were first introduced into glass tubes. After evaporation of the solvent under a stream of argon, 300 μl of incubation medium containing 4.5 mM CHAPS, 1 mM dithiothreitol, 250 mM KCl, 250 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, and 10 mM MOPS-KOH, pH 7.8, and purified soMGD1 were added. The mixture was mixed vigorously and kept 30 min at 25 °C for equilibration of mixed micelles. The reaction was then started by addition of 1 mM UDP-[^{14}C]galactose (37 Bq.μmol^{-1}) and stopped by addition of chloroform/methanol (1:2, v/v). The lipids were subsequently extracted (38), and the radioactivity of the ^{14}C-labeled MGDG ultimately produced was determined by liquid scintillation counting. Activity is expressed in micromoles of incorporated galactose.h^{-1}.mg protein^{-1}.

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

MGD and MURG Sequences—In this study, twelve MGD and eight MURG sequences were used as reference sets for sequence analyses and structure model predictions. Each sequence is given with its accession reference in the source data base. Annotated MGD sequences from representative Angiosperms, *i.e.* eight in dicots, *S. oleracea*, soMGD1 (CAB56218); *A. thaliana*, atMGD1 (BAB12042), atMGD2 (T52269), and atMGD3 (BAB12041); *C. sativa*, csMGD1 (AAC49624.1), *Nicotiana tabacum*, ntMGD1 (BAB11980), and *Glycine max*, gmMGD1 (BAB11979); and two in the monocot *O. sativa*, osMGD1 (BAD33425) and osMGD2 (XM_481404), were obtained via the National Center for Biotechnology Information (NCBI) web site (www.ncbi.nlm.nih.gov/, February of 2005). Full-length sequence from the moss *P. patens*, ppMGD was deduced from clustered expressed sequence tag (EST) sequences (Php_AX155049, Php_dbEST_Id: 10946475_Frame-2 and Php_AX150691_Frame-3) obtained via the Moss Genome Initiative web site (www.leeds.moss.ac.uk, August of 2004). Partial sequence from the green alga *C. reinhardtii* MGD, crMGD (partial, C_21260001) was obtained via the ChlamyDB website (www.chlamy.org/chlamydb.html). Partial sequence from the non-photosynthetic green alga *P. wickerhamii*, pwMGD (partial, AAV65358) was obtained via the NCBI website. Annotated MGD sequence from the red alga *C. merolae*, cmMGD (#3974) was obtained via the Cyanidioschyzon Genome Project web site (merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/). The three MGD sequences from the diatom *T. pseudonana*, tpMGD1 (full-length; Thp_grail.23.172.1 and Thp_newV2.0.genewise.23.85.1), tpMGD2 (partial, Thp_grail.120.10.1), and tpMGD3 (partial, genewise.89.116.1) were obtained via the DOE Joint Genome Institute (genome.jgi-psf.org/thaps1/thaps1.home.html). The MURG sequences of seven bacteria, *i.e. E. coli*, ecMURG (CAA38867), *Bacillus subtilis*, bsMURG (P37585), *Mycobacterium avium*, maMURG (NP_960831), *Vibrio vulnificus*, vvMURG (Q7MNV1), *Listeria innocua*, liMURG (NP_471475), *Lactococcus lactis*, llMURG (NP_267745), and *Bartonella bacilliformis*, bbMURG (AAT38530), and one cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803, syMURG (NP_442963), were downloaded from the NCBI web site. These sequences were obtained by BLASTP similarity searches and selected for their representation of prokaryotic phylogenetic diversity.

Phylogenetic Reconstruction—MGD and MURG phylogeny was inferred from the 22 sequences described under "Materials and Methods." Distance between sequences was computed using the TULIP methods (39, 40). Alignment was achieved with the Smith-Waterman method and the BLOSUM 62 scoring matrix, using the Biofacet package from Gene-IT, France (41). We computed estimated *z*-scores with 2000 sequence shuffling (39, 42). Distance between sequences was then calculated using the *z*-score matrix (40). Tree topology was generated using the Neighbor-Joining algorithm (43).

Homology Modeling—Homology modeling of soMGD1 was based on the crystal structure of ecMURG (36) using sequence alignment described in this report. α-Helix and β-strand distributions in the MGD sequences were predicted with several secondary structure prediction servers (www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/ and www.npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin) (44, 45). Hydrophobic cluster analysis method was used to refine the sequence alignment (46). Hydrophobic cluster analysis is a graphical method based on the detection and comparison of hydrophobic clusters that are presumed to correspond to the regular secondary structure elements constituting the architecture of globular proteins. Structurally conserved regions, corresponding to secondary structure elements, were built with the COMPOSER homology modeling module (47) of the software Sybyl (Tripos Inc., St. Louis, MO). Loops were subsequently modeled from a general non-redundant protein fold data base in COMPOSER. Two protein segments (Asp^{69}–Asn^{80} and Thr^{296}–Ile^{305} in the soMGD1 sequence, called ⟨β2–α2⟩ and⟨β6–β7⟩ loops) could not be modeled and were not considered in the final model. Minor steric conflicts and local conformational problems were analyzed with PROCHECK (48), and local optimization was performed in several cycles. The final model includes hydrogen atoms and partial atomic charges derived using the Pullman procedure.

Docking of Nucleotide Sugar in the Binding Site—The UDP-Gal molecular structure was docked into the proposed active site of soMGD1 in an orientation and conformation similar to that of UDP-GlcNAc in the ecMURG crystal structure (36). Several cycles of energy minimization were performed to optimize both the geometry of the ligand and the interacting protein side chains in the binding site and its vicinity. Energy calculations were performed using the Tripos force field (49) in the Sybyl package together with energy parameters derived for carbohydrates (50) and for nucleotide sugars (51).

RESULTS

Homology of MGD Sequences throughout Evolution—The fully sequenced genome of *A. thaliana* contains three MGD proteins, atMGD1, atMGD2, and atMGD3 (18). These isoforms could be phylogenetically grouped into two types, the A-type (atMGD1) and the B-type (atMGD2 and atMGD3), having different substrate specificities with regard to DAG molecular species and different physiological functions. Awai *et al.* (13) showed that non-conserved residues could serve as signatures for A- and B-types. On a primary sequence basis, A-type is characterized by a canonical chloroplast transit peptide of ~100 amino acids, whereas the B-type exhibits a shorter addressing sequence of ~30 residues. Numerous full-length and cloned A-type MGD sequences are characterized in other Angiosperms (in *S. oleracea*, soMGD1; *C. sativa*, csMGD1; *N. tabacum*, ntMGD1; and *G. max*, gmMGD1), probably because this type is devoted to thylakoid biogenesis and is consistently highly expressed. By contrast, Awai *et al.* (13) could only trace B-types in gene fragments from unfinished plant genomes. It is now possible to describe in the sequenced genome of another plant model, *i.e. O. sativa* (rice), a second example of a multigenic family comprising an A-type (osMGD1) and a B-type (osMGD2).

We sought the occurrence of MGDG synthases in other groups and identified MGD sequences in the moss *P. patens*, ppMGD (full-length); the green algae *C. reinhardtii*, crMGD (fragment) and *P. wickerhamii*, pwMGD (fragment); and the red alga *C. merolae*, cmMGD (full-length). In the complete genome sequence of *C. merolae*, only one MGD gene is predicted. In the diatom *T. pseudonana*, three different MGD sequences could be detected, tpMGD1 (full-length), tpMGD2 (fragment), and tpMGD3 (fragment). In diatoms, plastids derive from a secondary endosymbiosis (7) and are surrounded by three membranes, the outermost being connected to the endomembranes (reticulum). Consistently, the full-length tpMGD1 exhibits a bipartite N terminus with a predicted signal peptide (targeting to endomembranes) upstream from a chloroplast transit peptide (targeting to chloroplast envelope membranes). Because we do not know the complete sequences of tpMGD2 and tpMGD3, the precise subcellular localization of tpMGD1, tpMGD2, and tpMGD3 and their physiological functions, the numbering of tpMGD sequences was set arbitrarily and is not related to Angiosperm A- or B-types.

Multiple alignments built with MGD sequences from distant species (see supplementary Fig. 1) highlight the residues conserved throughout evolution. No amino acid conservation is detected in N-terminal chloroplast-addressing sequences. Rather strong conservational pressure is noticed in most of the mature proteins, with highly conserved domains

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

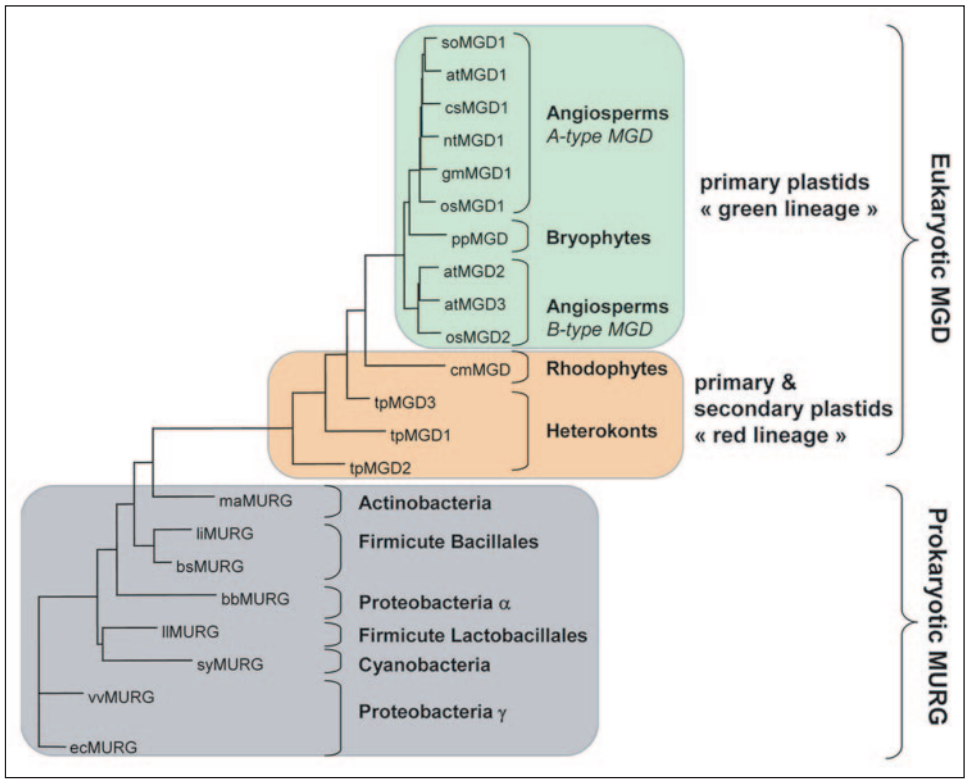


FIGURE 1. **Phylogeny of MGD and MURG.** Full-length sequences of MGDG synthases from five Angiosperms (*at*, *A. thaliana*; *cs*, *C. sativus*; *gm*, *G. max*; *nt*, *N. tabacum*; and *so*, *S. oleracea*), a Bryophyte (*pp*, *P. patens*), a Rhodophyte (*cm*, *C. merolae*), and a Heterokont (*tp*, *T. pseudonana*) and eight prokaryotic sequences of MURG enzymes (*bb*, *Bartonella bacilliformins*; *bs*, *B. subtilis*; *li*, *L. innocua*; *ll*, *L. lactis*; *ma*, *Mycobacterium avium*; *sy*, *Synechocystis* sp. PCC 6803; *vv*, *V. vulnificus*) were used to build a TULIP tree according to a previous study (40). The obtained phylogenetic tree shows related groups corresponding to MGD sequences from primary plastids of green lineage (*green*), MGD sequences from primary and secondary plastids of red lineage (*red*), and MURG sequences (gray). The MURG/MGD phylogenic discontinuity correlates with a functional discontinuity for substrates (Lipid 1/DAG and UDP-GlcNac/UDP-Gal) and the red lineage/green lineage discontinuity correlates with a functional discontinuity in used DAG molecular species (DAG of C16-C18 acyl-length/DAG of C16-C18-C20 acyl-length). In Angiosperms, the type A and B clusters also correspond to differences in enzyme specificity for DAG molecular species. MGD and MURG segments, for which local similarity profiles correlate with these discontinuities, were analyzed as possible sites for DAG binding (see supplemental Fig. 1S).

such as two G-loops (G-loop 1, SDTGGGHRASA, and G-loop 2, VL*XX*GGG(E/D)G*X*G). In our attempts to predict a MGD structure, we used the residue conservation profile observed in eukaryotic MGD sequences to identify amino acids that might be likely important for catalysis, particularly in the N-domain of the protein that diverges from the N-domain of MURG and that is likely involved in acceptor binding (see below).

Comparative Analysis of the Sequence and Substrate Evolution in MGD and MURG Phylogeny—Fig. 1 shows the phylogenetic tree built with ten MGD mature proteins identified in plants and protists and eight MURG sequences sampled in bacteria and cyanobacteria. Phylogeny was reconstructed using the TULIP tree method (39, 40). This tree recovers the A- and B-types MGD from Angiosperms in two clusters. The Bryophyte sequence (ppMGD) shares features with Angiosperm A-type. When computed with partial sequences from *C. reinhardtii* (crMGD) and *P. wickerhamii* (pwMGD), the green algae MGD proteins branch with the Angiosperms plus Bryophyte clade (not shown), indicating the close relationship between MGD of green algae and plants (Viridiplantae), in a "green lineage" subgroup. The red algal sequence from *C. merolae* (cmMGD) is set between Viridiplantae and Heterokonts, consistently with the origin of Heterokonts plastids deriving from a secondary endosymbiosis with a red alga (7). Thus, the phylogeny of MGD comprises a second subgroup, corresponding to the "red lineage" (Fig. 1). This red lineage subgroup of MGD sequences is more closely related to MURG sequences (Fig. 1).

In our study, we sought to connect structural and functional information from ecMURG with functional information from soMGD1 to deduce structural features for this enzyme. Discontinuities between MURG and red lineage MGD and between red lineage and green lineage MGD might provide precious information, particularly regarding the acceptor site. In addition to the acceptor discontinuity that characterizes MURG (Lipid 1) and MGD (DAG), there is a subtle discontinuity in the acyl-species used to synthesize MGDG in plastids from chloroplasts (plants and green algae) and rhodoplasts (red algae), *i.e.* DAG of C16-C18 acyl-length in plants (52) and green algae (53–55) and DAG of C16-C18-C20 acyl-length in red algae (55, 56). In Angiosperms, Awai *et al.* (13) had shown that A- and B-types also had different enzymological specificities regarding DAG molecular species, *i.e.* B-type enzymes exhibited a higher affinity for C18:2/C18:2 DAG than for 18:1/16:0, whereas A-type MGD did not exhibit different selectivity for these substrates. Looking back at the multiple alignment of MGD sequences (supplementary Fig. 1S), we sought therefore regions that might correlate with such phylogenic and acceptor discontinuities. Close to G-loop 1, we notice a D*X*W*X*(E/D)*XXX*WP segment of ~10 amino acids in Angiosperms and Bryophyte (supplemental Fig. 1) that shows a D*X*WKEY*X*GWP profile in Angiosperm B-type, a DLW*X*(E/D)HT-PWP profile in Angiosperm A-type, and a divergent content in red algae and Heterokonts and that appears as an extra domain when compared with MURG (see Fig. 2, amino acid segment called ⟨β2–α2⟩ loop, see below).

MGD Fold Prediction Using ecMURG as Template—The x-ray structure of ecMURG free enzyme (35) or in complex with its UDP-GlcNAc substrate (36) consists of two distinct domains similar in size, a N-domain and a C-domain, each containing a three layer α/β/α sandwich typical of a Rossmann fold. The secondary structure elements in the N-domain are numbered b1/α1/β2 . . . α5/β6, and those in the C-domain β′1/α′1/β′2 . . . α′5/β′6 (Fig. 2). Classic Rossmann folds contain conserved glycine-rich motifs, with the consensus G*X*G*XX*G. (5457 indicated G-loop 1 and G-loop 2 in Fig. 2. The N- and C-domains are joined by a short linker between β7 of the N-domain and the α-link of the C-domain, defining the floor of a deep separating cleft. The individual N- and C-domains are similar in the presence and absence of substrate; however, there is a change in the relative orientation around residue Asn[161] of ecMURG (36) (hinge position indicated in Fig. 2.) The α′6–8 helices at the C terminus of the sequence return to the N-domain floor and stabilize the double-Rossmann fold.

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

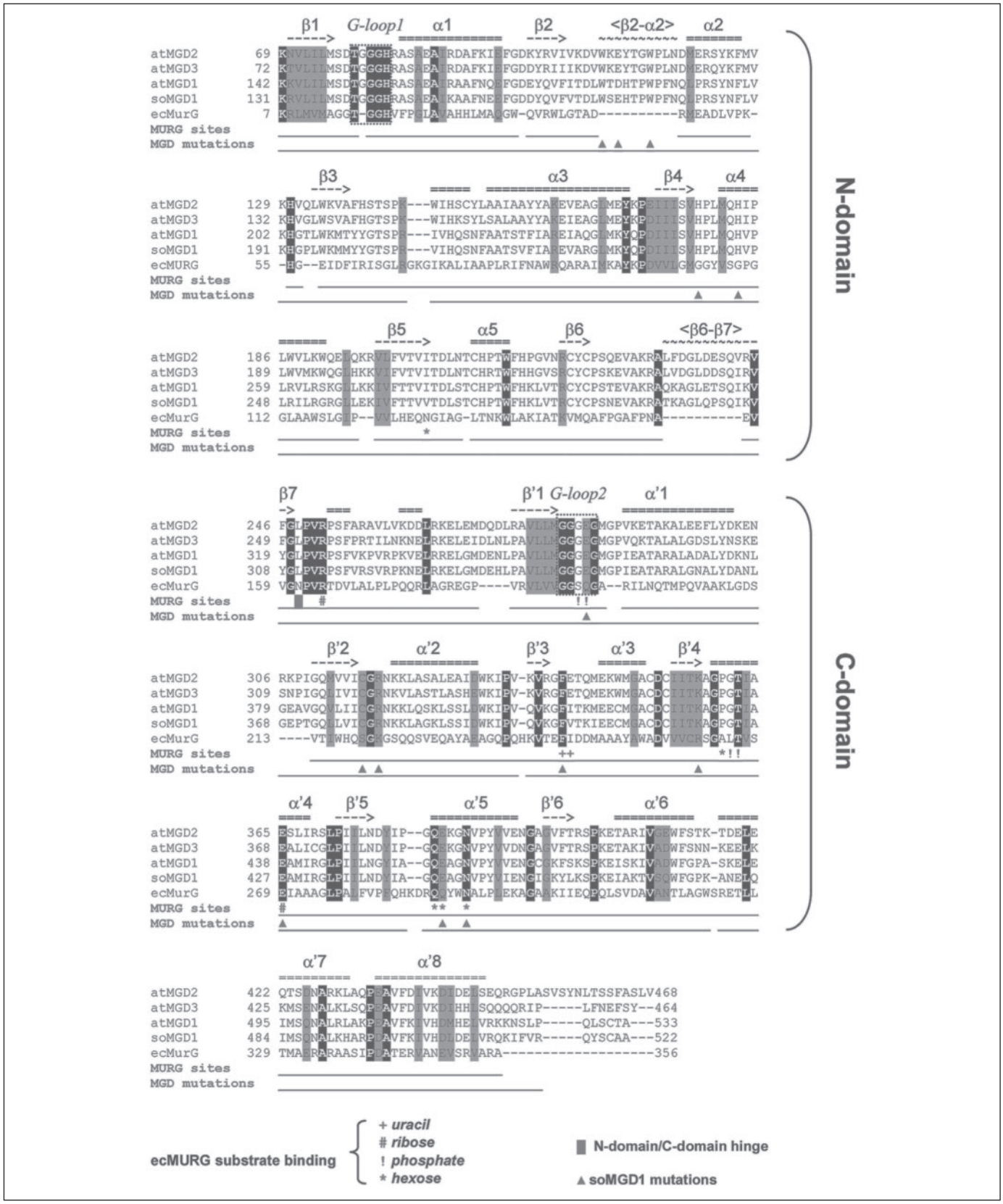


FIGURE 2. **Multiple alignment of the MGD sequences from *S. oleracea* and *A. thaliana* with the *E. coli* MURG sequence.** Sequences were aligned with ClustalW followed by manual refinement using the hydrophobic cluster analysis method. Predicted secondary structures (α-helices and β-strands) are indicated. Alignment is given starting from the first β-strand. N- and C-domains of the MURG double Rossmann fold are indicated. Gaps in aligned MURg and MGD are shown with a *gray line*. MURG hinge position between the N- and C-domains and the substrate binding sites identified from structural studies (35, 36) are indicated. *Black boxes*, conserved residues; *gray boxes*, similar residues. C-domains and the substrate binding sites identified from structural studies (35, 36) are indicated. *Black boxes*, conserved residues; *gray boxes*, similar residues. C-domains and the substrate binding sites identified from structural studies (35, 36) are indicated. *Black boxes*, conserved residues; *gray boxes*, similar residues.

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

Fig. 2 shows the multiple alignment of *E. coli* ecMURG, *A. thaliana* atMGD1, atMGD2, and atMGD3, and *S. oleracea* soMGD1, obtained with ClustalW and manually refined using hydrophobic cluster analysis method so as to optimize the alignment of putative secondary structure elements (46). The different MGD sequences are 60–70% identical. Despite a low percentage of identity with MURG (~20%), the alignment shows a strong conservation of secondary structures (α-helices and β-strands) (Fig. 2). In particular, Rossmann folds of the N- and C-domains and the corresponding G-loop 1 and G-loop 2 are strictly conserved. Two important insertions are predicted in the N-domain of MGD, between β2 and α2 (the $\langle\beta2-\alpha2\rangle$ loop) and between β6 and β7 (the $\langle\beta6-\beta7\rangle$ loop). Among residues of the C-domain of ecMURG involved in the recognition of the UDP sugar, most are conserved in aligned MGD sequences. In particular, in the ecMURG/soMGD1-aligned residues, we listed the Arg^{164}/Arg^{313} and Glu^{269}/Glu^{427} conservation at the positions involved in ribose recognition in MURG, Phe^{244}/Phe^{402} and Ile^{245}/Val^{403} at the uracil recognition position, Thr^{266}/Thr^{424} at the phosphate recognition position, and Gln^{288}/Gln^{444} and Asn^{292}/Asn^{448} at the position involved in the GlcNAc recognition in MURG (Fig. 2). Interestingly, the Gln^{289} at the position involved in GlcNAc recognition in MURG, is not conserved in MGD and is substituted by a glutamate, Glu^{445} that may be important in the specificity for galactose. Differences are also detected in G-loop 2 at the Ser^{192}/Gly^{345} and Gln^{193}/Glu^{346} positions in the ecMURG/soMGD1 alignment. G-loop 2 is known to bind phosphate. Both G-loop 1 and G-loop 2 cover the donor binding site of MURG, and the observed substitution might be also important for appropriate binding of substrates in MGD.

The multiple alignment (Fig. 2) was a basis for building a three-dimensional model of soMGD1 based on the crystal structure of ecMURG. The resulting model is shown in Fig. 3. The soMGD1 structure is built as a double Rossmann fold, with a catalytic site inside the cleft separating N- and C-domains (Fig. 3). The prediction is interrupted in the N-domain at the level the $\langle\beta2-\alpha2\rangle$ and $\langle\beta6-\beta7\rangle$ regions, two loops that do not have corresponding sequences in MGD and could not be safely built. The roots for the $\langle\beta6-\beta7\rangle$ region are oriented toward the floor of the double Rossmann fold. By contrast, the roots for the $\langle\beta2-\alpha2\rangle$ loop head toward the catalytic site. This orientation, combined with the correlation of the $\langle\beta2-\alpha2\rangle$ amino acid profile with phylogeny and DAG molecular species specificity, suggests that the $\langle\beta2-\alpha2\rangle$ loop might be involved in DAG recognition.

Structural Prediction of the Substrate Binding Pocket in soMGD1—The UDP-Gal binding site was predicted using structural information from the ecMURG:UDP-GlcNAc x-ray crystal structure (36). The donor binding site is located in the conserved proline- and glycine-rich regions within the cleft separating the N- and C-domains, on the C-domain side (Fig. 4, *A* and *B*). G-loop 1 and G-loop 2 erect symmetrically above the substrate binding pocket (Fig. 4*C*). Deep inside the cleft, the aromatic ring of a phenylalanine, Phe^{402}, is stacked on the uracil and contacts it closely (Fig. 4, *B* and *C*). The uracil is further held in place by contact from the N(3) and the O(4) atoms to the backbone of Val^{403}. Ribose interacts with Arg^{313} and Glu^{427}. The galactosyl moiety interacts with 2 amino acids of the $\alpha'5$ helix: the acidic group of Glu^{445} is hydrogen-bonded to O(3), whereas the NH_2 of Gln^{444} bridges both O(3) and O(4). Hydrophobic contacts are also established between the methane hydrogens at C(4) and C(6) that interact with Pro^{422} (Fig. 4*B*). Because of the divergence between MURG and MGD in the N-domain, where the acceptor is believed to bind, no prediction was achieved concerning DAG binding. In our model we observe enrichment in hydrophobic amino acids close to the galactose binding site that may be important for DAG docking (data not shown).

In enzymological analyzes, MGD activity was lost when the enzyme was incubated with lysine reagents (citraconic anhydride or *tert*-butoxycarbonyl-L-methioninehydrosuccidimidyl ester). MGD was protected from lysine-blocking agents by DAG, indicating that one or more important lysine residues were localized in the vicinity of the acceptor site (31). By substrate protection experiments, Maréchal *et al.* (31) further showed that one or more key histidine and cysteine residues were present in the vicinity of the DAG and UDP-Gal binding sites. Fig. 4*C* highlights the cysteine, histidine, and lysine residues predicted in the vicinity of the MGD catalytic site, *i.e.* Cys^{272}, His^{240}, His^{245}, and Lys^{419} and to a lesser extent a more remote Cys^{378}.

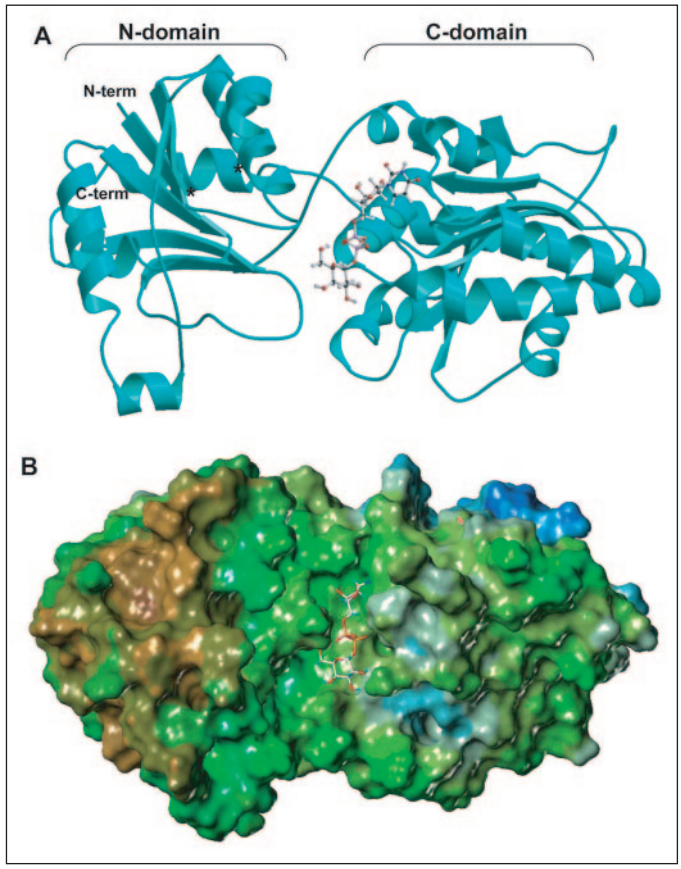


FIGURE 3. **Overall structure of the model of soMGD1:UDP-Gal complex.** *A*, *ribbon* representation of soMGD1. UDP-Gal is shown in *ball-and-stick* representation. *B*, Connolly surface of the protein. *Color* was coded with hydrophobicity potential (from *brown* for hydrophobic to *blue* for hydrophilic regions). *Stars* indicate the location of the missing $\langle\beta2-\alpha2\rangle$ loop.

MGD Site-directed Mutagenesis and Functional Assay—We mutated recombinant soMGD1 via polymerase chain reaction, in most cases by replacing residues by a small amino acid (WT → Ala) or replacing conserved acidic residues by amines (Asp → Asn, Glu → Gln, and Asp/Glu → Asn), or basic amino acids by an acidic residue (Lys → Glu and Arg → Glu). In one mutant, the GGGEG segment of G-loop 2 was deleted (G-LOOP mutant). Wild type and mutants were expressed in *E. coli* after isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside induction. Analysis of the total proteins from each strain showed the accumulation of a 45-kDa polypeptide (*solid arrow*, Fig. 5*A*) corresponding to the monomeric subunit of soMGD1 (12). The G-LOOP soMGD1 mutant had a lower apparent molecular weight (*white arrow*, Fig. 5*A*). No soMGD1 protein could be detected in non-induced controls (*control*, Fig. 5*A*). Production levels of WT and point-mutated soMGD1 polypeptides were equivalent, whereas an overaccumulation of the G-LOOP mutant was observed. In recombinant *E. coli*, polypeptides corresponding to soMGD1 are either targeted to the bacterial membranes (0.1%) where the enzyme is active, or massively routed to inclusion bodies as inactive

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

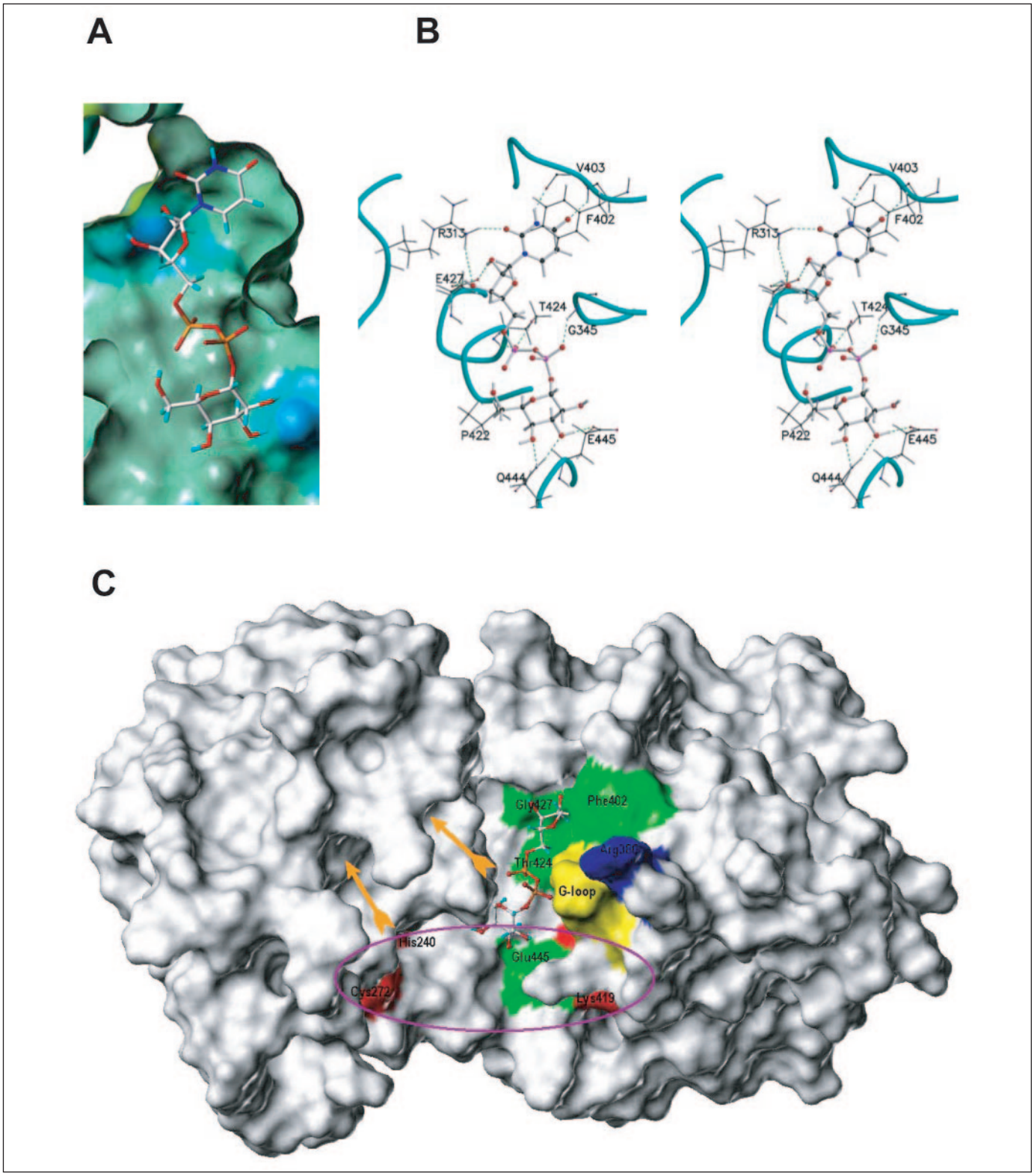


FIGURE 4. **Three-dimensional representation of soMGD1 substrate binding site.** *A*, detail view of the UDP-Gal binding pocket. Connolly surface color is coded with electrostatic potential (from *blue* for negatively charged to *red* for positively charged amino acids); UDP-Gal is represented with *stick model*. *B*, stereographic view of the UDP-Gal interaction with soMGD1 residues. Hydrogen bonds between UDP-Gal and soMGD1 residues are displayed with *green dashed lines*. *C*, general view of the vicinity of the UDP-Gal binding site. Colored amino acids were considered for mutations (*green*, amino acids predicted to bind UDP-Gal; *red*, lysine and histidine residues in the vicinity of the UDP-Gal binding site). *Yellow arrows* indicate the roots of the missing loop ⟨β2–α2⟩ that is presumed to play a role in DAG binding.

unfolded polypeptides (99.9%) (26). We solubilized membrane soMGD1 with CHAPS (30, 31, 37), a zwitterionic detergent that is also known to help MURG solubilization (58). The enzyme in mixed micelles was subsequently purified by a hydroxyapatite chromatography (12, 13, 37), and the purified fraction was used for enzymatic and protein assays and determination of specific activities (Fig. 5*B*). The

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

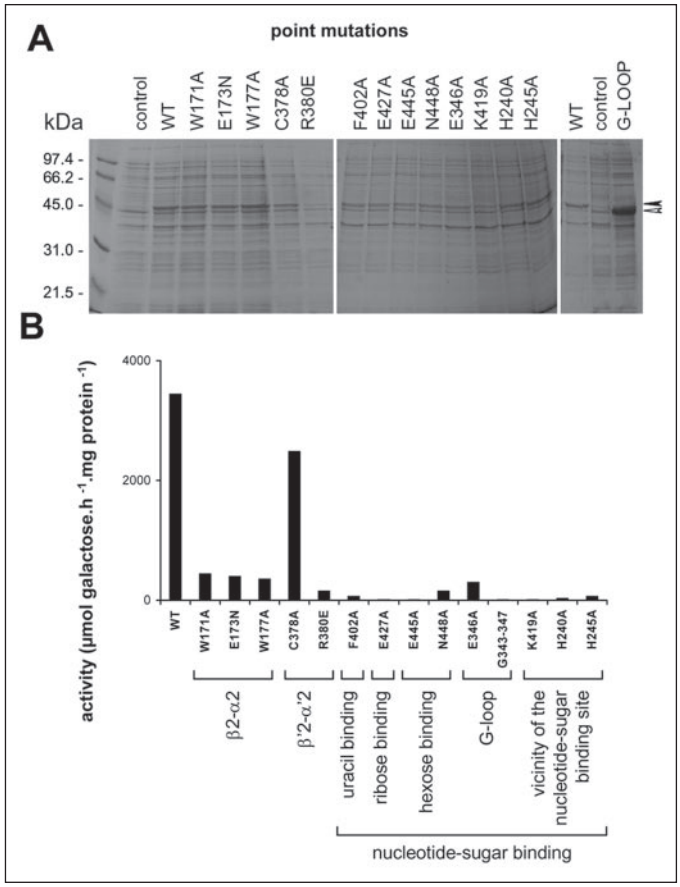


FIGURE 5. **soMGD1 point mutation analysis.** *A*, functional expression of WT and mutated soMGD1 in *E. coli*. *E. coli* cells (BL21 DE3) were transformed with pET-Y3a plasmid containing wild type (*WT*) or mutated soMGD1 genes (as indicated). Bacteria were grown at 37 °C until A_{600} reached 0.4–0.5. Expression of recombinant proteins was induced by addition of 0.4 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside at 28 °C for 4 h. 30 µg of bacteria total protein extracts was subsequently separated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie Blue staining. Control corresponds to non-induced bacteria. *Black arrows* indicate position of 45-kDa WT and mutated soMGD1. The *white arrow* indicates the G-loop-deleted form of the protein. Molecular mass markers are given in kilodaltons. *B*, galactosylation activity assays of the purified WT and mutated soMGD1 proteins. Expressed WT and mutated soMGD1 proteins were extracted from bacterial membranes and solubilized with CHAPS, a zwitterionic detergent, and subsequently purified by chromatography on hydroxyapatite-agarose as described under "Materials and Methods." Specific activity is given in micromoles of galactose incorporated per hour per mg protein.

G-LOOP deletion prevented any proper enzyme solubilization by CHAPS, thus suggesting a role of this region in accurate protein folding. For this mutant, the activity was measured in crude bacteria extracts (Fig. 5*B*). Based on activity, three classes of mutants were observed. First, C378A mutant, targeting a Cys in the vicinity of the substrate binding region was only partially affected, with ~75% of the WT-specific activity (Fig. 5*B*). Likewise, soMGD1 substituted at the level of Cys^{284}, Cys^{286}, and Cys^{415} did not show any altered activity in crude bacteria extracts (not shown) and were not analyzed further after hydroxyapatite purification. Second, the W171A, E173N, W177A, R380E, N448A, E346A, H245A, and F402A were deeply affected with only 5–15% of the WT activity. In the third group comprising E427A, E445A, K419A, H240A, and the G-LOOP soMGD1, the activity was utterly abolished (Fig. 5*B*). The complete absence of activity in the G-LOOP mutant is not surprising, knowing the deleterious impact the G-loop deletion can produce on the three-dimensional structure. In a more refined way, a single point mutation occurring within G-loop 2, at the Glu^{346} position (E346A) was sufficient to tune down the activity. From these results, the activity decreases obtained after mutation of most sites suspected of being important for MGD, sustained the predicted model presented here.

To check our hypothesis on the role of the ⟨β2–α2⟩ region in acceptor binding, kinetic parameters were determined for the native enzyme and mutant W171A. To that purpose, WT and W171A soMGD1 proteins expressed in *E. coli* membranes were extracted and solubilized with CHAPS (12, 13, 26) and further purified by hydroxyapatite-agarose chromatography (37). The purified fractions are delipidated; it is therefore possible to control the DAG and UDP-Gal availability and determine the corresponding K_m according to the surface dilution model (30, 59). Under this experimental procedure, the K_m measured for the recombinant WT protein in respect to UDP-Gal was ~6-fold higher than that measured for the chloroplast-purified enzyme (30) and was not affected by the mutation (for WT soMGD1, $K_{m\text{UDP-gal}} = 0.650 \pm 0.146$ mM; for W171A soMGD1, $K_{m\text{UDP-gal}} = 0.565 \pm 0.565$ mM). By contrast, a 2-fold increase in the K_m value for DAG was observed (for the WT, $K_{m\text{DAG}} = 0.0120 \pm 0.0028$ mol-fraction; for the W171A mutant, $K_{m\text{DAG}} = 0.0225 \pm 0.0035$ mol-fraction). The effect of the W171A mutation on the affinity for DAG supports a possible role of the ⟨β2–α2⟩ loop in the enzyme interaction with DAG.

Surface Analysis of soMGD1—Topological studies previously demonstrated the association of soMGD1 with envelope membranes (12). Using the present model, membrane association can be sought by surface analysis. Surface hydrophobic patches can be evidenced in the N-domain as clearly shown in Fig. 3*B*. Such hydrophobic regions that are found on both sides of the N-domain are expected to interact strongly with the envelope membrane.

DISCUSSION

Before ecMURG was crystallized, providing the precious structural information used in this study, biochemical analyses had given clues on MGD catalytic site, membrane topology, and oligomerization (12, 31). Using mixed micelles containing DAG, it was shown that the MGDG synthase activity from spinach chloroplast envelope was a sequential, either random or ordered, bireactant system, in which the binding of one substrate did not significantly change the specificity for the co-substrate. It was therefore possible to estimate the K_m values for UDP-galactose and various DAG species, indicating that the enzyme was able to discriminate between DAG molecular species (31). The inhibition by UDP that was competitive in regard to UDP-Gal and non-competitive in regard to DAG, supported the existence of separate sites for each substrate. Inactivation by amino acid reagents and protection by substrates indicated the existence of key lysine, histidine, and cysteine residues in the vicinity of the catalytic site (31). The occurrence of ~10 cysteine, ~15 histidine, and ~35 lysine residues in MGD sequences did not allow any simple identification of those that were most likely in the vicinity of the substrate binding sites. Sensitivity to a hydrophobic chelating agent *o*-phenanthroline and activity recovery after addition of bivalent metal cations supported the existence of one or more metal associated to the enzyme (26, 31). Using antibodies raised against soMGD1, the MGDG synthase from spinach was shown associated to membranes in a NaCl-resistant but NaOH-sensitive manner, indicating that the enzyme had no transmembrane span and was rather a "monotopic" enzyme, embedded in one membrane leaflet (12). Eventually, the kinetic of soMGD1 inactivation after γ-radiation was consistent with a functional dimer (12). In the present study, we combined the biochemical data on MGD catalytic site with the structural information learned from MURG to refine the predicted soMGD1 model.

MDG Overall Fold—Based on sequence comparisons (Figs. 1 and 2), the architecture of soMGD1 predicted in this study (Figs. 3 and 4) was

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

sustained by PCR-point mutation analyses (Fig. 5). It consists of two Rossmann folds called the N- and C-domains. Catalytic site is predicted in the cleft between the two domains. The C-domain is the most satisfactorily predicted, with identification and confirmation by point mutation of key residues for UDP-Gal binding. In the N-domain, prediction is incomplete, lacking the two ⟨β2–α2⟩ and ⟨β6–β7⟩ loops that have no counterpart in ecMURG. From phylogenetic comparisons (Fig. 1), we deduced that the ⟨β2–α2⟩ loop, which heads toward the catalytic site, may be involved in catalysis as well.

Structural Homology Reveals the UDP-Gal Binding Site—The UDP-Gal binding site was predicted using the conformation of the UDP-GlcNAc:ecMURG complex (36) (Fig. 4) and was supported by site-directed mutagenesis experiments in which identified residues proved to be important for soMGD1 activity (Fig. 5). The overall orientation of the nucleotide sugar is conserved after optimization (Figs. 3*A*, 4*A*, and 4*B*). The predicted orientation of UDP in the binding site of soMGD1 involved the same network of hydrogen bonds and stacking contacts as that determined with UDP-GlcNAc in ecMURG. Hydrogen bonds with Gln^{444} and Glu^{445} are conserved (Gln^{288} and Gln^{289} in MurG). Some differences in binding and orientation of the glucoside moiety in MURG and the galactoside moiety in MGD1 were observed. In particular, specificity for galactose might derive from the proline residue at position 422 in MGD1. This bulky amino acid does not allow the presence of an equatorial hydroxyl group at position 4 but favors the hydrophobic contact with the methane hydrogen at this position. In MURG, the equivalent amino acid is a less bulky alanine residue that allows equatorial orientation of the O(4) atom establishing an hydrogen bond with this residue backbone.

Proposed Residues of the ⟨β2–α2⟩ Loop Involved in the DAG Binding Site—No conclusive structure could be deduced for the acceptor binding site. The enrichment in hydrophobic amino acids close to the UDP-Gal binding site, as compared with MURG, might reflect the necessary environment for DAG, whose hydrophobicity is much higher than that of Lipid 1. The structure of the ⟨β2–α2⟩ loop could not be determined, but its roots head in the direction of the substrate binding pocket (Fig. 4*C*). That loop is rich in aromatic amino acids that are candidates for hydrophobic interactions and stacking. A possible role for that loop might be to maintain the acceptor or to discriminate between different acceptor species. Point mutation analyses support the importance of Trp^{171}, Glu^{173}, and Trp^{177} for activity (Fig. 5). The enzymological analysis of soMGD1 mutated at the level of Trp^{171} was undergone after membrane extraction, solubilization in detergent-lipid mixed micelles, purification, and K_m computation following the surface dilution model. The overall decrease in specific activity measured with the W171A mutant could only be attributed to a decrease of the affinity for the provided DAG (in this experiment, containing only dioleoyl-1,2-*sn*-glycerol molecular species) supporting a possible role of the ⟨β2–α2⟩ loop in the enzyme interaction with DAG. The ⟨β2–α2⟩ loop seems therefore an important component of a DAG binding region, possibly in conjunction with remote residues of the soMGD1 sequence.

Key Histidine and Lysine Residues in the Vicinity of the Active Site—We identified lysine and histidine residues in the vicinity of the broad substrate binding zone that proved essential for activity (Fig. 5). These amino acids were highly conserved in MGD sequences (supplemental Fig. 1S). Mutation of His^{240}, His^{245}, and Lys^{419} totally abolished the enzyme activity thus supporting their role in catalysis. Because these residues do not appear to be in close contact with UDP-Gal, a speculative hypothesis would be that these residues might be involved in acceptor (DAG) binding. In this study, no cysteine residue could be identified as clearly essential for activity. In particular, cysteine residues in two intriguing C*X*C motifs (CYC in the β6 and CDC in the β′4 strands) were mutated (at the level of Cys^{284}, Cys^{286}, and Cys^{415}), without any noticeable effect (not shown).

Proposed Membrane Association Domain—Previous sequence analyses tempted to explain the monotopic insertion of soMGD1 inside one leaflet of the inner envelope membrane by detected amphipathic α-helices (12). Surface hydrophobic patches have been clearly evidenced in the N-domain (Fig. 3*B*). Such hydrophobic regions that are found on both sides of the N-domain are expected to interact strongly with the envelope membrane. It is striking to note that similar hydrophobic patches have been described in ecMURG that is also acting at the membrane surface (35). The cleft region from each MGD monomer (in the vicinity of which we predicted both the UDP-Gal binding site and the roots of the ⟨β2–α2⟩ loop) is likely to face the membrane surface where the very hydrophobic DAG resides and protrude sufficiently to bind the hydrophilic UDP-Gal sugar donor.

Proposed MGD Dimerization Domain—To our knowledge, there is no report on a possible MURG dimerization as supported for MGD by radiation inactivation kinetics and cross-linking experiments (12, 26). The only described organization of two MURG proteins is in x-ray crystal where two protein molecules are observed in the asymmetric unit (35, 36). In the MGD model presented here, membrane association seems likely localized in the N-domain. Based on this membrane topology, on the geometric constraints derived from the DAG origin in the membrane and the UDP-Gal origin in the aqueous phase, it may be reasonable to suppose a dimerization involving the protruding C-domain. More investigations are required to explore this hypothesis. An additional question is also the possibility of a dimerization of MURG.

Question of the Association of MGD with Metal Cations—Association of apo-MGD with metals is experimentally supported by sensitivity of the native and recombinant enzymes to *ortho*-phenanthroline, a hydrophobic chelating agent, and the subsequent partial recovery of the activity when supplied with metals such as Zn^{2+}, Mg^{2+}, or Cu^{2+} (26, 31). Metal coordination might imply cysteine and/or histidine residues. It is still not clear whether metal coordination might be directly involved in catalysis, stability of the overall structure, and/or MGD dimerization. The present study does not provide sufficient data to support any hypothetical metal binding site(s).

CONCLUSION

Attempts to crystallize and solve the structure of plant MGDG synthases, the enzymes producing the most abundant polar lipid on earth, were unsuccessful until now. Using MURG as a template, and challenging our predictions by site-directed mutagenesis, we could obtain the overall fold of an Angiosperm MGDG synthase. As expected for a glycosyltransferase of the GT-B superfamily, the architecture of a monomer was that of a double Rossmann fold. The binding site for the UDP-Gal sugar donor was best predicted. The structure of two short segments (⟨β2–α2⟩ and ⟨β6–β7⟩ loops) that have no counterparts in MURG could not be determined. Combining the obtained model with phylogenetic and biochemical information, we extended our structural investigation to structural questions that are unique to MGD proteins, that is binding of DAG, insertion into membranes, sites for dimerization, and association to a metal. In particular, we collected evidence supporting that the ⟨β2–α2⟩ loop in the N-domain is very likely involved in DAG binding. Additionally, the monotopic insertion of MGD in one membrane leaflet of the plastid envelope occurs very likely at the level of hydrophobic amino acids superficially exposed in the N-domain. Based on these topological constraints, MGD dimerization would occur in the protruding C-domain. We could not identify any site dedicated to metal association. Future prospects include a refinement of

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

the MGD model, focusing on regions of MGD monomers, which likely play important functional roles, *i.e.* the ⟨β2–α2⟩ loop and parts of the C-domain that may be involved in protein dimerization. Based on MGD and MURG sequence similarity, the question of a possible dimerization (and association to metal) of MURG should also be addressed. Eventually, the presented structure will be a starting model to investigate possible molecular pharmacological mechanisms of MGD inhibitors and to understand the difficult question of the evolution of MGDG-synthesizing enzymes.

Acknowledgment—We thank M. A. Block for fruitful discussion.

REFERENCES

1. Douce, R., Holtz, R. B., and Benson, A. A. (1973) *J. Biol. Chem.* **248,** 7215–7222
2. Joyard, J., Block, M. A., Malherbe, A., Maréchal, E., and Douce, R. (1993) in *Lipid Metabolism in Plants* (Moore, T. S., ed) pp. 231–257, CRC Press, Boca Raton, FL
3. Gounaris, K., and Barber, J. (1983) *Trends Biochem. Sci.* **8,** 378–381
4. Ferrari, R. A., and Benson, A. A. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* **93,** 185–192
5. Neufeld, E. F., and Hall, C. W. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14,** 503–508
6. Archibald, J. M., and Keeling, P. J. (2002) *Trends Genet.* **18,** 577–584
7. Keeling, P. J., Archibald, J. M., Fast, N. M., and Palmer, J. D. (2004) *Science* **306,** 2191
8. Joyard, J., and Douce, R. (1987) in *The Biochemistry of Plant Lipids: Structure and Function* (Stumpf, P. K., ed) Vol. 9, pp. 215–274, Academic Press, New York
9. Feige, G. B., Heinz, E., Wrage, K., Cochems, N., and Ponzelar, E. (1980) in *Biogenesis and Function of Plant Lipids* (Mazliak, P., Benveniste, P., Costes, C., and Douce, R., eds) pp. 135–140, Elsevier-North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
10. Murata, N., and Sato, N. (1982) in *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids* (Wintermanns, J. F. G. M., and Kuiper, P. J. C., eds) pp. 165–168, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
11. Shimojima, M., Morikawa, S., Maeda, K., Tohya, Y., Miyazawa, T., and Mikami, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94,** 333–337
12. Miège, C., Maréchal, E., Shimojima, M., Awai, K., Block, M.A., Ohta, H., Takamiya, K., Douce, R., and Joyard, J. (1999) *Eur. J. Biochem.* **265,** 990–1001
13. Awai, K., Maréchal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., and Joyard, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 10960–10965
14. Qi, Y. H., Yamauchi, Y., Ling, J. Q., Kawano, N., Li, D. B., and Tanaka, K. (2004) *Planta* **219,** 450–458
15. Matson, R. S., Fei, M., Chang, S. B. (1970) *Plant. Physiol.* **45,** 531–532
16. Maréchal, E., Azzouz, N., De Macedo, C. S., Block, M. A., Feagin, J. E., Schwarz, R. T., and Joyard, J. (2002) *Eukaryot. Cell* **1,** 653–656
17. Jones, D., and Thornton, J (1993) *J. Comput. Aided Mol. Des.* **7,** 439–456
18. Maréchal, E., Awai, K., Block, M. A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., and Joyard, J. (2000) *Biochem. Soc. Trans.* **28,** 732–738
19. Pali, T., Garab, G., Horvath, L. I., Kota, Z. (2003) *Cell. Mol. Life. Sci.* **60,** 1591–1606
20. Dörmann, P., Balbo, I., and Benning, C. (1999) *Science* **284,** 2181–2184
21. Benning, C., and Ohta, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 2397–2400
22. Andersson, M. X., Stridh, M. H., Larsson, K. E., Liljenberg, C., and Sandelius, A. S. (2003) *FEBS Lett.* **537,** 128–132
23. Jouhet, J., Maréchal, E., Bligny, R., Baldan, B., Joyard, J., and Block, M. A. (2004) *J. Cell Biol.* **167,** 863–874
24. Härtel, H., and Benning, C. (2000) *Biochem. Soc. Trans.* **28,** 729–732
25. Härtel, H., Dörmann, P., and Benning, C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97,** 10649–10654
26. Nishiyama, Y., Hardré-Liénard, H., Miras, S., Miège, C., Block, M. A., Revah, F., Joyard, J., and Maréchal, E. (2003) *Protein. Expr. Purif.* **31,** 79–87
27. Douce, R. (1974) *Science* **183,** 852–853
28. Block, M. A., Dorne, A. J., Joyard, J., and Douce, R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258,** 13281–13286
29. Cline, K., and Keegstra, K. (1983) *Plant Physiol.* **85,** 780–785
30. Maréchal, E., Block, M. A., Joyard, J., and Douce, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **289,** 5788–5798
31. Maréchal, E., Miège, C., Block, M. A., Joyard, J., and Douce, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270,** 5714–5722
32. Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., and Henrissat, B. (2003) *J. Mol. Biol.* **328,** 307–317
33. Breton, C., and Imberty, A. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9,** 563–571
34. Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (1999) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1,** 307–308
35. Ha, S., Walker, D., Shi, Y., and Walker, S. (2000) *Protein Sci.* **9,** 1045–1052
36. Hu, Y., Chen, L., Ha, S., Gross, B., Falcone, B., Walker, D., Mokhtarzadeh, M., and Walker, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 845–849
37. Maréchal, E., Block, M. A., Joyard, J., and Douce R. (1991) *C. R. Acad. Sci. Paris* **313,** 521–528
38. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37,** 911–917
39. Bastien, O., Aude, J. C., Roy, S., and Maréchal, E. (2004) *Bioinformatics* **20,** 534–537
40. Bastien, O., Aude, J. C., Roy, S., and Maréchal, E. (2005) *BMC Bioinformatics* **6,** 49
41. Codani, J. J., Comet, J. P., Aude, J. C., Glémet, E., Wozniak, A., Risler, J. L., Hénaut, A., and Slonimski, P. P. (1999) *Methods Microbiol.* **28,** 229–244
42. Comet, J. P., Aude, J. C., Glemet, E., Risler, J. L., Henaut, A., Slonimski, P. P., and Codani, J. J. (1999) *Comput. Chem.* **23,** 317–331
43. Felsenstein, J. (1989) *Cladistics* **5,** 164–166
44. Kelley, L. A., MacCallum, R. M., and Sternberg, M. J. (2000) *J. Mol. Biol.* **299,** 499–520
45. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25,** 147–150
46. Callebaut, I., Labesse, G., Durand, P., Poupon, A., Canard, L., Chomilier, J., Henrissat, B., and Mornon, J. P. (1997) *Cell Mol. Life Sci.* **53,** 621–645
47. Blundell, T., Carney, D., Gardner, S., Hayes, F., Howlin, B., Hubbard, T., Overington, J., Singh, D. A., Sibanda, B. L., and Sutcliffe, M. (1988) *Eur. J. Biochem.* **172,** 513–520
48. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26,** 283–291
49. Clark, M., Cramer, R. D. L., and van der Openbosch, N. (1989) *J. Comput. Chem.* **10,** 982–1012
50. Imberty, A., Bettler, E., Karababa, M., Mazeau, K., Petrova, P., and Pérez, S. (1999) in *Perspectives in Structural Biology* (Vijayan, M., Yathindra, N., and Kolaskar, A. S., eds) pp. 392–409, Indian Academy of Sciences and Universities Press, India
51. Petrova, P., Koca, J., and Imberty, A. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121,** 5535–5547
52. Heinz, E. (1977) in *Lipids and Lipid Polymers* (Tevini, M., and Lichtenthaler, H. K., eds) pp. 102–120, Springer Verlag, Berlin
53. Janeiro, D. R., and Barnett, R. (1981) *J. Lipid Res.* **22,** 1119–1125
54. Sato, N., Tsuzuki, M., and Kawagushi, A. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1633,** 27–34
55. Sanina, N. M., Goncharova, S. N., and Kostetsky, E. Y. (2004) *Phytochemistry* **65,** 721–730
56. Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlerstein, D., and Bigogno, C. (2000) *Biochem. Soc. Trans.* **28,** 740–743
57. Baker, P. J., Britton, K. L., Rice, D. W., Rob, A., and Stillman, T. L. (1992) *J. Mol. Biol.* **228,** 662–671
58. Crouvoisier, M., Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1999) *FEBS Lett.* **449,** 289–292
59. Deleted in proof
60. Edman, M., Berg, S., Storm, P., Wikstrom, M., Vikstrom, S., Ohman, A., and Wieslander, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 8420–8428

Downloaded from www.jbc.org at CEA CENG -USA: DIST/UDG FRANCE on October 30, 2007

Résultats - Chapitre II

Sélection d'inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis* et caractérisation de leurs bioactivités sur modèles d'eucaryotes photosynthétiques (*Arabidopsis*, *Chlamydomonas*) et Apicomplexa (*Toxoplasma*)

I. Introduction

Chez les plantes, les membranes de l'enveloppe qui limite le plaste contribuent à la biogenèse de cet organite, réalisant la synthèse de la majeure partie des lipides plastidiaux, en particulier les galactolipides (Joyard *et al.,* 1983). Comme nous l'avons décrit dans la partie bibliographique de ce mémoire, la synthèse du MGDG est catalysée par une UDP-galactose:1,2-diacylglycérol 3-β-D-galactosyltransférase (EC 2.4.1.46), appelée aussi MGDG synthase :

1,2-diacylglycérol + UDP-galactose → UDP + 1,2-diacyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-*sn*-glycérol

Du fait que 80% des lipides plastidiaux soient des galactolipides et que la synthèse de l'ensemble des galactolipides repose sur celle du MGDG, qui est l'unique substrat de synthèse du DGDG, la famille multigénique des MGDG synthases apparaît comme essentielle à la biogenèse plastidiale. Elle est par conséquent vitale pour les plantes. Un mutant d'*Arabidopsis*, dont un seul gène de la famille multigénique est invalidé (atMGD1), présente un phénotype spectaculaire, puisque la taille de la plante est très réduite (quelques millimètres) et sa subsistance n'est possible qu'avec un apport permanent en glucose (Kobayashi et al. 2007). Ce mutant ne présente une défection complète de son appareil photosynthétique entraînant un phénotype albinos et une perte de la croissance photoautotrophique. Le phénotype du mutant *mgd1* montre que, malgré l'existence d'une famille multigénique de MGDG synthases, il n'existe pas de phénomène de compensation par atMGD2 et / ou atMGD3. Un inhibiteur de l'activité MGDG synthase, en particulier de l'isoforme MGD1, constituerait par conséquent un herbicide, dont le spectre de bioactivité pourrait aller des plantes aux algues possédant des orthologues de MGD1.

Les Apicomplexa possèdent eux aussi un plaste issu d'une endosymbiose secondaire. La synthèse d'une classe de glycolipides présentant des propriétés chromatographiques indiscernables du MGDG (notée MGLL pour monogalactolipid-like lipid) a été mesurée chez

ces parasites et notamment chez le parasite apicomplexe modèle, *Toxoplasma gondii* (Maréchal et al. 2002). Bien qu'aucun gène de séquence similaire à la MGDG synthase végétale n'ait été à ce jour détecté chez ce parasite, la réaction de synthèse du MGDG qui a été mesurée nécessite le même substrat que chez l'homologue végétal, l'UDP-Gal. De plus, cette synthèse partage des caractéristiques enzymatiques avec celles de la MGDG synthase : une inhibition par l'EDTA et le Zn^{2+} et une activation par le Mg^{2+} (Maréchal et al. 2002). Il a donc été supposé qu'à l'instar des plantes, la synthèse du MGDG serait une activité vitale pour les parasites apicomplexes et en particulier pour *Toxoplasma gondii*.

A l'origine des travaux de thèse décrits dans ce manuscrit, l'équipe d'Eric Maréchal s'était engagée dans:

- le développement de méthodes de purification de la MGDG synthase recombinante sous forme active ;
- la mise au point d'un test miniaturisé afin d'identifier des inhibiteurs aux propriétés herbicides et/ou antiparasitaires par criblage automatisé à haut débit.

Dans un premier temps, ce chapitre présentera succinctement les travaux réalisés pour identifier les inhibiteurs de la MGDG synthase. Nous présenterons par la suite, la caractérisation des effets herbicides sur le phénotype d'une plante, *Arabidopsis thaliana*, et d'une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, puis décrirons le programme d'optimisation des molécules bioactives. Nous décrirons l'effet des molécules sélectionnées par criblage sur la prolifération de *Toxoplasma gondii* et le processus d'optimisation des structures visant à obtenir des composés plus spécifiques du parasite. Enfin, nous discuterons comment ces inhibiteurs peuvent être exploités comme outil de génétique chimique inverse, dans le but de caractériser le ou les mécanisme(s) d'action des molécules sélectionnées.

*II. Criblage pharmacologique visant à sélectionner des inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana

A. Principe du test miniaturisé permettant la mesure automatisée de l'activité MGDG synthase et de son inhibition

A l'origine du projet décrit dans ce mémoire et visant à développer des candidats herbicides, il n'existait pas d'inhibiteur qui soit spécifique de l'activité enzymatique des MGDG synthases et actif en dessous de la gamme de la centaine de micromolaire. Une recherche de nouveaux inhibiteurs a été engagée par criblage robotisé à haut débit. Cette méthode permet de systématiser la sélection d'inhibiteurs au sein d'une collection de plusieurs milliers de composés (ou chimiothèque).

Le criblage nécessite une quantité suffisante et homogène de matériel biologique sur lequel évaluer l'effet des molécules. Il nécessite également un test statistiquement robuste et miniaturisé. Les MGDG synthases de plantes (épinard, Arabidopsis) peuvent être produites sous forme recombinante après expression inductible chez *Escherichia coli*. Cependant 99% des polypeptides ainsi produits s'accumulent dans des corps d'inclusion (Shimojima et al.

1997, Miège et al. 1999, Awai et al. 2001). Après induction de l'expression, la fraction membranaire bactérienne à laquelle est associée la forme active de l'enzyme, minoritaire, est purifiée par centrifugation. La suspension de membranes ainsi obtenue est ensuite traitée par une phospholipase C non spécifique (extraite de *Bacillus cereus*). Cette phosphatase hydrolyse la tête polaire des glycérophospholipides et génère de ce fait du DAG, le substrat lipidique des MGDG synthases. Les membranes enrichies à la fois en MGDG synthase et en DAG sont homogénéisées par passage à la presse de French et enfin purifiées sur gradient de Percoll.

Les fractions ainsi préparées ont été évaluées pour la mesure de l'activité MGDG synthase (voir Matériel et Méthodes). Du fait que ces fractions sont constituées de vésicules membranaires séquestrant à la fois l'enzyme et un de ses substrats (le DAG), il a été supposé que l'addition du cosubstrat (l'UDP-gal) devait permettre une production de MGDG dans les vésicules. Pour cette validation, les vésicules ont été incubées en présence d'UDP-[^{14}C]Gal, radiomarqué sur le galactose, et la production de MGDG radioactif dans les vésicules a été suivie au cours du temps. Des mesures complémentaires ont été réalisées en présence d'UDP, un inhibiteur non spécifique, compétitif de l'UDP-Gal, ainsi que de NEM (N-Ethylmaléimide), un réactif des cystéines à l'état réduit. Ce réactif forme une liaison covalente irréversible avec les groupements sulfhydryls (agent pontant des thiols) des MGDG synthases. Les tests ont été conduits :

- manuellement au laboratoire, avec mesure du MGDG radiomarqué produit après extraction de phase (voir Chapitre 1 des résultats) ;
- automatiquement, au format microplaque, avec mesure du MGDG radiomarqué séquestré dans les vésicules capturées par filtration. La Figure 1 montre un exemple de mesure après mise en œuvre du test miniature, permettant de déterminer une IC50 (IC50 ou CI50, concentration d'inhibiteur pour laquelle l'activité est réduite de moitié).

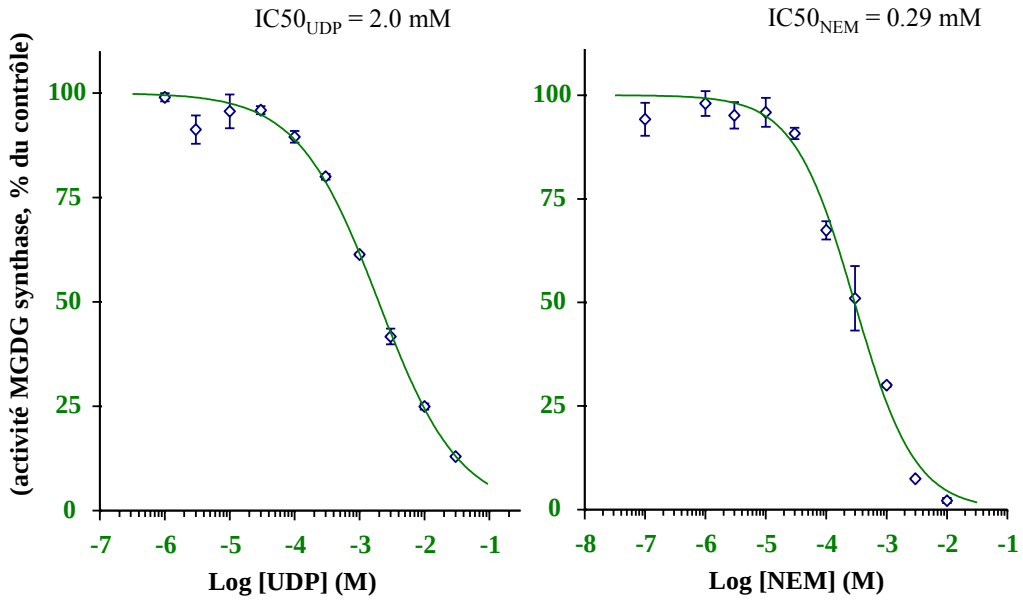


Figure 1 : Mesure de l'IC50 de l'UDP et du NEM sur l'activité de la MGDG synthase mesurée à l'aide du test miniature mis au point par le laboratoire et la société CEREP (Reuil-Malmaison, France). Suivant ce test, l'UDP possède une IC50 de 2 mM et le NEM une IC50, de 290 µM.

Le procédé mis au point pour la miniaturisation du test de mesure d'activité a par la suite été protégé par un brevet mondial (Maréchal et al. 2000).

B. Criblage primaire automatisé et identification de molécules inhibitrices de la MGDG synthase d'*Arabidopsis thaliana*

Suite à la mise au point du test miniaturisé, un protocole de mise en œuvre pour criblage à haut débit (ou high throughput screening, HTS) a été élaboré au sein de la compagnie CEREP. L'objectif était de tester un chimiothèque de 23360 composés en microplaques, avec un point de réaction par composé, chaque microplaque de 96 puits contenant 80 composés. Les colonnes 1 et 12 de chaque microplaque sont vides et permettent ainsi de caractériser le test et de valider les résultats obtenus en y déposant du DMSO (pour les contrôles négatifs) ou de l'UDP (pour les contrôles positifs ; compétiteur de référence à la concentration finale de 3.3 mM). Ainsi, la mise en œuvre a nécessité 292 microplaques de 96 puits, soit 28032 mesures de l'activité MGDG synthase (voir Figure 2).

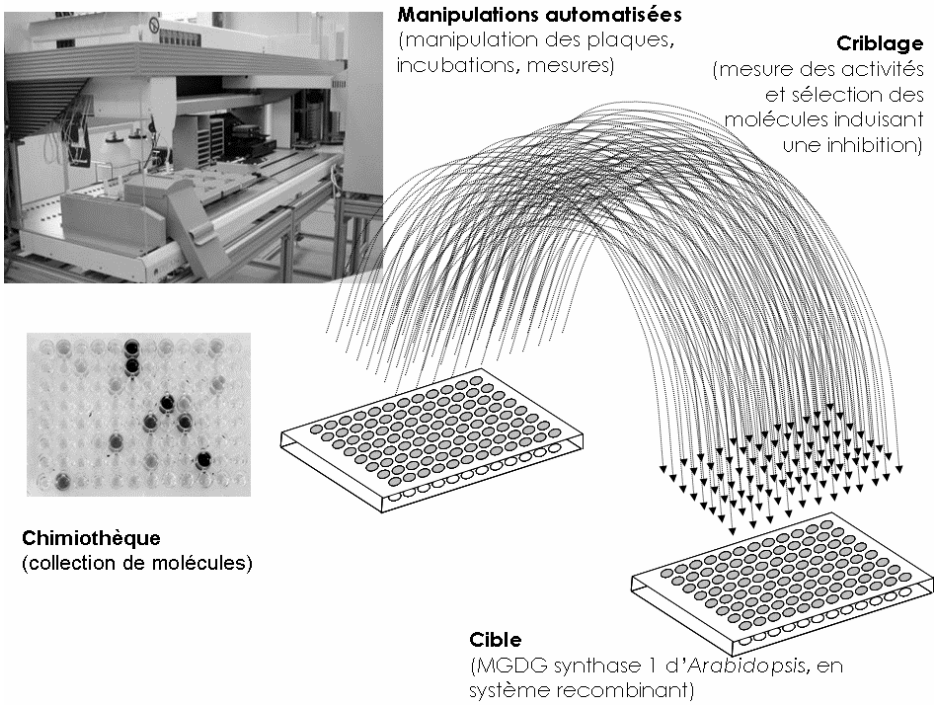


Figure 2 : Principe du criblage automatisé à haut débit, permettant la sélection de composés inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana* (atMGD1), suivant un test d'activité au format des plaques de 96 puits.

On appelle « bioactivité », l'effet porté par une molécule sur une cible biologique donnée. Ici, une molécule est dite bioactive lorsqu'elle inhibe l'activité de synthèse du MGDG dans les conditions de mesure. Sur ce critère, treize composés ont été sélectionnés à l'issue du criblage primaire (Figure 3). Ces premiers résultats ont été consolidés par un criblage secondaire de 40 analogues structuraux des premiers composés identifiés. Sur ces quarante molécules testées, cinq ont été retenues et validées au laboratoire. L'inhibition mesurée n'excède pas 50 % de l'activité mesurée en condition contrôle. Parce que la suspension membranaire utilisée au cours du criblage, a été obtenue par choc osmotique et homogénéisation à haute pression, elle est composée de vésicules membranaires fusionnées, dites « inside-out », avec 50 % de MGDG synthase distribuée vers le lumen des vésicules et donc peu accessible aux molécules, et 50% de MGDG synthase accessible en surface des vésicules. Dans ces conditions, 50% d'inhibition apparente correspond à 100% d'inhibition de MGDG synthase accessible. La mesure de l'inhibition a été améliorée en favorisant la déstructuration des membranes (en ajoutant du diacylglycérol exogène, des détergents, du phosphatidylglycérol). En accord avec l'hypothèse de non perméabilité de la molécule, la perméation des membranes permet alors de mesurer une inhibition allant jusqu'à 70-90 %. Suite à cette optimisation de mesures, deux molécules ont finalement été retenues pour être testées *in vivo* sur plantes, algues vertes et *Toxoplasma gondi :* l'une, avec une IC50 apparente de 12 µM (appelée dans ce manuscrit DB-BE-PDB) et l'autre, de 10 µM (appelée DB-E-PDB).

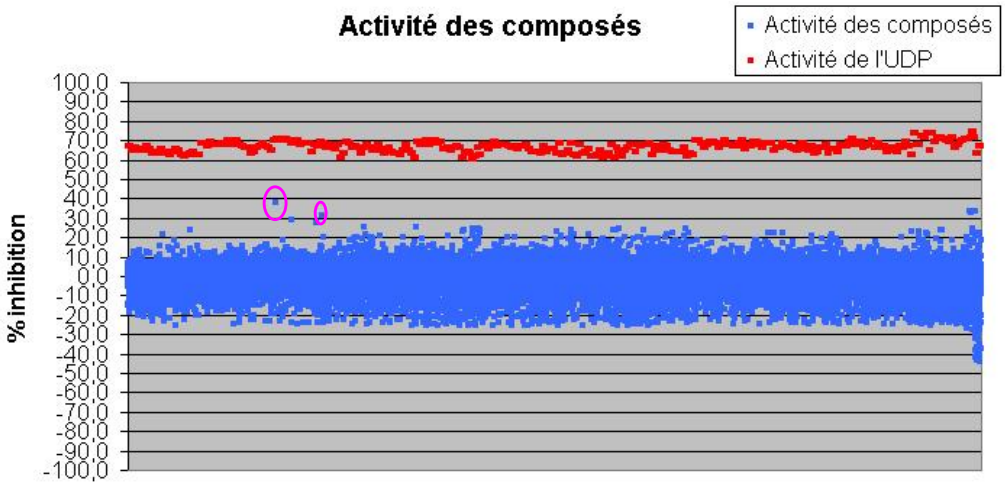


Figure 3 : Criblage primaire à haut débit (réalisé par la société CEREP) visant à sélectionner des inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana*, suivant un test de mesure d'activité en présence de vésicules lipidiques enrichies en MGDG synthase et en substrat DAG. Chaque point bleu représente le pourcentage d'inhibition provoqué par addition d'un composé de la chimiothèque (0 % = aucune inhibition) à 10 µM final, soit 23360 points. Les composés les plus actifs de ce criblage sont entourés en violet. Chaque point rouge représente l'activité de l'UDP (3.3 mM), inhibiteur compétitif de référence de la MGDG synthase. Un test contrôle en présence d'UDP est réalisé pour chaque plaque, soit 292 points.

*II. Etude de l'effet de DB-E-PDB et DB-BE-PDB, deux molécules inhibitrices de la MGDG synthase I d'*Arabidopsis *thaliana, sélectionnées par criblage à haut débit, sur des eucaryotes chlorophylliens*

A. Spectre d'inhibition des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur l'activité des MGDG synthases de plantes supérieures

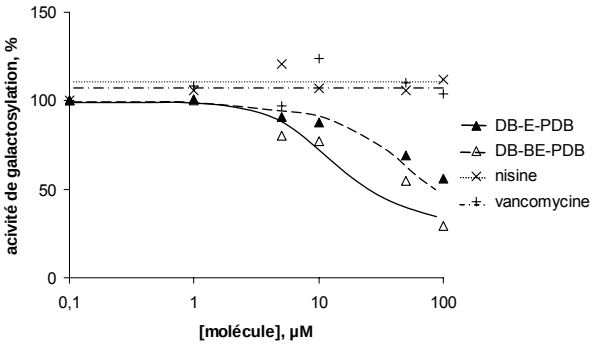
Le criblage automatisé a été réalisé lorsque j'ai débuté mes travaux de thèse. Nous avons d'abord cherché à valider le fait que l'effet-dose mesuré au cours du criblage était reproductible dans des conditions différentes de celles du test miniaturisé. Nous avons en particulier évalué l'effet des molécules sur l'ensemble des membres de la famille multigénique de la MGDG synthase car le processus de criblage avait été réalisé sur l'isoforme MGD1 d'*Arabidopsis*. Les deux composés actifs ont donc été testés sur :

- des échantillons de MGDG synthases recombinantes (atMGD1, atMGD2 et atMGD3 d'*Arabidopsis* et soMGD1 d'épinard), dans des vésicules membranaires obtenues à partir de bactéries induites (voir Matériel et Méthodes),
- des échantillons de membranes d'enveloppe chloroplastique, contenant les formes natives des MGDG synthases, fractionnées à partir de feuilles d'épinards (voir Matériel et Méthodes).

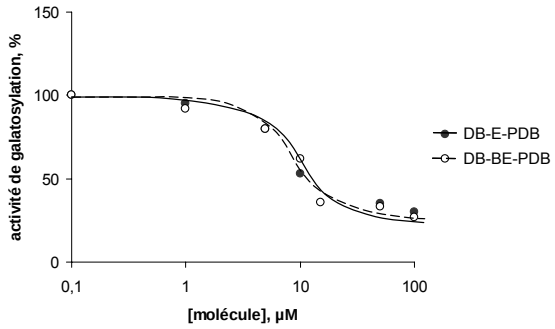
La Figure 4 résume l'étude préliminaire du spectre d'inhibition des molécules DB-BE-PDB et DB-E-PDB sur l'activité de synthèse de MGDG chez les plantes supérieures. L'orthologue de la MGDG synthase 1 chez l'épinard (soMGD1) est aussi inhibé sous forme

recombinante (Figure 4A) ainsi que sous sa forme native dans l'enveloppe chloroplastique purifiée (Figure 4B). Ce résultat illustre d'une part, que l'inhibition n'est pas spécifique de l'enzyme d'*Arabidopsis* et d'autre part, que la forme recombinante et la forme native de MGD1 sont également inhibées. Outre atMGD1, l'ensemble des isoformes de la famille multigénique d'*Arabidopsis thaliana* (atMGD2 et atMGD3) est également sensible aux inhibiteurs (Figure 4C), ce qui montre que les molécules sélectionnées peuvent avoir un effet sur l'ensemble des activités MGDG synthases d'un organisme.

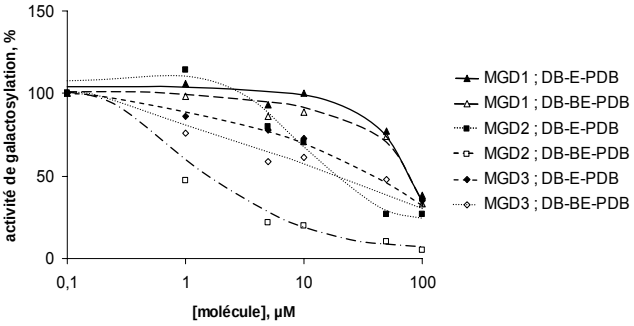
A. MGDG synthase 1 d'épinard



B. enveloppe plastidiale d'épinard



C. famille multigénique de MGDG synthases d'Arabidopsis



D. Comparaison des effets inhibiteurs

		CI50 (µM)	
	Solubilisation du DAG	DB-E-PDB	DB-BE-PDB
synthèse de MGDG de l'enveloppe chloroplastique d'épinard			
	vésicule membranaire	10	12
	micelle mixte (détergent)	50	50
activité des MGDG synthases recombinantes :			
d'épinard (Spinacia oleracea)			
soMGD1	vésicule membranaire	10	10
soMGD1	micelle mixte (détergent)	75	100
d'Arabidopsis thaliana			
atMGD1	micelle mixte (détergent)	75	75
atMGD2	micelle mixte (détergent)	10	5
atMGD3	micelle mixte (détergent)	75	25

Figure 4 : Effets des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur l'activité de synthèse du MGDG chez les plantes supérieures. Inhibition de l'activité de synthèse de la MGDG synthase 1 d'épinard (A), de membranes d'enveloppe de chloroplaste d'épinard (B) et des MGDG synthases 1, 2 et 3 recombinantes d'*Arabidopsis thaliana* (C). Les activités de galactosylation des protéines recombinantes réalisées dans cette étude (A et C) ont été mesurées après apport du substrat hydrophobe, le DAG, au voisinage de l'enzyme, par solubilisation en présence de 4,5 mM CHAPS (voir Matériel et Méthodes). Le milieu réactionnel (150 µl final) contient 20, 10, 60 et 90 µg de protéines totales de bactéries recombinantes exprimant soMGD1, atMGD1, atMGD2 et atMGD3, respectivement. (B) L'activité de synthèse du MGDG de l'enveloppe chloroplastique est mesurée en absence de détergent. Le milieu réactionnel (150 µl final) contient 10 µg de protéines totales d'une préparation d'enveloppe de chloroplaste d'épinard. Les IC50 (ou CI50) correspondent aux concentrations de molécules pour lesquelles l'activité est inhibée de 50% ; elles sont déterminées graphiquement au point d'inflexion de la chute de l'activité, mesurée en fonction du logarithme de la concentration d'inhibiteur. Toutes les mesures sont réalisées en présence de 5% DMSO. (D) Comparaison des effets inhibiteurs de synthèse de MGDG, en présence et en absence de détergent. La mesure de l'IC50 de soMGD1 dans des vésicules membranaires a été effectuée selon le test miniature automatisé lors du criblage à haut débit. La mesure de l'IC50 de l'enveloppe chloroplastique d'épinard en micelle mixte a été effectuée en présence de 4,5 mM CHAPS.

Les molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB étant en partie hydrophobes, l'addition de DMSO est essentielle. Nous observons que l'addition de détergent (nécessaire dans l'avenir pour purifier l'enzyme et analyser l'interaction entre molécules et MGDG synthases), provoque globalement une augmentation de l'IC50 (Figure 4D). Au cours du programme d'optimisation de la structure moléculaire des inhibiteurs présenté plus loin, les mesures systématiques de l'IC50 pour l'activité de synthèse du MGDG, réalisées sur suspension d'enveloppe de chloroplastes d'épinard, solubilisées par le détergent CHAPS, sont donc sensiblement supérieures (Tableau en encart sur la Figure 4D). Nous observons de plus que, malgré l'homologie des MGDG synthases avec MURG, la glycosyltransférase qui a servi de modèle pour la structure tridimensionnelle de la MGD1 (voir Chapitre I des résultats), aucun des deux peptides connus pour inhiber l'activité de MURG, *i.e.* la nisine ($CI50_{MURG}$ de 4 µM) et la vancomycine ($IC50_{MURG}$ de 18-73 µM) (Chandrakala et al., 2003), n'est effectif sur l'activité de soMGD1 (Figure 4A). *Vice-versa*, nous n'avons pas observé d'inhibition de la croissance des bactéries *E. coli* (souche DH5α) mises en culture en présence d'une concentration allant jusqu'à 500 µM de DB-E-PDB ou DB-BE-PDB, ce qui indique qu'aucun effet bactéricide par inhibition de MURG ne peut être attribué à ces molécules (données non montrées).

B. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur le développement d'*Arabidopsis thaliana*

Des concentrations croissantes de molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB (1-500 µM) ont été incorporées dans de petits volumes (400 µl) de milieu gélosé de culture d'*Arabidopsis thaliana*, dispensés en plaques multipuits translucides. Après ensemencement de trois graines par puits, la germination et le développement précoce ont été observés pendant plusieurs semaines. Chaque expérience a été reproduite 8 fois (24 graines par condition). La Figure 5 montre que dans le cas de DE-E-PDB, l'addition de la drogue provoque un retard de croissance d'autant plus important que la concentration en drogue augmente, avec une inhibition totale de la germination et de la pousse à 500 µM (100 % des graines ensemencées) (Figure 5, puits 500). A 100 µM, les graines germent mais meurent après 20 jours de culture (75 % des graines ensemencées) (Figure 5, puits 100). Après 27 jours, 25 % des plantes cultivées sur 10 µM de DE-E-PDB se nécrosent. Les plantules témoins cultivées en présence de DMSO n'ont pas de retard de croissance. Pour l'inhibition de la croissance des plantules, une IC50 est définie par le diamètre des plantules à 12 jours, soit pour DE-E-PDB, une IC50 de 100 µM. Bien que l'hydrophobicité de DE-BE-PDB soit plus importante, ce qui rend difficile sa solubilisation en milieu solide, un effet herbicide à forte concentration est observé, mais avec une IC50 >>200 µM.

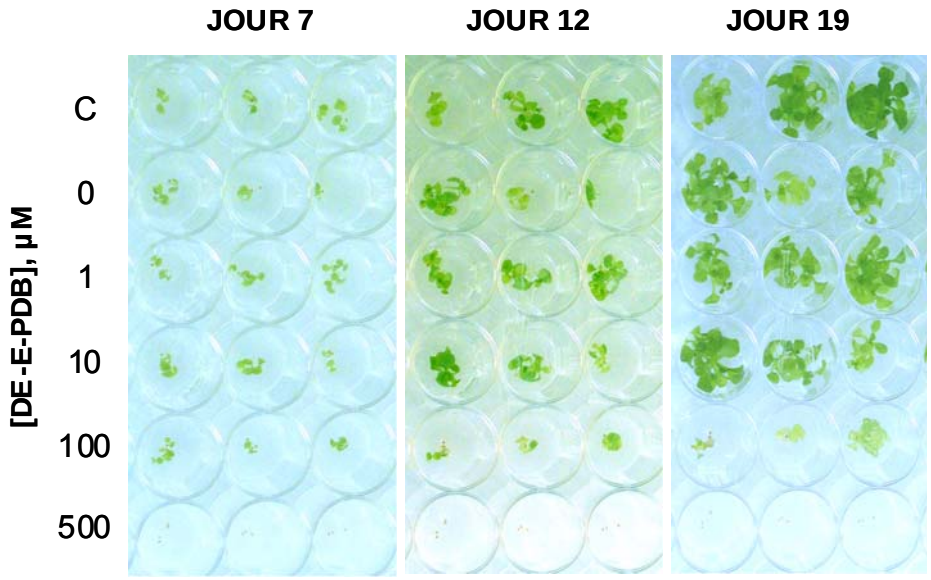


Figure 5 : Germination et développement précoce de plantules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées en présence de la molécule DE-E-PDB. Des graines d'*Arabidopsis thaliana* Columbia ont été stérilisées et ensemencées sur milieu gélosé (400 µl) dispensé sur microplaques. Après vernalisation à 4°C pendant 4 j dans l'obscurité, les plants ont été mis en culture en chambre humide, à 20°C (12 h lumière / 12 h obscurité) et observés sur une période de 20 jours après transfert. Les graines ont été plantées sur milieu MS sans additif (contrôle, C), avec 1% de DMSO (0) ou 1, 10, 100, et 500 µM de molécule DE-E-PDB diluée dans 1% DMSO, comme indiqué.

Ces résultats indiquent donc que les molécules identifiées par criblage à haut débit comme étant des inhibiteurs de l'activité galactosyltransférase de la MGDG synthase *in vitro,* possèdent des propriétés herbicides sur *Arabidopsis thaliana*.

C. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur le développement de *Chlamydomonas reinhardtii*

Afin d'évaluer l'étendue du spectre d'action des inhibiteurs de la MGDG synthase, nous avons cherché à évaluer leur action sur le phénotype de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii.* Cette algue verte possède l'ensemble des enzymes de synthèse des galactolipides, en particulier les enzymes homologues des MGDG synthases de plantes supérieures (voir Chapitre 1 des résultats). Des concentrations croissantes des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB (1-500 µM) ont donc été incorporées dans du milieu gélosé de culture de *Chlamydomonas reinhardtii* dispensé en plaques multipuits translucides (voir Matériel et Méthodes). Chaque expérience a été dupliquée. La Figure 6 montre que dans le cas de DE-E-PDB, l'addition de molécule provoque une inhibition de la croissance. Un effet algistatique similaire est observé en présence de DE-BE-PDB (résultat non montré).

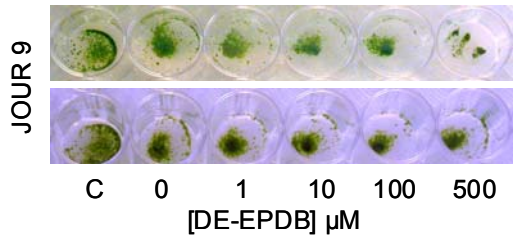


Figure 6 : Croissance de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* cultivée en présence de la molécule DE-E-PDB. Un volume de 10 µl d'une suspension de *Chlamydomonas reinhardtii* a été déposé sur milieu gélosé (400 µl) dispensé sur microplaques. Après mise en culture à 20-22°C en lumière continue, les plages de croissance ont été observées sur une période de 9 jours après dépôt. Les algues ont été cultivées sur milieu TAP gélosé sans (C) ou avec 1% de DMSO (0) et 1, 10, 100, et 500 µM de molécule DE-E-PDB diluée dans 1% DMSO, comme indiqué.

Comme pour les systèmes modèles de plantes supérieures, l'inhibition de l'activité galactosyltransférase semble corrélée à une inhibition de la croissance de cette algue verte.

III. Caractérisation de l'action des inhibiteurs de la MGDG synthase sur le parasite Toxoplasma gondii *(et Apicomplexes apparentés)*

A. Etudes préliminaires de l'effet des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB à forte concentration (100 µM) sur le développement de *Toxoplasma gondii*

Afin de déterminer si les inhibiteurs de la MGDG synthase végétale possédent un effet sur le phénotype et/ou le développement de *T. gondii*, une analyse préliminaire a été engagée en traitant des parasites pendant 1 h avec les composés DB-E-PDB et DB-BE-PDB puis en les mettant au contact de fibroblastes humains. L'effet des molécules a été observé 12 h plus tard en microscopie optique à contraste de phase (Figure 7).

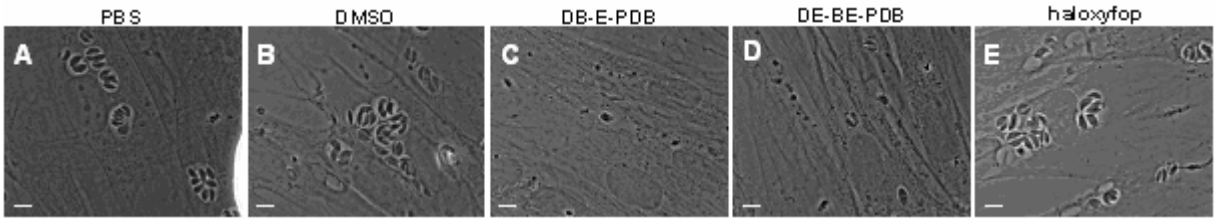


Figure 7 : Invasion et division intracellulaire de *Toxoplasma gondii* en présence de DE-E-PDB et de DE-BE-PDB. Des toxoplasmes prétraités pendant 1 h avec chacun des composés, ont été mis en présence de cellules HFF, à confluence (voir Matériel et Méthodes). Après 12 h de culture à 37°C, les cellules infectées ont été observées en contraste de phase au grossissement x100. (A) Contrôle PBS. Les parasites sont prétraités en présence de milieu PBS. (B) Contrôle DMSO. Les parasites sont prétraités en présence de 0,1% DMSO en solution dans du milieu PBS. (C) Parasites traités par le DE-E-PDB. (D) Parasites traités par le DE-BE-PDB. Les parasites sont prétraités en présence des molécules DE-E-PDB et DE-BE-PDB, inhibitrices des MGDG synthases de plantes. Les deux molécules sont solubilisées dans du DMSO, 0,1% dans du PBS. Très peu de parasites intracellulaires sont observables. Aucune rosette n'est détectée. (E) Parasites traités par l'haloxyfop. Les parasites sont prétraités en présence d'haloxyfop (300 µM), inhibiteur de l'acétyl-CoA-caroxylase de l'acide gras synthase plastidiale de plantes. Cet herbicide est solubilisé par du DMSO, 0,1% dans du milieu PBS. Barre d'échelle : 1 µm.

La Figure 7 présente des champs représentatifs de l'ensemble des tapis cellulaires. Les parasites témoins préincubés pendant 1 h dans du PBS se sont développés normalement en formant de multiples rosettes contenant 8, 16, voire 32 parasites par vacuole. Le prétraitement des parasites par la drogue DE-E-PDB (100 µM en solution de PBS, 0,1% DMSO) est délétère pour le toxoplasme : très peu de parasites intracellulaires sont détectés et les quelques vacuoles observées ne contiennent pas plus d'un parasite (Figure 7C). Un effet similaire de la drogue DB-BE-PDB, bien que moins prononcé, est aussi observé (Figure 7D).

A titre de contrôles, nous avons vérifié que le traitement des parasites par 0,1% DMSO n'était pas préjudiciable à l'invasion et au développement intracellulaire (Figure 7B) et que l'herbicide haloxyfop (300 µM) décrit comme antiparasitaire après plusieurs cycles d'invasion/multiplication (Zuther et al., 1999 ; Jelenska et al., 2002), n'affectait pas le développement de *T. gondii* au cours d'une invasion primaire (Figure 7E). Ces résultats montrent que les inhibiteurs de la MGDG synthase ont des effets drastiques sur le développement de *T. gondii in vitro*.

Nous avons par ailleurs effectué des comptages du nombre de vacuoles observées ainsi que du nombre de parasites par vacuoles, quand celles-ci étaient présentes, après traitements des parasites par les drogues utilisées à 100 µM, en comparaison avec des parasites non traités. D'après ces numérations préliminaires, le composé le plus efficace (DB-E-PDB) aurait tendance à réduire le nombre de vacuoles de 80 à 90% par rapport au contrôle et le second (DB-BE-PDB) engendre une réduction de 60 à 70%, avec un nombre de parasites n'excédant jamais deux par vacuole. Les parasites traités en contrôle avec du DMSO, dans des concentrations similaires, ne montrent aucune altération du nombre de vacuoles et de parasites par vacuoles. Le prétraitement de parasites par les drogues utilisées à 100 µM semble donc affecter la capacité d'invasion du parasite et peut-être même sa faculté de division par des mécanismes encore inconnus.

Les effets observés sur le développement de *T. gondii* par un traitement avec le composé DB-E-PDB nous ont amené à penser que la drogue aurait pu induire des changements majeurs dans la structure de parasite. En collaboration avec R. Mondragon (CINEVSTAV, Mexico), nous avons donc observé les parasites incubés en présence des inhibiteurs de MGDG synthase, en microscopie électronique à transmission.

La Figure 8 montre que l'ultrastructure du parasite est altérée. L'ensemble des parasites traités montre une désorganisation de la structure de leur pellicule (Figure 8B-C-D). La membrane plasmique semble se désolidariser du complexe membranaire interne (noté dans ce mémoire IMC ; Figure 8D). Sur de nombreux parasites, l'IMC forme des structures flottantes en ruban (Figure 8B) et la cellule montre des vacuoles internes. Sur certains des clichés, on peut même voir que la membrane plasmique forme des évaginations massives remplies du contenu du cytosol (Figure 8C et encart blanc). L'IMC par contre, conserve sa forme initiale.

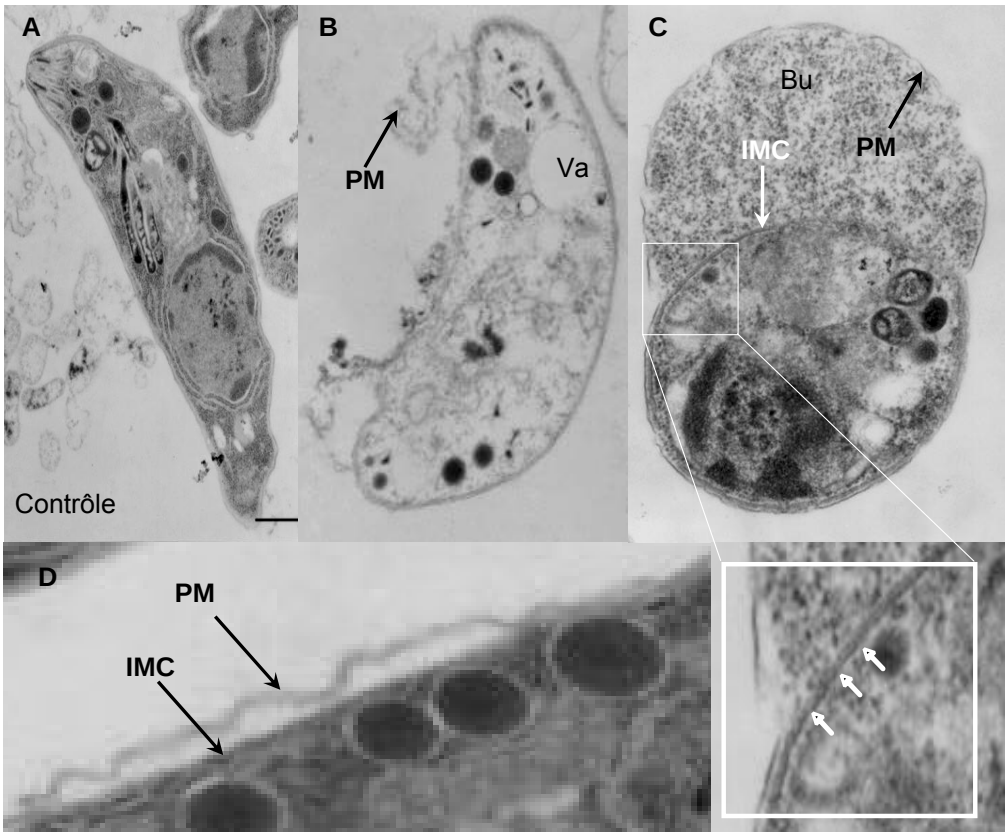


Figure 8 : Les tachyzoïtes de *T. gondii* extracellulaires prétraités par 100 µM de DB-E-PDB montrent une désorganisation de la pellicule. Par rapport au contrôle (A), les parasites prétraités (B et C) par 100 µM de l'inhibiteur DB-E-PDB de la MGDG synthase pendant 1 h montrent une perte de la forme en croissant caractéristique de la cellule parasitaire. On observe une désolidarisation de la membrane plasmique (PM) de l'IMC (D). Celle-ci forme alors des structures en forme de rubans (flèche en B) et des vacuoles (Va) à l'intérieur du parasite. Le contenu du cytosol se vidange à l'intérieur de ces structures étirant la membrane plasmique (C), qui forme alors des évaginations massives (Bu). Ce phénomène n'altère pas l'intégrité de l'IMC (B et encart blanc) mais engendre une rupture de la membrane plasmique (encart blanc), rupture vraisemblablement liée à la mort du parasite. *Clichés en microscopie électronique à transmission réalisés par R. Mondragon (CINEVSTAV, Mexico).*

Le phénomène d'évagination de la membrane plasmique, qui se désolidarise de l'IMC, a également été décrit lorsque le parasite est traité par le glycérol (Rabjeau et al. 1997) et par la toxine α de *Clostridium scepticum* (Wichrowski et al. 2002). Il est difficile de déduire de ces observations si le phénotype observé est la conséquence directe du traitement ou bien celle de la mort du parasite. Il est néanmoins possible de conclure que le phénotype observé après le traitement est distinct des processus morphologiques observés en cas d'apoptose ou de nécrose.

B. Etudes de l'effet des molécules DE-E-PDB et DE-BE-PDB à forte concentration (100 µM) sur l'intégrité des cellules humaines HFF

L'activité galactosyltransférase inhibée par les composés DB-E-PDB et DB-BE-PDB est issue d'une voie métabolique d'origine végétale. Il est possible que ces molécules aient un

effet spécifique, parce qu'elles se lient à un site de fixation en surface de la MGDG synthase et que ce site ne se retrouve que sur des protéines de « type » végétal. Cependant, il est aussi possible que les composés DB-E-PDB et DB-BE-PDB interagissent avec d'autres « cibles » d'origine végétale et/ou animale. Dans ce dernier cas, l'effet délétère observé sur les modèles végétaux chlorophylliens (*Arabidopsis* et *Chlamydomonas*) et sur *Toxoplasma* pourrait être un phénomène non spécifique. Nous avons donc cherché s'il existait un effet toxique sur les cellules humaines et notamment, sur les fibroblastes utilisés pour la propagation des parasites.

1. Effet des molécules DE-E-PDB et DE-BE-PDB sur cellules HFF non proliférantes

Les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts) sont des cellules adhérentes qui possèdent un cytosquelette très développé, indispensable pour maintenir leurs jonctions au substrat. Nous avons mis en culture pendant 12 h et 24 h des cellules HFF jusqu'à obtention d'un tapis confluent de cellules, dans un milieu contrôle ou contenant 100 µM de molécules DB-E-PDB ou DB-BE-PDB puis nous avons observé ces cellules. Dans cette étude, nous n'avons remarqué aucun signe de cytotoxicité brutale, ni au niveau morphologique (changement de forme des cellules, décollement), ni au niveau de l'intégrité nucléaire (marquage Hoechst).

Pour affiner notre investigation sur la toxicité ou l'innocuité des inhibiteurs sur cellules humaines, nous avons étudié l'état du cytosquelette microtubulaire. Suite à chacun des traitements pharmacologiques La tubuline a été analysée par immunomarquage à l'aide d'anticorps anti-tubuline humaine tyrosinée (ou tubuline-Tyr) et anti-tubuline détyrosinée (ou tubuline-Glu). Comme précédemment rapporté par Melo et al. (2001), l'une des conséquences de la présence d'une vacuole parasitophore dans les cellules humaines est la redistribution des microtubules de la cellule hôte autour de cette vacuole (Figure 9A). Quelque soit le traitement appliqué, nous n'observons pas de perturbation majeure des stocks de tubuline tyrosinée et détyrosinée (Figure 9A) : le même type de réseau de microtubules tyrosinés (tubuline-Tyr) réparti dans la cellule hôte, au niveau des centres de nucléation situés à proximité du noyau et autour des vacuoles parasitophores, est observé quelque soient les conditions de traitement. De même, la répartition cellulaire de la tubuline détyrosinée ne semble pas altérée (Figure 9A).

L'adhésion des fibroblastes met en jeu le cytosquelette d'actine (sous forme de filaments) lié aux intégrines, protéines transmembranaires qui se lient à la matrice extracellulaire ou à un substrat synthétique, *via* certains filaments intermédiaires tels que la vinculine, au niveau de zones appelées points focaux d'adhésion (pour revue Defilippi et al. 1999). Afin d'affiner nos observations sur l'intégrité des HFF lors du traitement par les inhibiteurs DB-E-PDB et DB-BE-PDB, nous avons marqué les cellules traitées à la phalloïdine (marqueur de l'actine) ou à l'aide d'un anticorps anti-vinculine. Le traitement ne semble pas provoquer de dégradation du cytosquelette d'actine (Figure 9B) ou des points focaux d'adhésion, localisés grâce à l'anti-vinculine (Figure 9C). L'ensemble reste qualitativement semblable au phénotype observé dans les cellules contrôles.

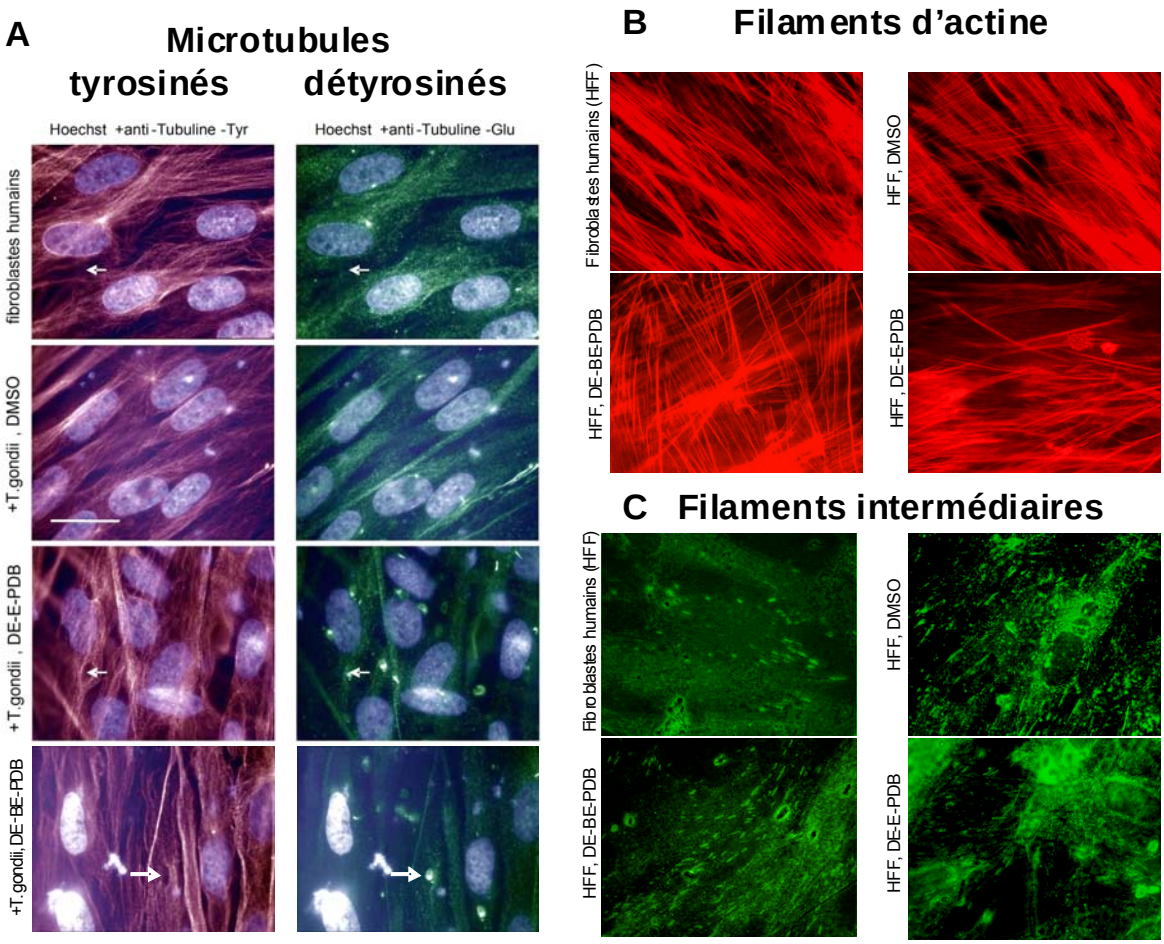


Figure 9 : Intégrité de la morphologie des fibroblastes humains (HFF) : observation du noyau et des microtubules (A), des filaments d'actine (B) et des filaments intermédiaires (C) des points d'adhésion focaux, en présence de DE-E-PDB ou de DE-BE-PDB 100 µM pendant 12h. (A) Le cytosquelette de microtubules composé de tubuline tyrosinée (rouge) ainsi que les stocks de tubuline détyrosynée (vert) ont été mis en évidence par immunofluorescence indirecte. (B) Le cytosquelette d'actine est visualisé par la phalloïdine (rouge). (C) Les zones focales d'adhésion sont visualisées par les plaques vertes grâce à l'anti-vinculine. Les cellules ont été observées en épifluorescence au grossissement x100. L'ADN cellulaire est visualisé par l'intercalant Hoechst (bleu). Barre d'échelle : 10 µm.

Dans cette étude préliminaire sur la cytotoxicité éventuelle des inhibiteurs de la MGDG synthase, les molécules DE-E-PDB et DE-BE-PDB ne semblent pas affecter l'intégrité des fibroblastes humains, sous forme non-proliférante. Du fait que les composés ont été sélectionnés pour leur bioactivité sur une enzyme de synthèse de lipides, nous avons poursuivi cette analyse sur des cellules dont la prolifération nécessite d'importants remaniements membranaires.

2. Effet des molécules DE-E-PDB et DE-BE-PDB sur cellules HFF en prolifération

Nous avons étudié la prolifération de cellules humaines lors d'un traitement par les inhibiteurs de la MGDG synthase, afin d'affiner la caractérisation d'effets cytotoxiques éventuels.

Des boites de culture dans lesquelles ont poussé des tapis confluents de cellules HFF, ont été soumises à un traitement doux à la trypsine autorisant une désolidarisation des cellules. Après arrêt de ce traitement par ajout de milieu de culture à 37°C, les cellules sont comptées et remises en culture 12 h dans de nouvelles boites de culture, jusqu'à obtention de tapis peu confluents (20 à 25 % de la surface). Ces tapis ont ensuite été traités pendant 24 h avec différentes concentrations des composés DE-E-PDB et DE-BE-PDB (100 µM, 50µ M et 25 µM) et comparés à des tapis non traités. Les résultats consignés dans le Tableau 1, regroupent les observations morphologiques faites sur les cellules ainsi que le bilan des comptages après traitements.

Contrôle (cellules non traitées)	traitement	+ DB-E-PDB	+ DB-BE-PDB
-**Tapis confluent à 90 %** de la surface de culture -**Cellules allongées**, adhérentes, ayant plusieurs points visibles d'ancrage. Les cellules sont épaisses et opaques. **-Numération : 2,49.10^6 cellules**	100 µM	-**Tapis confluent à 25 %** de la surface de culture -**Cellules à bord étiolé**, ayant peu de points visibles d'ancrage. Les cellules sont fines, translucides, avec des vacuolisations internes **-Numération : 6.10^4 cellules**	-**Tapis confluent à 85-90 %** de la surface de culture -**Cellules allongées**, adhérentes, ayant plusieurs points visibles d'ancrage, un peu plus larges que les cellules contrôle (présence d'agrégats dans le milieu) **-Numération : 2,28.10^6 cellules**
	50 µM	-**Tapis confluent à 35-40 %** de la surface de culture -**Cellules irrégulières**, avec des vacuolisations internes **-Numération : 5,4.10^5 cellules**	-**Tapis confluent à 90 %** de la surface de culture -**Cellules allongées**, sans différence apparente avec les cellules contrôles **-Numération : 2,01.10^6 cellules**
	25 µM	-**Tapis confluent à 80 %** de la surface de culture -**Cellules allongées**, un peu plus larges que les cellules contrôle. Présence de granulations internes. **-Numération : 1,17.10^6 cellules**	-**Tapis confluent à 90 %** de la surface de culture -**Cellules allongées**, adhérentes, ayant plusieurs points visibles d'ancrage. Les cellules sont épaisses et opaques. **-Numération : 2,32.10^6 cellules**

Tableau 1 : Effet des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur la prolifération de HFF. Les observations morphologiques sont consignées ainsi que les numérations cellulaires.

Contrairement à ce qui a été observé au niveau de l'aspect général du cytosquelette de tapis cellulaires à confluence, la molécule DB-E-PDB semble affecter les cellules HFF en prolifération active. La molécule DB-BE-PDB semble moins nocive sur ces cellules en

division. Du point de vue de la cytotoxicité, ces études montrent qu'à forte concentration les molécules étudiées peuvent avoir un effet sur les cellules humaines en prolifération et que l'intensité de cet effet varie avec la structure fine des composés (un seul groupement chimique varie entre les deux composés DB-E-PDB et DB-BE-PDB). Par ailleurs, ces observations montrent que l'optimisation des propriétés inhibitrices de la prolifération des toxoplasmes par synthèse de dérivés à partir du châssis moléculaire initial requiert l'analyse de l'effet inhibiteur de ces composés sur la prolifération de cellules humaines. L'amélioration d'un indice thérapeutique sommaire consiste à chercher à diminuer l'IC50 sur la prolifération de parasites et à augmenter l'EC50 sur la prolifération d'un modèle cellulaire humain en division.

C. Mesure de l'IC50 des molécules DB-E-PDB et DB-DE-PDB sur la prolifération du parasite *Toxoplasma gondii*

1. Choix et optimisation d'un test systématique de mesure d'une IC50 de molécules antiparasitaires sur le modèle *Toxoplasma gondii*

Nous avons observé que les inhibiteurs obtenus par criblage sur l'activité MGDG synthase de plante possédent des propriétés anti-parasitaires contre *T. gondii* sans pour autant définir les conditions dans lesquelles ces molécules agissaient sur le parasite. Le test classique pour mesurer l'IC50 d'une molécule toxique sur une population de parasites consiste à mesurer l'incorporation spécifique d'uracile radiomarqué ([5,6-^{3}H]uracile) par le parasite, reflétant sa prolifération (Pfefferkorn et Pfefferkorn 1977). Le coût et les déchets radioactifs que génère cette méthode ont amené le développement de tests alternatifs, colorimétriques (McFadden et al. 1997, Derouin et Chastang 1988) ou encore basés sur la mesure de fluorescence (Gubbels et al. 2003).

- Un des premiers tests colorimétriques mis au point est un test ELISA où la prolifération parasitaire est suivie grâce à des anticorps dirigés contre des parasites préalablement fixés au méthanol (Derouin et Chastang 1988).
- Une seconde méthode colorimétrique repose sur la prolifération de parasites génétiquement modifiés pour exprimer le gène de la β−galactosidase : la croissance de la population de parasites est estimée par colorimétrie en ajoutant du chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG) en tant que substrat de la β−galactosidase (McFadden et al. 1997).
- Une troisième méthode permet l'évaluation de la croissance parasitaire par mesure de la fluorescence de parasites exprimant la protéine YFP (yellow fluorescent protein) en tandem sous le contrôle des promoteurs de la tubuline et de la protéine de surface SAG1 (Gubbels et al. 2003).

La méthode par incorporation d'[5,6-^{3}H]uracile a été écartée du fait du grand nombre de manipulations prévues, de la quantité de composés radioactifs à gérer et de la multiplicité des étapes nécessaires pour la mesure finale. Il en a été de même du test ELISA qui lui aussi

nécessite de nombreuses étapes de manipulations intermédiaires pour la lecture. Ces étapes ne sont pas compatibles avec notre volonté de développer un test mis en œuvre de façon systématique.

Les deux souches utilisées pour la mise en œuvre du test colorimétrique (souche exprimant la β−galactosidase) ou du test fluorimétrique (souche exprimant la YFP) se cultivent aisément. J'ai donc élaboré des tests de suivi de la prolifération de *Toxoplasma gondii* suivant ces deux méthodes en parallèle, lors d'expériences préliminaires sur plaques 96 puits, dans un premier temps avec des gammes croissantes de parasites sur le fond des puits (2,50, 100, 2.10^2, 5.10^2, 10^3… 10^9). Le même type de test a été mis en œuvre en présence d'un tapis cellulaire confluent de cellules HFF recouvrant chaque puits, suivant le protocole développé au laboratoire et détaillé dans la partie Matériel et Méthodes. La première expérience sert alors de gamme étalon pour la seconde. Chaque test a été réalisé en trois séries de puits tripliqués.

Les résultats ont montré que la méthode fluorimétrique était peu robuste, imprécise lorsqu'il s'agissait de déterminer un faible nombre de parasites et ce malgré, l'utilisation de deux fluorimètres différents. Le seuil de détection de ce test, réalisé avec les appareils de mesure disponibles au laboratoire n'était que de 10^3 parasites (± 100 parasites) (résultats non montrés).

La méthode par mesure de la β−galactosidase est plus précise, tout au moins dans les conditions de détection propres au laboratoire, car le seuil de détection minimum a été déterminé à 50 parasites (± 10 parasites).

Le principe du test est le suivant : après le temps nécessaire pour la culture des parasites (souche RHβGal) en présence de la drogue à tester, le milieu extracellulaire est éliminé, puis un tampon permettant la lyse des cellules humaines et la libération des parasites intracellulaires, est ajouté pendant 30 minutes à 50°C. Le milieu réactionnel de la β−galactosidase est ensuite ajouté, avant l'activation de la β−galactosidase elle-même à 37°C pendant 5 min. Enfin, le substrat chromophore CPRG est ajouté au milieu. La plaque est placée à 37°C pendant un temps variable qui dépend de la quantité d'enzyme présente dans les puits, ce qui permet le développement de la réponse colorimétrique. La plaque est ensuite placée dans un lecteur optique et la réponse est lue à 570 nm.

Les résultats obtenus par mesure de la β−galactosidase peuvent être évalués de manière directe par une simple observation de la plaque en présence de CPRG. Néanmoins, parce que la lyse de parasites extracellulaire entraîne la libération d'une plus grande quantité d'enzyme active dans le milieu et donc accessible au substrat, une surestimation du nombre de parasites peut se produire : une grande partie du milieu liquide pouvant contenir des parasites extracellulaires, doit donc être éliminée avant lecture. Enfin, la demi-vie de la β−galactosidase étant longue (McFadden et al. 1997), le test mesure une accumulation de l'enzyme dans le milieu plutôt qu'une quantité produite pendant un faible laps de temps. Au vu des avantages et malgré les quelques inconvénients énoncés, le test par mesure de l'activité β−galactosidase a donc été choisi pour mesurer l'IC50 des inhibiteurs de la MGDG synthase

et de leurs dérivés. Cette méthode nécessite l'utilisation d'un milieu de culture sans rouge phénol car celui-ci interfère avec le produit coloré formé par l'hydrolyse du CPRG par la β–galactosidase lors de la mesure de l'IC50 (Figure 10).

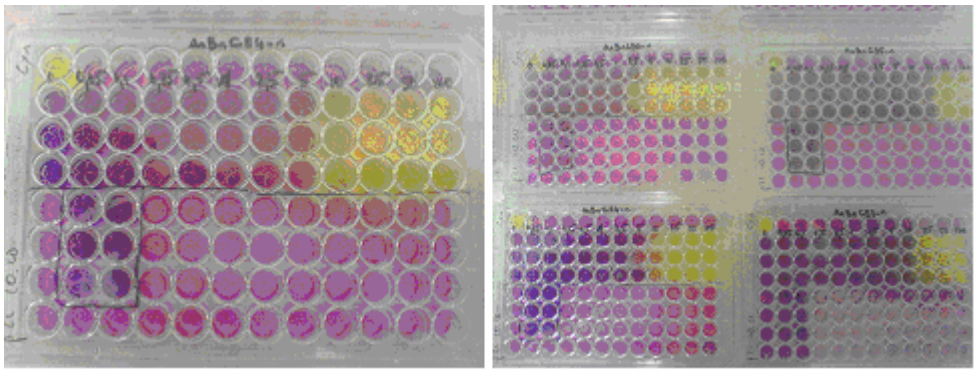


Figure 10 : Exemple de plaques de mesure de la prolifération de *Toxoplasma gondii* par détection de la β–galactosidase, permettant la détermination d'IC50 de composés antiparasitaires. Sur la plaque de 96 puits figurée à gauche, les puits les plus jaunes sont ceux où la présence de β–galactosidase est la plus faible. Cette coloration est proche de celle du milieu de culture sans rouge phénol. Les puits dont le milieu présente une coloration plus pourpre (en haut à gauche) sont les puits les plus riches en parasites, possédant une forte teneur en β–galactosidase. Lorsqu'une molécule est antiparasitaire, les faibles concentrations n'induisent pas de toxicité sur le parasite et les puits correspondants sont pourpres ; les concentrations croissantes affectent la prolifération des parasites et les puits correspondants présentent une couleur jaune. L'IC50 est au point d'inflexion de la chute de couleur du violet vers le jaune (mesure à 570 nm). Il est alors aisé de différencier une drogue plus efficace avant même la mesure sur lecteur de plaques (photo de droite).

Le mode opératoire de ce test permet de mesurer la concentration en drogue suffisante pour tuer 50 % des parasites (IC50) mais ne permet pas de discerner si les composés ont une efficacité uniquement lors des étapes de vie extracellulaires du parasite ou s'ils possèdent aussi la capacité de traverser les membranes de la cellule hôte et d'être efficaces lors des phases de vie intracellulaire du parasite. Afin d'affiner le mode opératoire et d'apporter un maximum d'information quant à la bioactivité des composés testés, trois protocoles ont été réalisés en parallèle avec une concentration fixée à 100 µM pour chacune des molécules. Cette expérience a été suivie d'une observation du phénotype et du nombre relatif des parasites envahis (Figure 11). Les trois protocoles utilisés ont consisté en :

- un pré-traitement des parasites extracellulaires en présence de drogue, suivi d'un lavage afin d'éliminer les composés bioactifs puis d'une invasion des parasites dans les cellules hôtes ;
- un traitement des cellules infectées par remplacement du milieu de culture par le milieu complémenté avec les composés bioactifs ; ce sont alors les parasites intracellulaires qui sont les cibles ;
- un traitement combinant les deux traitements précédents, à savoir une incubation des parasites extracellulaires en présence des composés bioactif, suivie d'une

invasion et enfin, un remplacement du milieu de culture par un milieu complémenté avec les composés bioactifs.

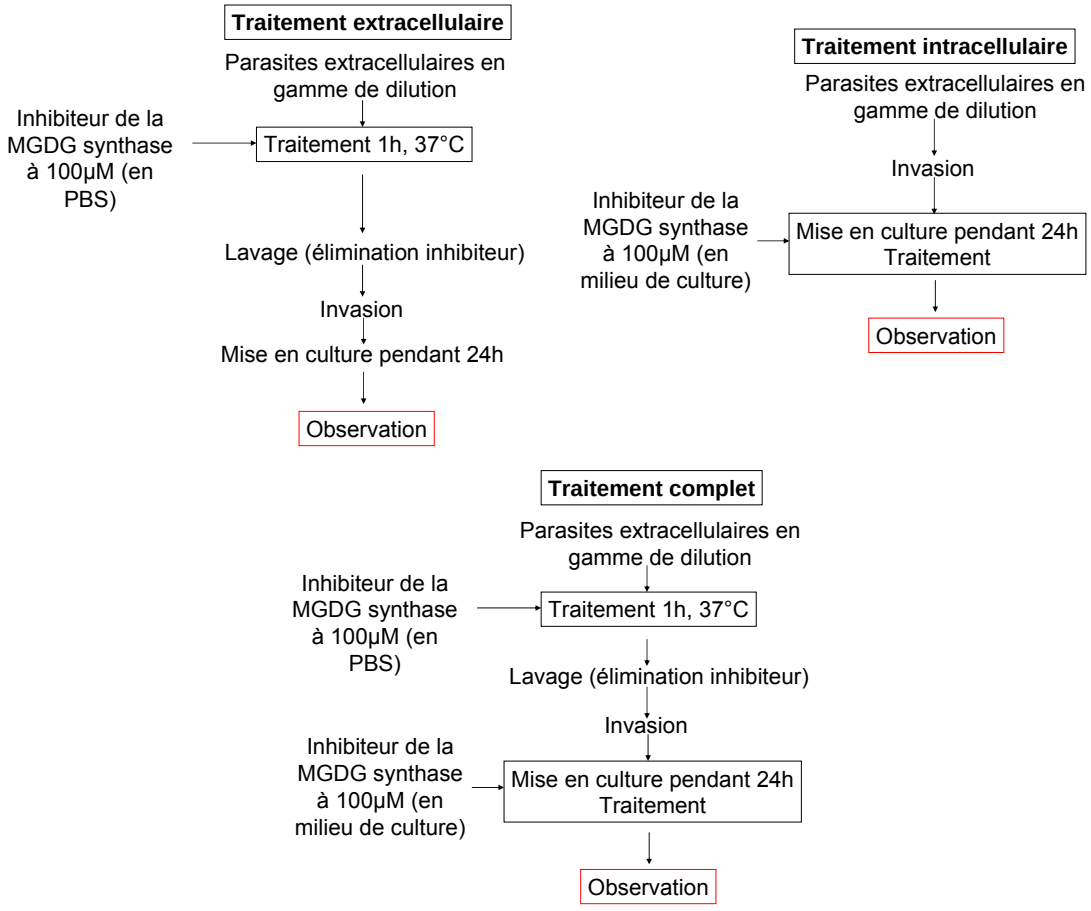
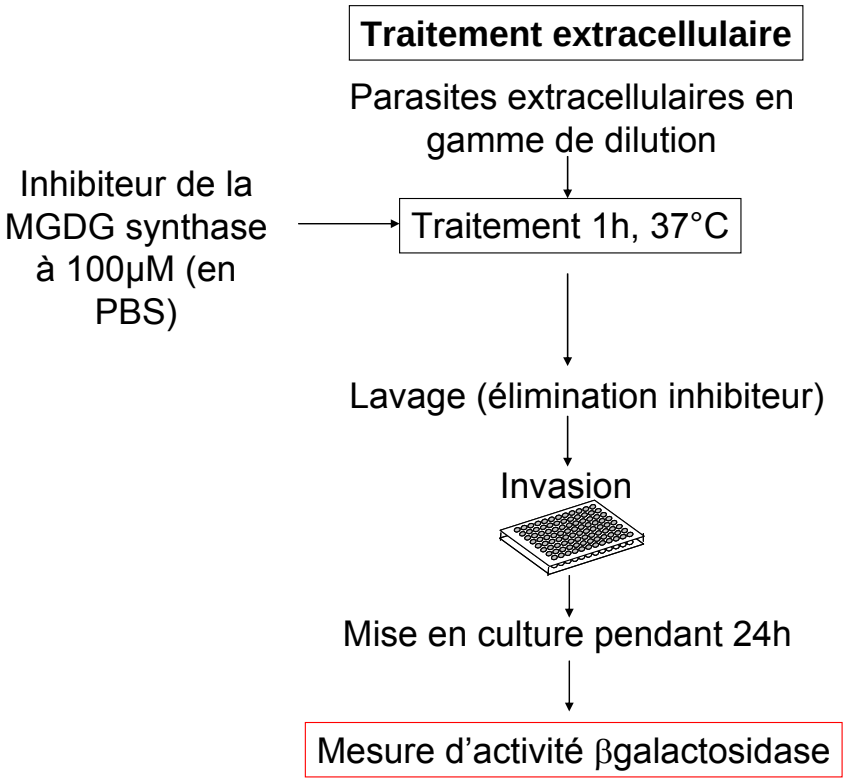
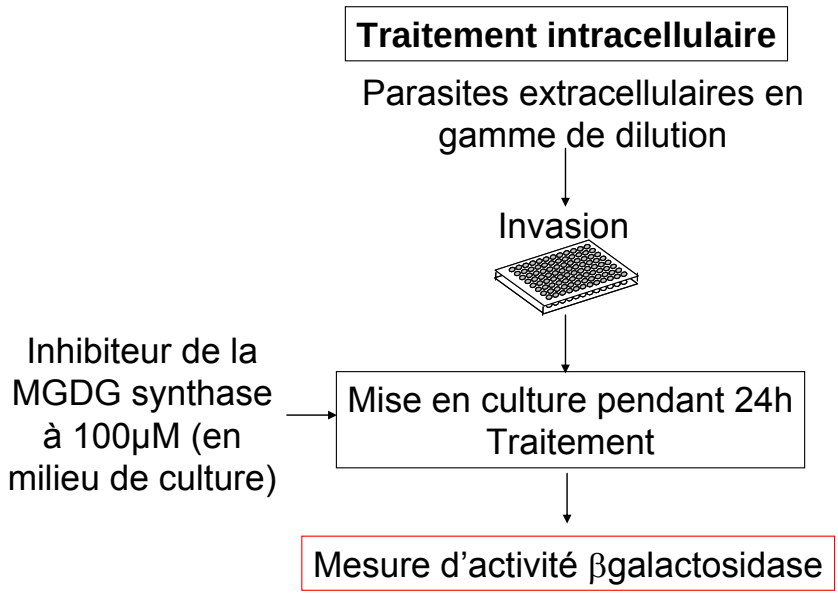


Figure 11 : Schémas des modes opératoires utilisés pour évaluer l'effet de traitement(s) intracellulaire et extracellulaire de *T. gondii* par 100 µM des inhibiteurs de la MGDG synthase.

Les observations ont été réalisées en immunofluorescence indirecte par marquage avec l'anticorps anti-SAG1 (mAbTG05.54) (images non montrées) et comparées aux parasites n'ayant subi aucun traitement (ainsi qu'un contrôle en présence de DMSO). L'un des points les plus marquants de ce test a été l'absence totale de parasite intracellulaire suite au traitement combinant un traitement extracellulaire et intracellulaire.

Pour une mise en œuvre systématique, nous avons par la suite élaboré trois types de modes opératoires sur plaques microtitrées à 96 puits. Les modes opératoires nous permettent de mesurer la quantité de β–galactosidase produite par des nombre fixes de parasites (2, 50, 100, 2.10^2, 5.10^2, 10^3… 10^9) suivant le même principe que le test précédent (Figure 12).


Traitement extracellulaire
Parasites extracellulaires en gamme de dilution
Inhibiteur de la MGDG synthase à 100µM (en PBS)
Traitement 1h, 37°C
Lavage (élimination inhibiteur)
Invasion
Mise en culture pendant 24h
Mesure d'activité βgalactosidase


Traitement intracellulaire
Parasites extracellulaires en gamme de dilution
Invasion
Inhibiteur de la MGDG synthase à 100µM (en milieu de culture)
Mise en culture pendant 24h Traitement
Mesure d'activité βgalactosidase

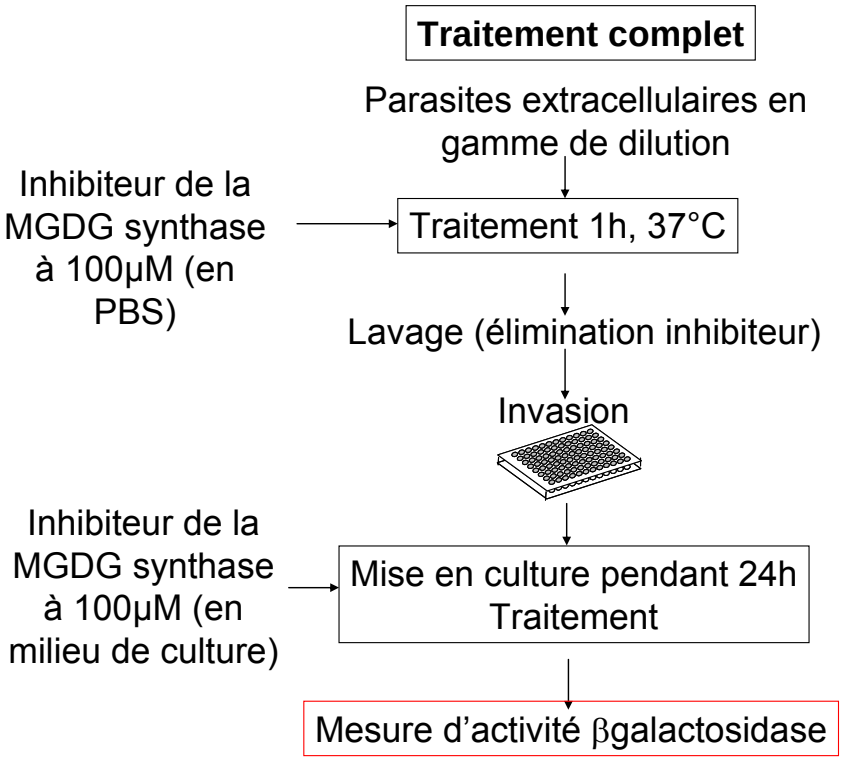


Figure 12 : Schéma des modes opératoires permettant le(s) traitement(s) extracellulaire et intracellulaire pour la mesure de l'activité β–galactosidase produite par un nombre fixe de parasites *T. gondii* (souche RHβGal).

Le test extracellulaire (traitement des parasites libres) permet une détection de la β–galactosidase, dans la limite de détection. Les absorbances mesurés (DO_{570}) sont corrélées avec la quantité de parasites introduits par puits. Le test intracellulaire montre aussi un effet mesurable suivant la dose de composé, toujours dans la limite de détection. Le test combinant traitement intracellulaire et extracellulaire ne permet pas d'observer l'accumulation de produit coloré (produit par l'activité de la β–galactosidase) après incubation avec les deux drogues. Les conditions pour ce test sont donc saturantes. La mesure d'une IC50 nécessitant un effet dose-mesurable, nous n'avons pas retenu ce dernier mode opératoire pour la détermination systématique d'IC50.

Suite à cette étude préliminaire, nous avons mis au point deux protocoles de mesure de l'IC50, dans les conditions permettant de discerner un effet éventuel sur forme extracellulaire et intracellulaire de *Toxoplasma gondi* et en corrélation avec les conditions optimales de détection de la β–galactosidase (Figure 13). La concentration de parasites a été établie à ~10^4 parasites par puits (de plaque 96 puits).

Lors du traitement intracellulaire, la préparation d'une gamme décroissante de concentration allant de 100 µM à 5 nM en PBS (gamme de concentration préparée par dilutions en cascade) est nécessaire. Des parasites extracellulaires sont purifiés sous leur forme extracellulaire (voir Matériel et Méthodes) et traités pendant 1 h à 37°C sur roue orbitale en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs. Les parasites sont lavés puis

déposés sur les tapis de HFF des plaques pendant 12 minutes à 37°C. Les parasites encore extracellulaires après ce laps de temps sont éliminés par trois lavages successifs. L'ensemble parasites envahis / cellules HFF est mis en culture pendant 48h. La mesure de l'IC50 est ensuite réalisée selon le protocole décrit (voir Matériel et Méthodes).

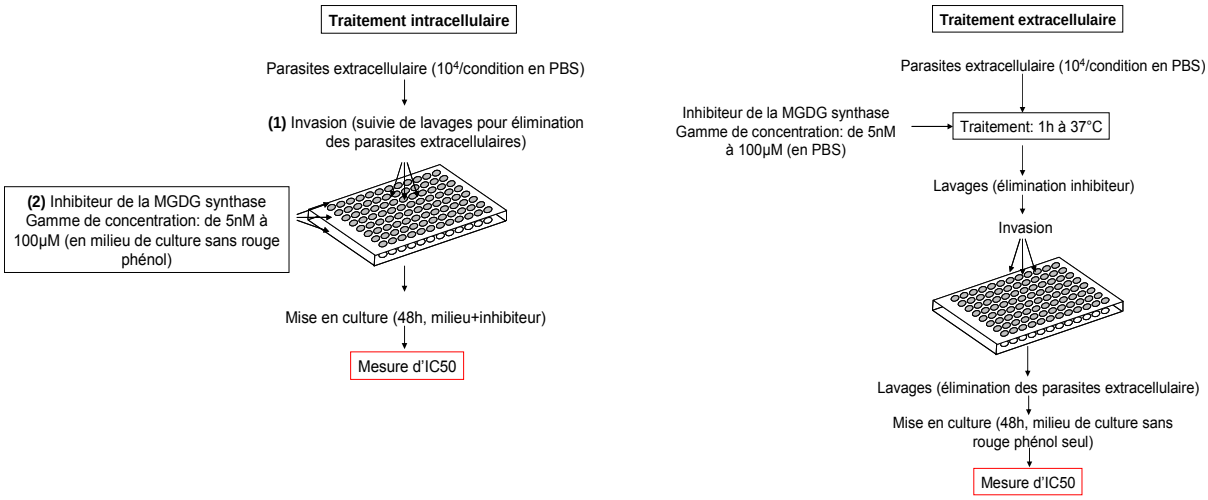


Figure 13 : Schéma des modes opératoires définitifs pour les traitements des formes extracellulaires et intracellulaires de *T. gondii* (RHβGal) par les inhibiteurs de la MGDG synthase sur plaque de 96 puits. 10^4 parasites ont été mis en culture sur plaque en présence de cellules HFF. Les parasites ont subi un prétraitement avec différentes concentrations des molécules DB-E-PDB ou DB-BE-PDB (traitement extracellulaire) ; ou ils sont incubés en présence d'un milieu de culture mélangé avec différentes concentrations des molécules (traitement intracellulaire). Après 48 h de culture des parasites, la teneur en β–galactosidase est mesurée puis une valeur d'IC50 est déduite.

Les conditions de culture sont variables selon la position du puits sur la plaque. En effet, les positions extrêmes en bordure de plaques sont à éviter car plus sensibles à l'assèchement du puits. Chaque condition est donc réalisée en triplicat afin d'éliminer les mesures extrêmes liées à ces différences de culture propres à la position sur la plaque. De plus, un nombre important de contrôles (parasites non traités ou milieu ne contenant pas de drogue) est requis avec une répartition régulière sur l'ensemble de la plaque à mesurer. Les mesures d'IC50 ont été réalisées sur la souche RHβGal de *T. gondii* (type I).

2. Mesure de L'IC50 des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB

Les valeurs d'IC50 des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB, valeurs déterminées lors des traitements extracellulaires et intracellulaires, sont très proches. Cette observation souligne d'une part que l'effet des composés est irréversible, puisque les parasites extracellulaires traités avant invasion, sont affectés dans leur capacité de se diviser une fois qu'ils sont devenus intracellulaires. D'autre part, si les drogues sont actives sur la forme intracellulaire du parasite, c'est qu'elles sont capables de traverser les membranes de la cellule hôte, de la vacuole parasitophore et enfin du parasite et d'atteindre la cible, encore inconnue. Les premières mesures ont permis de déterminer une valeur d'IC50 de 5 µM ± 0,5µM en moyenne pour la molécule DB-BE-PDB et de 15 µM ± 1,5µM pour la molécule

DB-E-PDB. C'est pourtant cette molécule qui était la plus efficace lors des mesures sur plante entière et algue verte (Figure 14). Les manipulations ont été reproduites plus de 15 fois, au cours des séries d'essais systématiques des dérivés de synthèse (voir plus loin). Elles permettent de déterminer une valeur révisée de 4 µM ± 0,5 µM pour l'IC50 de la molécule DB-BE-PDB et une valeur inchangée pour la molécule DB-E-PDB.

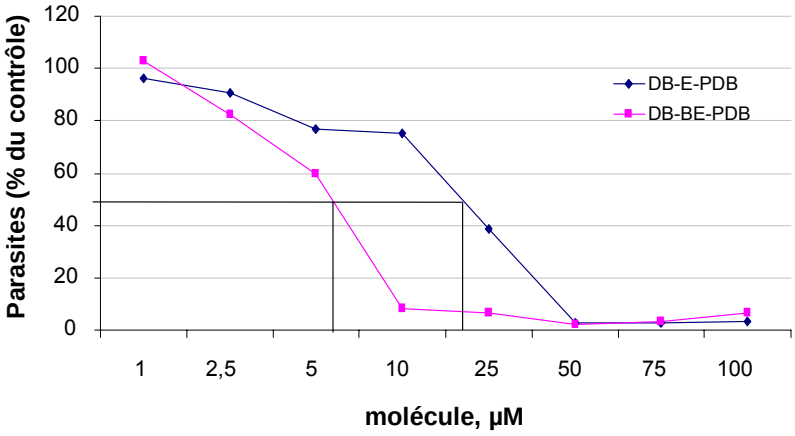


Figure 14 : Mesure de l'IC50 des molécules DB-BE-PDB (B en rose) et DB-E-PDB (A en bleu) sur le parasite *T. gondii*. Les mesures ont été effectuées sur la souche RHβGal par mesure du produit coloré issu de l'hydrolyse du CPRG par la β–galactosidase produite par les parasites.

Afin de préciser le spectre d'action des molécules, nous avons mesuré la valeur de l'IC50 sur une souche de type II (souche PrugniaudβGal) et sur le parasite *Neospora caninum* (souche NéoβGal), parasite très proche de *T. gondii* et responsable de la néosporose. Ces études ont montré que DB-BE-PDB et DB-E-PDB étaient efficaces sur les deux parasites avec des valeurs d'IC50 de 3 µM ±0,5µM et 17 µM ±1,5µM pour la souche Prugniaud et 5 ±0,5 µM et 17 µM ± 2µM pour *N. caninum*, respectivement.

Malgré le fait que la cible des inhibiteurs soit encore inconnue chez *T. gondii*, ces composés présentent des propriétés antiparasitaires intéressantes car ils provoquent leur mort à des concentrations dans la gamme de micromolaire. A ce stade du projet, nous avons donc décidé d'une part, d'améliorer ces propriétés antiparasitaires (voir plus loin), par optimisation chimique des molécules et d'autre part, de tenter d'élucider leur mécanisme d'action chez le parasite.

D. Investigations préliminaires sur le mode d'action des inhibiteurs de la MGDG synthase chez *T. gondii*, en relation avec le processus d'invasion

L'ensemble des données obtenues au cours des études préliminaires à haute concentration des deux molécules et de la mise au point des tests de mesure d'IC50 aux différents stades du cycle parasitaire a permis de déduire que :

- le traitement par les inhibiteurs de la MGDG synthase affecte le nombre de vacuoles présentes chez la cellule hôte. Une hypothèse est donc que les drogues affecteraient les capacités d'invasion du parasite ;
- lors de ce traitement, le nombre de parasites à l'intérieur des vacuoles diminue. Ceci suggère donc que la prolifération du parasite serait affectée directement ou indirectement ;
- le traitement est efficace et irréversible lors des phases de vie extracellulaire et intracellulaire du parasite.

Au cours des études préliminaires de caractérisation du mécanisme des inhibiteurs, nous avons tenté de segmenter les différentes étapes de vie du parasite et d'identifier si l'une d'entre elles est spécifiquement affectée. On peut très sommairement schématiser les étapes obligatoires de la vie intracellulaire de *Toxoplasma* suivant la séquence suivante:

(A) mobilité →(B) attachement	- adhésion à la cellule hôte - extrusion du conoïde	→ (C) Sécrétion	- micronème - rhoptries - granules dense	→ (D) Division intracellulaire par endodyogénie

L'effet des drogues a donc été recherché sur la plupart des étapes mentionnées ci-dessus.

1. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-DE-PDB sur la motilité de *T. gondii*

Nous avons étudié l'effet des molécules DB-E-PDB et DB-DE-PDB sur la motilité de *Toxoplasma* en adaptant le système de détection des mouvements de gliding du parasite décrit par (Hakansson et al., 1999). Le principe de cette méthode repose sur le fait que *T. gondii* dépose, lors de ses déplacements sur un substrat, une trainée de protéines de surface (entre autres) dont l'antigène de surface majeur TgSAG1 (Hakansson et al. 1999). Il est alors possible de suivre les mouvements du parasite sur une lame de verre par immunofluorescence grâce à des anticorps dirigés contre la protéine SAG1. Cette visualisation n'est possible qu'après avoir laissé les parasites « ramper » sur un substrat préparé à cet effet. Le point clé de la méthode est de recouvrir une lame de verre avec le substrat qui saura mimer au mieux les conditions de gliding *in vivo*. Les mouvements du parasite on été observés dans les conditions de traitements des parasites par les inhibiteurs de la MGDG synthase utilisées aux concentrations définies par l'IC50. Les observations faites au cours de ces manipulations sont résumées sur la Figure 15.

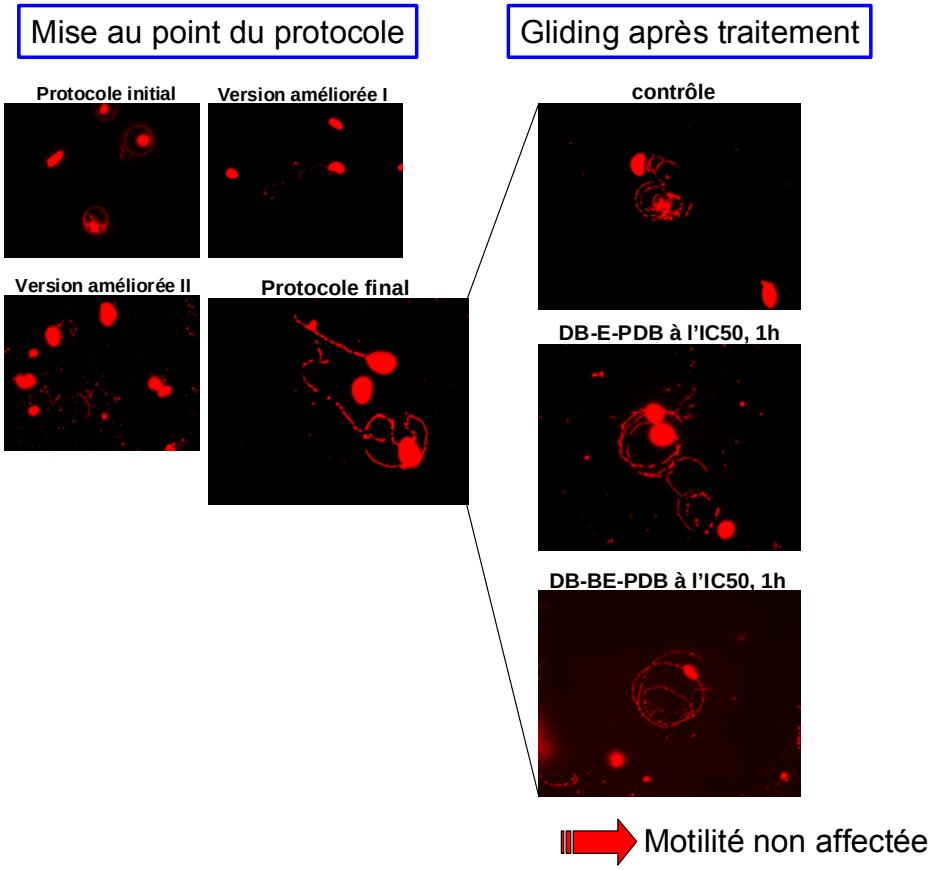


Figure 15 : Effet des molécules DB-E-PDB et DB-DE-PDB sur la motilité de *T. gondii*. Lors de la mise au point du protocole de visualisation des mouvements de gliding, plusieurs méthodes ont été testées quant à la préparation de la lamelle d'expérimentation. Le protocole initial consiste à recouvrir la lamelle avec du sérum de veau fœtal (50% en PBS) pendant 1 h à 37°C. Dans sa version améliorée, du sérum à 100% est utilisé pendant 1 h (Version améliorée I) ou 48 h (Version améliorée II). Le protocole final consiste à recouvrir les lamelles par de la poly D-lysine diluée dans le milieu de culture (10 µg/mL final). Le traitement des parasites par les inhibiteurs de la MGDG synthase utilisés aux concentrations correspondant aux valeurs des IC50 ne semblent pas affecter la motilité des parasites, par comparaison avec des parasites non traités.

D'après les observations faites après les traitements, on ne remarque pas de différence significative entre les mouvements des parasites non traités et ceux qui l'ont été. Du point de vue qualitatif, les mouvements observés sont similaires ainsi que la longueur des trajets effectués. Le taux de parasites motiles évalués est lui aussi semblable entre les traités et les non traités. Les deux molécules ne semblent donc pas inhiber notablement la motilité parasitaire.

2. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-DE-PDB sur l'extrusion du conoïde

L'extrusion du conoïde de *T. gondii* est un phénomène qui peut être induit par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Mondragon et Frixione 1996). Ce phénomène peut donc être induit *in vitro* par ajout d'ionophores à Ca^{2+} comme l'ionomycine. Cette molécule est responsable de l'extrusion de 60% des conoïde d'une population de 10^5 parasites (Mondragon et Frixione 1996). Nous avons donc soumis des parasites

extracellulaires à un traitement par les inhibiteurs de la MGDG synthase utilisés à l'IC50, pendant 30 min ou 1 h, puis additionné au milieu de l'ionomycine à 1 µM. Le comptage des populations traitées ne montre aucun écart significatif avec les populations non traitées (résultats non montrés).

3. Effet des molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB sur la sécrétion du contenu des granules denses et des micronèmes

La sécrétion du contenu des micronèmes est aussi activée par une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Carruthers et al. 1999). Il est possible de stimuler spécifiquement cette sécrétion par un traitement des parasites extracellulaires avec un milieu contenant 1% d'éthanol et de récupérer le milieu contenant les produits de sécrétion des parasites par centrifugation. Lorsqu'on traite des parasites avec les inhibiteurs DB-E-PDB et DB-BE-PDB (à la concentration correspondant à l'IC50) et que l'on stimule la sécrétion du contenu des micronèmes, la protéine MIC2 est retrouvée dans le produit de sécrétion des parasites à l'instar de ceux non traités. Il en est de même pour la protéine GRA1. MIC2 et GRA1 ont été détectées par immunoblot à l'aide d'anticorps monoclonaux (résultat non montré). Il semble donc que les molécules DB-E-PDB et DB-BE-PDB n'affecte pas la sécrétion des micronèmes et des granules denses.

Ces tests, bien que préliminaires, suggèrent que le mécanisme d'action des drogues est vraisemblablement distinct des trois processus analysés, motilité, extrusion du conoïde et sécrétion du contenu des micronèmes.

IV. Optimisation des molécules en vue d'améliorer les propriétés herbicides et/ou antiparasitaires, discussion et perspectives

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre montre qu'il est possible de mesurer les effets inhibiteurs des composés DE-E-PDB et DE-BE-PDB :

- *in vitro*, sur l'activité des MGDG synthases de plantes, dans un ensemble varié de systèmes (enzymes native ou recombinante, en milieu réactionnel constitué de vésicules membranaires ou de micelles mixtes) ; une IC50 correspond à un l'inhibition l'activité à 50% de l'activité contrôle ;
- *in vitro* et *in vivo* sur la croissance de plantes (*Arabidopsis*) et la prolifération d'algues (*Chlamydomonas*) et de parasites (*Toxoplasma*) ; une IC50 correspond à un inhibition de 50% de la croissance / prolifération par rapport à celle du contrôle.

Il est aussi possible d'établir la concentration à laquelle ces composés deviennent toxiques sur des modèles de prolifération de cellules humaines (un IC50 correspondante peut être mesurée).

A. Optimisation des propriétés herbicides et / ou antiparasitaires de composés dérivés du châssis moléculaire commun à DE-E-PDB et DE-BE-PDB

Les composés DE-E-PDB et DE-BE-PDB partagent un même châssis moléculaire (ou scaffold) et diffèrent au niveau d'un seul groupement. Un programme d'optimisation de la structure de ces molécules initiales a été initié, dans le but d'améliorer leurs propriétés en tant qu'herbicide et/ou antiparasitaire (molécules plus actives à de plus faibles concentrations), avec une cytotoxicité amoindrie sur modèle de cellules humaines (visant une diminution d'effets secondaires néfastes) (Figure 16).

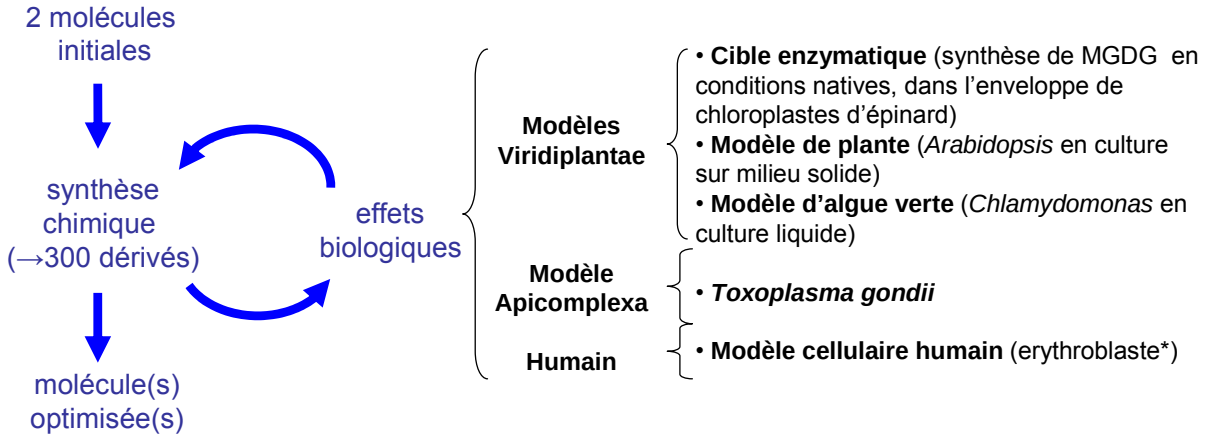


Figure 16 : Stratégie d'optimisation des molécules inhibitrices de la MGDG synthase. (*) Les mesures sur lignée d'érythroblastes humains ont été réalisées par Nadia Saïdani (Laboratoire PCV, CEA Grenoble, et UMR 5539, Université de Montpellier ; les mesures sur *Arabidopsis* et *Chlamydomonas* ont en partie été réalisées par Amélie Zoppé, Laboratoire PCV, CEA Grenoble).

L'équipe de Roman Lopez (iBITEC-S ; CEA Saclay) a réalisé la synthèse de plus de 250 dérivés des molécules DB-BE-PDB et DB-E-PDB, dont nous avons déterminé les effets (IC50) sur les modèles biologiques décrits sur la Figure 16. Chaque campagne de synthèses (de 10 à 15 composés) a permis d'évaluer le gain apporté, ou la perte de bioactivité, suite à un ensemble de modifications de points pharmacophoriques. Le processus permet donc, par une série de modifications moléculaires et d'essais, de déduire un modèle de QSAR (quantitative structure-activity relationship) permettant de rationaliser le processus d'optimisation moléculaire. Une attention particulière a été portée sur le développement de molécules ayant soit un spectre large d'activité, soit un effet spécifique sur les Apicomplexes d'une part et sur les plantes et les organismes photosynthétiques d'autre part. De plus, la mesure d'IC50 en test de cytotoxicité sur cellules humaines (modèle de prolifération d'érythroblastes) a été réalisée pour tous les composés. Grâce aux modèles de QSAR déduits des essais résumés dans ce mémoire, deux brevets européens ont été déposés, l'un portant sur l'utilisation de composés ayant une activité inhibitrice de la MGDG synthase en tant qu'herbicide et/ou algicide et l'autre, sur l'utilisation de composés aux propriétés anti-parasitaires pour le traitement des maladies infectieuses causées par les Apicomplexes. Les résultats obtenus au cours de 19 campagnes de synthèses et d'essais biologiques sont résumés dans le Tableau 2.

MOLECULES				Test enzymatique	Test sur organismes			
Références Produits	Caractéristiques des composés		Lot	MGDG synthase	*Arabidopsis* (modèle Angiosperme)	*Chlamydomonas* (modèle Algue verte)	*Toxoplasma* (modèle Apicomplexe)	Modèle cellulaire Humain
	MW	*Formule Chimique*		Synthèse de MGDG dans l'enveloppe de chloroplastes d'épinards	Test croissance sur milieu gélosé complémenté avec les molécules (tient compte de l'hydrophobicité)	Test prolifération souche 11.32a (mt+)	Test prolifération	Test prolifération érythroblastes K562
Glyphosate		*contrôle d'un herbicide sans effet sur parasite*		pas d'inhibition dans la gamme	25 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme
Triclosan		*contrôle d'un herbicide antiparasitaire*		pas d'inhibition dans la gamme	10 µM	1.2 µM	0.320 µM	13.4 µM
A1B1C1_1 (DE-E-PDB)	498.62	C30H34N4O3	1	45 µM	100 µM	> 50 µM	14 µM	9.7 µM
A1B1C2_1 (DE-BE-PDB)	574.71	C36H38N4O3	1	10 µM	> 200 µM	> 50 µM	4µM	9.3 µM
A1B1C3_1	484.59	C29H32N4O3	1	15 µM	25 µM	15 µM	7.5 µM	5.7 µM
A1B1C4_1	498.62	C30H34N4O3	1	45 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	2.5 µM	3.6 µM
A1B1C5_1	408.49	C23H28N4O3	1	> 100 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	2 µM	26 µM
A1B2C1_1	496.6	C30H32N4O3	1	pas d'inhibition dans la gamme			3.5 µM	4.6 µM
A0B1C1_1	366.5	C23H30N2O2	1	pas d'inhibition dans la gamme			15 µM	38 µM
A2B1C1_1	456.62	C30H36N2O2	1	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	200 µM
A1B1C8_0	287.4	C17H25N3O	1	pas d'inhibition dans la gamme			3 µM	194 µM
A1B1C7_0	259.35	C15H21N3O	1	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	195 µM
A1B1C9_0	427.67	C27H45N3O	1	pas d'inhibition dans la gamme			1.5 µM avec cristaux visibles au microscope	200 µM
A1B1C0_0	217.27	C12H15N3O	1	légère activation	pas d'inhibition dans la gamme		activation	210 µM
A1B1C6_1	395.45	C22H25N3O4	1	pas d'inhibition dans la gamme			0.5 µM	10.3 µM
A6B1C1_1	514.68	C30H34N4O2S	2	> 100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	3.5 µM	5.3 µM
A13B1C1_1	569.69	C34H39N3O5	2	> 100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	5.2 µM	113.7 µM
A9B1C1_1	482.62	C30H34N4O2	2	> 100 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	8 µM	17 µM
A4B1C1_1	512.64	C31H36N4O3	2	> 100 µM	200 µM *	pas d'inhibition dans la gamme	2.5 µM	93.3 µM
A3B1C1_1	598.73	C35H42N4O5	2	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	2 µM	394.6 µM
A1B1C4_0	454.61	C29H34N4O	2	pas d'inhibition dans la gamme			0.8 µM	24.2 µM
A7B1C1_1	512.64	C31H36N4O3	2	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	0.2 µM	55 µM
A1B1C3_0	440.58	C28H32N4O	2	pas d'inhibition dans la gamme			2 µM	32.1 µM
A5B3C1_1	512.64	C31H36N4O3	2	pas d'inhibition dans la gamme			1 µM	22.4 µM
A10B1C1_1	483.6	C29H33N5O2	2	pas d'inhibition dans la gamme			4 µM	90.9 µM
A1B1C2_0	530.7	C35H38N4O	2	pas d'inhibition dans la gamme			4 µM	59.6 µM
A1B1C1_0	454.61	C29H34N4O	2	pas d'inhibition dans la gamme			7 µM	33.0 µM
A5B3C0_0	231.29	C13H17N3O	2	pas d'inhibition dans la gamme			0.5 µM	97.2 µM
A8B1C1_1	499.6	C30H33N3O4	2	pas d'inhibition dans la gamme			0.8 µM	151.6 µM
A1B1C3_2	500.65	C29H32N4O2S	3	20 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	0.181 µM	88.3 µM
A16B7C1_1	495.61	C31H33N3O3	3	pas d'inhibition dans la gamme			1.36 µM	280 µM
A1B1C6_2	411.52	C22H25N3O3S	3	> 100 µM	200 µM	> 50 µM	1.13 µM	54.6 µM
A1B1C1_2	514.68	C30H34N4O2S	3	pas d'inhibition dans la gamme			1.18 µM	56.6 µM
A1B5C1_1	512.64	C31H36N4O3	3	pas d'inhibition dans la gamme			3.41 µM	34.2 µM
A15B1C1_1	550.61	C31H33F3N4O2	3	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	2 µM	41.4 µM
A1B6C1_1	472.58	C28H32N4O3	3	pas d'inhibition dans la gamme			0.381 µM	34.7 µM

A14B1C1_1	499.6	C29H33N5O3	3	> 100 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	2.5 µM	15.6 µM
A1B1C10_1	434.53	C25H30N4O3	3	pas d'inhibition dans la gamme			0.450 µM	98.5 µM
A1B4C1_1	498.62	C30H34N4O3	3	pas d'inhibition dans la gamme			2.35 µM	18 µM
A0B0C1_0	255.35	C17H21NO	3	pas d'inhibition dans la gamme			1.1 µM	206 µM
A0B0C2_0	331.45	C23H25NO	3	pas d'inhibition dans la gamme			1.77 µM	48.6 µM
A17B1C1_1	497.63	C31H35N3O3	4	pas d'inhibition dans la gamme			5.57 µM	28.9 µM
A18B1C1_1	588.74	C37H40N4O3	4	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme		1.76 µM	94.4 µM
A19B1C1_1	594.79	C37H46N4O3	4	pas d'inhibition dans la gamme			1.57 µM	327 µM
A20B1C1_1	576.71	C31H36N4O5S	4	pas d'inhibition dans la gamme			1.98 µM	101 µM
A25B1C1_1	481.63	C31H35N3O2	4	pas d'inhibition dans la gamme			0.248 µM	90.5 µM
A26B1C1_1	496.64	C31H36N4O2	4	pas d'inhibition dans la gamme			3.41 µM	14.3 µM
A1B8C1_1	570.68	C33H38N4O5	4	pas d'inhibition dans la gamme			2.81 µM	20.8 µM
A21B1C1_1	638.78	C36H38N4O5S	4	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	1.68 µM	248 µM
A22B1C1_1	602.72	C37H38N4O4	4	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	0.96 µM	138 µM
A23B1C1_1	540.65	C32H36N4O4	4	pas d'inhibition dans la gamme			0.99 µM	169 µM
A24B1C1_1	483.64	C31H37N3O2	4	pas d'inhibition dans la gamme			1.98 µM	144 µM
A27B1C1_1	533.06	C30H33ClN4O3	5	pas d'inhibition dans la gamme			1 µM	1.38 µM
A28B1C1_1	497.67	C32H39N3O2	5	pas d'inhibition dans la gamme			25 µM	7.01 µM
A1B9C1_1	512.64	C31H36N4O3	5	> 100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	5 µM	1.44 µM
A1B1C11_1	360.45	C19H28N4O3	5	pas d'inhibition dans la gamme			12 µM	2.71 µM
A12B1C1_1	582.32	C35H42N4O4	5	pas d'inhibition dans la gamme			2.80 µM	2.13 µM
A1B1C17_1	482.57	C29H30N4O3	5	> 100 µM	25 µM	10 µM	2 µM	2.04 µM
A1B1C18_1	380.44	C21H24N4O3	5	pas d'inhibition dans la gamme			9 µM	0.80 µM
A1B1C19_1	388.5	C21H32N4O3	5	pas d'inhibition dans la gamme			27 µM	1.95 µM
A1B1C12_1	434.44	C23H22N4O5	5	45 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	26 µM	2.13 µM
A1B1C13_1	462.58	C27H34N4O3	5	pas d'inhibition dans la gamme			0.98 µM	4.08 µM
A1B1C14_1	408.49	C23H28N4O3	5	> 100 µM	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	1.8 µM	1.55 µM
A1B1C16_1	434.53	C25H30N4O3	5	pas d'inhibition dans la gamme			5 µM	2.39 µM
A1B1C20_1	332.4	C17H24N4O3	5	pas d'inhibition dans la gamme			4 µM	1.83 µM
A1B1C21_1	455.55	C28H29N3O3	5	45 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	1.2 µM	1.12 µM
A1B1C22_1	681.78	C37H43N7O6	5	> 100 µM	25 µM	15 µM	1.01 µM	3.60 µM
A1B10C1_1	484.59	C29H32N4O3	6	50 µM	25 µM	> 100 µM	3.3 µM	19.2 µM
A1B11C1_1	524.65	C32H36N4O3	6	pas d'inhibition dans la gamme			7.0 µM	11.8 µM
A1B13C1_1	498.62	C30H34N4O3	6	pas d'inhibition dans la gamme			3.1 µM	16.0 µM
A1B12C1_1	526.67	C32H38N4O3	6	pas d'inhibition dans la gamme			4.2 µM	12.8 µM
A29B1C1_1	548.67	C34H36N4O3	6	pas d'inhibition dans la gamme			0.75 µM	20.5 µM
A30B1C1_1	481.63	C31H35N3O2	6	pas d'inhibition dans la gamme			1.85 µM	82.3 µM
A31B1C1_1	513.67	C32H39N3O3	6	pas d'inhibition dans la gamme			1.3 µM	14.4 µM
A1B1C23_3	654.8	C40H42N6O3	6	pas d'inhibition dans la gamme			1.2 µM	4.18 µM
A1B1C24_3	482.62	C30H34N4O2	6	25 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	6.3 µM	15.4 µM
A7B14C25_0	319.36	C18H17N5O	6	pas d'inhibition dans la gamme		> 100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	101.0 µM
A32B1C1_1	574.71	C36H38N4O3	6	pas d'inhibition dans la gamme			3.5 µM	207 µM
A33B1C1_1	499.64	C31H37N3O3	6	pas d'inhibition dans la gamme			4.9 µM	14.4 µM
A1B1C26_0	468.63	C30H36N4O	6	pas d'inhibition dans la gamme			1.5 µM	3.16 µM
A7B1C2_1	588.74	C37H40N4O3	6	75 µM	pas d'inhibition dans la gamme	45 µM	0.800 µM	25.3 µM

A21B1C2_1	714.87	C42H42N4O5S	6	pas d'inhibition dans la gamme			22 µM	243 µM
A37B3C29_0	292.38405	C19H20N2O	7	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	129 µM
A1B1C1_4	497.64575	C30H35N5O2	7	pas d'inhibition dans la gamme			15 µM	12.4 µM
A1B1C1_5	513.71035	C30H35N5OS	7	50 µM	100 µM	>> 50 µM	7.5 µM	9.44 µM
A1B1C1_3	496.65817	C31H36N4O2	7	pas d'inhibition dans la gamme			10.5 µM	13.0 µM
A11B1C1_1	497.6429	C31H35N3O3	7	pas d'inhibition dans la gamme			11 µM	22.6 µM
A34B1C1_1	612.77588	C36H44N4O5	7	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	5.7 µM	20.00 µM
A35B1C1_1	584.7217	C34H40N4O5	7	pas d'inhibition dans la gamme			1.7 µM	26.0 µM
A36B1C1_1	566.70636	C34H38N4O4	7	pas d'inhibition dans la gamme			11.5 µM	4.69 µM
A1B1C15_1	441.53454	C27H27N3O3	7	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	12 µM	11.9 µM
A1B15C27_1	288.3494	C16H20N2O3	7	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	86.9 µM
A1B16C28_1	268.27449	C15H12N2O3	7	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	95.6 µM
A0B17C1_4	534.75119	C35H42N4O	7	pas d'inhibition dans la gamme			9.2 µM	16.2 µM
A38B1C1_1	641.81764	C37H47N5O5	7	pas d'inhibition dans la gamme			3 µM	9.5 µM
A38B1C2_1	717.91642	C43H51N5O5	7	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	3.2 µM	15.2 µM
A40B1C1_1	504.6783	C30H40N4O3	7	pas d'inhibition dans la gamme			2.6 µM	11.9 µM
A39B1C1_1	504.6783	C30H40N4O3	7	pas d'inhibition dans la gamme			17 µM	9.20 µM
A41B1C2_1	844.09739		8	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	50-100 µM	2.6 µM	8.35 µM
A42B1C1_1	680.87333		8	pas d'inhibition dans la gamme			5.5 µM	157 µM
A43B1C1_1	656.78249		8	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	1.5 µM	107 µM
A44B1C1_1	668.81855		8	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	1.75 µM	162 µM
A45B1C1_1	706.79044		8	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	8.5 µM	298 µM
A46B1C1_1	644.81782		8	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	3.8 µM	141 µM
A47B1C1_1	689.84018		8	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	177 µM
A48B1C1_1	688.8526		8	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	2.3 µM	143 µM
A50B1C1_1	779.00338	C48H54N6O4	9	pas d'inhibition dans la gamme			9 µM	30.3 µM
A51B1C1_1	497.64575	C30H35N5O2	9	pas d'inhibition dans la gamme		pas d'inhibition dans la gamme	0.98 µM	13.3 µM
A0B19C1_1	536.72065	C35H40N2O3	9	pas d'inhibition dans la gamme			12 µM	153 µM
A52B18C1_1	546.67508	C34H34N4O3	9	pas d'inhibition dans la gamme			6 µM	172 µM
A53B1C1_1	457.6212	C29H35N3O2	9	pas d'inhibition dans la gamme			9.5 µM	177 µM
A54B1C1_1	487.64769	C30H37N3O3	9	pas d'inhibition dans la gamme			10 µM	157 µM
A55B1C1_1	517.67418	C31H39N3O4	9	pas d'inhibition dans la gamme			7.3 µM	105 µM
A56B1C1_1	547.70067	C32H41N3O5	9	pas d'inhibition dans la gamme			16 µM	16.2 µM
A57B1C1_1	583.51763	C29H34IN3O2	9	pas d'inhibition dans la gamme			7.65 µM	153 µM
A49B3C1_1	483.61581	C30H33N3O3	9	pas d'inhibition dans la gamme			7.5 µM	13.2 µM
A1B1C30_1	543.62801	C30H33N5O5	9	20 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	3.33 µM	4.17 µM
A7B14C31_0	495.58903	C28H29N7O2	9	pas d'inhibition dans la gamme			14.8 µM	23 µM
A7B14C3_0	438.53672	C26H26N6O	9	pas d'inhibition dans la gamme			50 µM	3.63 µM
A58B1C1_1	695,84437	C38H41N5O6S	10	pas d'inhibition dans la gamme			3 µM	114 µM
A18B1C2_1	664,85513	C43H44N4O3	10	pas d'inhibition dans la gamme			3.6 µM	90.8 µM
A7B14C32_0	452,56	C27H28N6O	10	pas d'inhibition dans la gamme			7.5 µM	4.37 µM
A18B1C33_1	701,32	C43H45ClN4O3	10	pas d'inhibition dans la gamme			1.8 µM	167 µM
A1B1C1_6	496,66	C30H36N6O	10	pas d'inhibition dans la gamme			11 µM	23.2 µM
A1B18C1_1	506,61	C31H30N4O3	10	45 µM	pas d'inhibition dans	pas d'inhibition	5 µM	10.8 µM

					la gamme	dans la gamme		
A62B1C1_1	576,74	C36H40N4O3	10	pas d'inhibition dans la gamme			2.7 µM	100 µM
A63B1C1_1	561,73	C36H39N3O3	10	pas d'inhibition dans la gamme			2.7 µM	24.6 µM
A64B1C1_1	597,78	C35H39N3O4S	10	pas d'inhibition dans la gamme			1.75 µM	138 µM
A59B1C1_1	475,61	C29H34FN3O2	10	pas d'inhibition dans la gamme			5.5 µM	103 µM
A60B1C1_1	526,51	C29H33Cl2N3O2	10	pas d'inhibition dans la gamme			3.75 µM	146 µM
A61B1C1_1	472,64	C29H36N4O2	10	pas d'inhibition dans la gamme			12.9 µM	28.7 µM
A65B1C1_1	526,64	C31H34N4O4	11	> 100 µM			1.7 µM	21.3 µM
A66B1C1_1	558,73	C36H38N4O2	11	pas d'inhibition dans la gamme			3.75 µM	58.7 µM
A67B1C1_1	497,65	C30H35N5O2	11	> 100 µM		pas d'inhibition dans la gamme	3.8 µM	79.9 µM
A68B1C1_1	639,86	C38H45N3O4S	11	pas d'inhibition dans la gamme			6.9 µM	268 µM
A69B1C1_1	615,77	C35H38FN3O4S	11	pas d'inhibition dans la gamme			0.8 µM	334 µM
A70B1C1_1	627,81	C36H41N3O5S	11	pas d'inhibition dans la gamme			4.0 µM	280 µM
A71B1C1_1	665,78	C36H38F3N3O4S	11	pas d'inhibition dans la gamme			5.5 µM	204 µM
A72B1C1_1	603,81	C33H37N3O4S2	11	pas d'inhibition dans la gamme			1.0 µM	78.6 µM
A73B1C1_1	648,83	C38H40N4O4S	11	pas d'inhibition dans la gamme			2.7 µM	87.7 µM
A74B1C1_1	647,84	C39H41N3O4S	11	pas d'inhibition dans la gamme			6 µM	202 µM
A1B1C34_1	546,68	C34H34N4O3	11	> 100 µM			2.3 µM	3.41 µM
A1B1C35_1	532,65	C33H32N4O3	11	> 100 µM			1.3 µM	111 µM
A75B1C1_1	541,74	C34H43N3O3	11	pas d'inhibition dans la gamme			3.7 µM	179 µM
A76B1C1_1	498,63	C30H34N4O3	11	pas d'inhibition dans la gamme			3.25 µM	20.6 µM
A1B1C36_1	540,71	C33H40N4O3	11	pas d'inhibition dans la gamme			2.0 µM	17.6 µM
A1B1C37_1	526,68	C32H38N4O3	11	8 µM		pas d'inhibition dans la gamme	7 µM	28.3 µM
A1B1C38_1	540,71	C33H40N4O3	11	12 µM		pas d'inhibition dans la gamme	3.75 µM	24.6
A1B1C39_1	448,57	C26H32N4O3	12	pas d'inhibition dans la gamme			20 µM	25.7 µM
A1B1C40_1	540,71	C33H40N4O3	12	50 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	8 µM	12.0 µM
A1B1C41_1	512,66	C31H36N4O3	12	35 µM	<<100 µM croissance arrêtée brutalement, en validation	5 µM	3.6 µM	13.2 µM
A1B1C42_1	512,66	C31H36N4O3	12	50 µM	<100 µM, en validation	20 µM	5.1 µM	10.4 µM
A1B1C43_1	560,7	C35H36N4O3	12	40 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	3.75 µM	35.8 µM
A1B1C44_1	773,02	C49H48N4O3S	12	8 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	17.5 µM	140 µM
A1B1C45_1	351,41	C20H21N3O3	12	pas d'inhibition dans la gamme			0.3 µM	11.0 µM
A1B1C46_1	448,57	C26H32N4O3	12	pas d'inhibition dans la gamme			5 µM	90.5 µM
A1B1C47_1	470,58	C28H30N4O3	12	40 µM	200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	7.5 µM	12.0 µM
A1B1C48_1	538,7	C33H38N4O3	12	pas d'inhibition dans la gamme			2 µM	16.8 µM
A77B1C1_1	597,78	C35H39N3O4S	13	pas d'inhibition dans la gamme			39 µM	36.0 µM
A78B1C1_1	487,67	C29H33N3O2S	13	pas d'inhibition dans la gamme			9.5 µM	60.8 µM
A79B1C1_1	592,81	C36H40N4O2S	13	pas d'inhibition dans la gamme			3.0 µM	44.2 µM
A80B1C1_1	528,7	C32H40N4O3	13	pas d'inhibition dans la gamme			6.25	25.2 µM
A81B1C1_1	471,65	C30H37N3O2	13	pas d'inhibition dans la gamme			12 µM	133 µM
A1B1C49_1	580,09	C30H34ClN5O5	13	50 µM	200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	9 µM	3.44 µM
A1B1C50_1	580,09	C30H34ClN5O5	13	15 µM	env. 100 µM, en validation	en cours d'analyse	3.3 µM	10.3 µM
A1B1C51_1	565,12	C31H37ClN4O4	13	60 µM	env. 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme	6.6 µM	18.0 µM
A1B1C52_1	599,96	C29H32BrClN4O3	13	15 µM	env. 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme	3.2 µM	17.5 µM
A1B1C53_1	613,99	C30H34BrClN4O3	13	50 µM	200 µM	5 µM; très intéressant car totalement létal à 50 µM	11.5 µM	13.8 µM

A1B1C54_1	565,12	C31H37ClN4O4	13	50 µM	<100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme	5.5 µM	14.9 µM
A53B1C2_1	533,72	C35H39N3O2	14	pas d'inhibition dans la gamme			3.8 µM	159 µM
A82B1C1_1	611,81	C36H41N3O4S	14	pas d'inhibition dans la gamme			3.9 µM	99 µM
A83B1C1_1	611,81	C36H41N3O4S	14	pas d'inhibition dans la gamme			2.9 µM	90.9 µM
A84B1C1_1	665,78	C36H38F3N3O4S	14	pas d'inhibition dans la gamme			3.2 µM	113 µM
A85B1C1_1	673,88	C41H43N3O4S	14	pas d'inhibition dans la gamme			6.2 µM	72.5 µM
A86B1C1_1	647,84	C39H41N3O4S	14	pas d'inhibition dans la gamme			13.2 µM	152 µM
A87B1C1_1	690,91	C41H46N4O4S	14	pas d'inhibition dans la gamme			0.212 µM	74.2 µM
A1B1C56_1	574,73	C36H38N4O3	14	6 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	2.9 µM	29.9 µM
A27B1C0_0	251,72	C12H14ClN3O	14	pas d'inhibition dans la gamme			pas d'inhibition dans la gamme	124 µM
A1B1C55_1	485,59	C28H31N5O3	14	45 µM	100 µM	10 µM; très intéressant car totalement létal à 50 µM	18.8 µM	38.4 µM
A1B1C57_1	539,05	C29H32ClFN4O3	15	5 µM	< 100 µM, en validation	>> 50 µM	1.4 µM	6.71 µM
A1B1C58_1	549,12	C31H37ClN4O3	15	15 µM	< 100 µM, en validation	> 50 µM	1.7 µM	13.4 µM
A1B1C59_1	551,09	C30H35ClN4O4	15	15 µM	< 100 µM, en validation	> 50 µM	5 µM	12.3 µM
A1B1C60_1	551,09	C30H35ClN4O4	15	15 µM	< 100-200 µM, en validation	> 50 µM	1.75 µM	6.62 µM
A1B1C61_1	613,16	C35H37ClN4O4	15	8 µM	150 µM	pas d'inhibition dans la gamme	3.7 µM	11.6 µM
A1B1C62_1	555,51	C29H32Cl2N4O3	15	8 µM	150 µM	pas d'inhibition dans la gamme	5.3 µM	8.31 µM
A71B1C2_1	741,88	C42H42F3N3O4S	15	pas d'inhibition dans la gamme			3.1 µM	143 µM
A74B1C2_1	723,94	C45H45N3O4S	15	pas d'inhibition dans la gamme			5.5 µM	32.9 µM
A70B1C2_1	703,91	C42H45N3O5S	15	pas d'inhibition dans la gamme			6.3 µM	83.5 µM
A1B1C63_1	553,08	C30H34ClFN4O3	16	40 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	3.3 µM	11.0 µM
A1B1C64_1	563,15	C32H39ClN4O3	16	60 µM	~100 µM à confirmer	pas d'inhibition dans la gamme	4.0 µM	13.7 µM
A1B1C72_1	586,14	C33H36ClN5O3	16	60 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	1.0 µM	4.26 µM
A1B1C65_1	565,12	C31H37ClN4O4	16	25 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	3.75 µM	17.0 µM
A1B1C66_1	627,19	C36H39ClN4O4	16	40 µM	>200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	5.2 µM	10.6 µM
A1B1C67_1	569,54	C30H34Cl2N4O3	16	15 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	5 µM	10.4 µM
A1B1C68_1	569,54	C30H34Cl2N4O3	16	60 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	7.6 µM	10.9 µM
A1B1C69_1	571,12	C33H35ClN4O3	16	75 µM	>200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	7.2 µM	11.3 µM
A1B1C70_1	572,11	C32H34ClN5O3	16	75 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	1.05 µM	1.39 µM
A1B1C71_1	574,13	C32H36ClN5O3	16	100 µM	200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	1.2 µM	22.4 µM
A1B1C73_1	536,07903	C29H34ClN5O3	17	17 µM	50 µM	20 µM	7 µM	11.4 µM
A1B1C74_1	536,07903	C29H34ClN5O3	17	15 µM	50 µM	50 µM	2.3 µM	17.6 µM
A1B1C75_1	641,21672	C37H41ClN4O4	17	12 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	0.8 µM	14.3 µM
A1B1C76_1	635,21253	C38H39ClN4O3	17	25 µM	pas d'inhibition dans la gamme	pas d'inhibition dans la gamme	0.7 µM	33.8 µM
A1B1C78_1	585,15199	C34H37ClN4O3	17	25 µM		pas d'inhibition dans la gamme	3.75 µM	5.98 µM
A1B1C79_1	541,11721	C28H33ClN4O3S	17	30 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme	5 µM	10.3 µM
A1B1C80_1	536,07903	C29H34ClN5O3	17	35 µM	100 µM	pas d'inhibition dans la gamme	1.8 µM	11.5 µM
A1B1C82_1	494,59583	C27H34N4O5	17	12 µM	25 µM	30 µM	2 µM	8.78 µM
A1B1C83_1	455,49484	C23H27N4O6	17	pas d'inhibition dans la gamme			17.5 µM	60.9 µM
A1B1C84_1	725,91734	C39H47N7O5S	17	pas d'inhibition dans la gamme			11.5 µM	15.1 µM
A1B1C81_1	541,11721	C28H33ClN4O3S	17	50 µM	< 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme	4 µM	14.9 µM
A1B1C91_1	553,08	C30H34ClFN4O3	18	12 µM	< 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme		
A1B1C92_1	563,15	C32H39ClN4O3	18	100 µM	~100 µM à confirmer	pas d'inhibition		

						dans la gamme		
A1B1C93_1	565,12	C31H37ClN4O4	18	80 µM	< 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme		
A1B1C85_1	569,54	C30H34Cl2N4O3	18	30 µM	< 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme		
A1B1C86_1	579,15	C32H39ClN4O4	18	80 µM		pas d'inhibition dans la gamme		
A1B1C87_1	585,15	C34H37ClN4O3	18	60 µM	< 100 µM, en validation	pas d'inhibition dans la gamme		
A1B1C88_1	586,14	C33H36ClN5O3	18	50 µM		pas d'inhibition dans la gamme		
A1B1C89_1	588,16	C33H38ClN5O3	18	50 µM	> 200 µM	pas d'inhibition dans la gamme		
A1B1C90_1	627,19	C36H39ClN4O4	18	15 µM	~200 µM	pas d'inhibition dans la gamme		
A1B1C94_1	542,64	C31H34N4O5	19	pas d'inhibition dans la gamme				
A1B1C95_1	527,67	C31H37N5O3	19	pas d'inhibition dans la gamme				
A1B1C96_1	519,05	C29H31ClN4O3	19	8 µM		pas d'inhibition dans la gamme		
A1B1C98_1	488,59	C28H32N4O4	19	pas d'inhibition dans la gamme				
A1B1C99_1	499,62	C29H33N5O3	19	pas d'inhibition dans la gamme				

Tableau 2 : Optimisation des molécules dérivées du châssis moléculaire de DE-BE-PDB/DE-E-PDB pour les propriétés inhibitrices de la MGDG synthase (mesurées sur enzyme native dans des fractions homogènes d'enveloppe de chloroplastes d'épinard), herbicides (*Arabidopsis* en culture), algistatiques (*Chlamydomonas* en culture liquide) et antiparasitaires (*Toxoplasma gondii*). Les mesures sur lignée d'érythroblastes humains ont été réalisées par Nadia Saïdani (Laboratoire PCV, CEA Grenoble, et UMR 5539, Université de Montpellier). Une partie des mesures sur MGDG synthase *in vitro*, sur *Arabidopsis* et sur *Chlamydomonas* a été réalisée par Amélie Zoppé (Laboratoire PCV, CEA Grenoble). Les meilleurs candidats sur *T. gondii* sont surlignés en jaune excepté la molécule ayant l'IC50 la plus basse en rouge. Les molécules potentiellement herbicides et/ou algicides sont surlignées en vert. Les molécules les plus efficaces sur le modèle *in vitro* seul sont en gris. Enfin, les molécules surlignées en bleues possèdent des IC50 faibles sur plusieurs modèles.

Sur les 250 molécules testées sur *Toxoplasma gondii*, 21 présentent une activité antiparasitaire avec une IC50 inférieure à 1 µM (en jaune). La molécule la plus efficace présente une IC50 de 200 nM environ et une toxicité sur modèle de prolifération d'érythroblastes à une concentration 800 fois supérieure (en rouge, A1B1C3-2). Nous avons par conséquent réussi à optimiser les effets anti-parasitaires et nous rapprocher des concentrations requises pour un candidat médicament.

De plus, la molécule A1B1C3-2 présente un profil intéressant car elle est active sur deux modèles de type végétal : le modèle *in vitro* mais aussi la plante entière. Cette molécule ainsi que d'autres présentant des IC50 peu élevées sur modèle végétal, Apicomplexe et érythrocytaire (surlignées en bleu) pourraient aider à l'identification d'un ou plusieurs homologues potentiels de la MGDG synthase chez les Apicomplexes. Le cas échéant, ces molécules pourraient permettre de caractériser des cibles potentielles communes aux organismes photosynthétiques, aux parasites Apicomplexes et dont les effets seraient limités sur modèle humain/animal.

Les composés présentant une activité inhibitrice sur l'activité de la MGDG synthase ont été analysés pour leur utilisation potentielle en tant qu'herbicide et/ou algicide. Les plus efficaces d'entres elles sur *Arabidopsis* et/ou *Chlamydomonas* sont surlignées en vert. Certaines d'entre elles sont plus efficaces sur un modèle plutôt que sur l'autre. Il est intéressant de noter que pour le test enzymatique, les composés hydrophobes partitionnent

entre la phase aqueuse (phase dans laquelle la molécule n'est pas en contact avec la cible) et la phase membranaire (phase dans laquelle la molécule rencontre la cible) et que les IC50 apparentes paraissent de ce fait élevées (surestimation). Par ailleurs, l'hydrophobicité des composés n'est pas toujours compatible avec un accès à la cible, lorsque la molécule est fournie à un organisme entier. Il apparaît que des composés présentent une meilleure IC50 sur cible enzymatique MGDG synthase (par meilleur accès à la phase hydrophobe du milieu réactionnel) mais qu'ils constituent de « moins bons » herbicides, vraisemblablement par une impossibilité à traverser la paroi et les membranes cellulaires.

Les molécules les plus intéressantes ont été sélectionnées et sont à ce jour, en cours de resynthèse à plus grande échelle, afin de les tester sur d'autres modèles de plantes d'intérêt agronomique, et sur modèle animal d'infection parasitaire.

B. Perspectives : des outils pour des stratégies de génétique chimique directe et inverse

L'étude des dérivés chimiques obtenus dans le programme d'optimisation présenté dans ce chapitre vise à découvrir et proposer une nouvelle famille de candidats médicaments et de candidats herbicides.

Par ailleurs, certains de ces composés seront exploités comme outils pour la recherche, afin de rechercher la ou les protéine(s) cible(s) de ces composés (stratégie de génétique chimique inverse).

Dans une première tentative pour identifier la/les cibles des composés obtenus par criblage, la molécule DB-BE-PDB a été très récemment couplée à la biotine. Nous avons pu déterminé une IC50 de 2,5 µM pour ce composé indiquant qu'il peut traverser l'ensemble des structures membranaires des cellules HFF et de *Toxoplasma* et accéder à sa cible. Nous avons mis à profit l'interaction connue de la biotine avec la streptavidine, couplée au fluorophore FITC pour observer des parasites extracellulaires, traités à de faibles doses de la molécule biotinylée (au 1/4 et 1/2 de l'IC50). Les résultats sont pour l'instant difficilement interprétables car la biotine possède une affinité pour un certain nombre de composants cellulaires et on observe donc une fluorescence diffuse au travers de la cellule parasitaire. Ces analyses devront être affinées en particulier en cherchant à saturer préalablement les constituants interagissant dans la cellule, avec la streptavidine. Par ailleurs, le composé biotinylé pourra être exploité pour purifier la ou les cibles par des approches conventionnelles de chromatographie (sur matrice couplée en sandwich avec la streptavidine et la molécule biotinylée).

En conclusion, ce chapitre résume un programme de recherche de nouveaux composés présentant des propriétés remarquables en tant qu'inhibiteurs de l'activité MGDG synthase des plantes, en tant qu'herbicide et algicide, et en tant qu'antiparasitaire. Des modèles de QSAR ont été déduits permettant de rationaliser l'optimisation des dérivés moléculaires vers les propriétés recherchées. Les composés les plus actifs seront étudiés pour leur intérêt

thérapeutique et/ou agronomique éventuels. Ils seront également des outils précieux pour la recherche. En effet, ces composés peuvent être exploités en génétique chimique directe, pour des KO chimiques, ou des invalidations partielles, ce qui permettra d'étudier les réponses des organismes (entre autres, par approche de transcriptomique). Chez les plantes, il sera en effet intéressant d'explorer la réponse globale en cas d'invalidation partielle de la synthèse des galactolipides, ce qui n'est pas, à ce jour, possible par génétique conventionnelle. Il est par ailleurs possible de rechercher la ou les cibles affectées par les composés, en stratégie de génétique chimique inverse. Des composés couplés à la biotine seront dans ce contexte, des « hameçons » pour « pêcher » les cibles (voir plus haut). Dans ce contexte, la cible sensible chez *Toxoplasma* est inconnue : il est possible qu'elle soit liée à un processus de synthèse de lipides (comme le suggère l'obtention des composés actifs par criblage sur l'activité MGDG synthase de plante), ou bien à un processus totalement différent. Toutefois, du fait que le traitement de parasites en présence des composés soit létal, cette cible est très intéressante comme cible d'intervention thérapeutique. Une perspective importante de ce travail est donc sa caractérisation.

Résultats – Chapitre III

Localisation et dynamique sub-cellulaire d'une classe de lipides apparentée au DGDG chez *Toxoplasma gondii*

Article 2

Cyrille Botté, Nadia Saïdani, Ricardo Mondragon, Mónica Mondragón, Giorgis Isaac, Ernest Mui, Rima McLeod, Jean-François Dubremetz, Henri Vial, Ruth Welti, Marie-France Cesbron-Delauw, Corinne Mercier et Eric Maréchal

« Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like epitope in *Toxoplasma gondii* » *J. Lipid Res*. Article sous presse.

I. Préambule

Les Apicomplexes possèdent un plaste acquis par endosymbiose secondaire d'une algue rouge (McFadden et al. 1996, Kölher et al. 1997, Waller et al. 1998). Ce plaste non photosynthétique, nommé l'apicoplaste, est vital pour la survie des parasites (après une phase de latence ; Fishera et Roos 1997, He et al. 2001) tout comme le chloroplaste est vital chez les organismes photosynthétiques. De plus, il assure plusieurs fonctions d'origine végétale dans la cellule parasitaire comme la synthèse des acides gras indispensables à la cellule (Ralph et al. 2004, Mazumdar et al. 2006). Notre équipe a montré que la synthèse de lipides aux propriétés indiscernables de celles des galactolipides a lieu chez le parasite *T. gondii* (Maréchal et al. 2002, Bisanz et al. 2006).

L'incorporation d'UDP-Gal radioactif dans des lysats parasitaires, suivi d'une extraction des glycolipides et d'une migration en chromatographie sur couche mince de silice montre la formation de deux galactolipides qui possèdent les mêmes caractéristiques de migration que celles du MGDG et du DGDG. Le premier est sensible à un traitement à la β-galactosidase ce qui suggère que la tête polaire est un galactose lié *via* une liaison β. Sa synthèse est inhibée par l'EDTA, l'ajout de Zn^{2+} et elle est activée lors d'un apport en Mg^{2+}. Ces deux critères sont caractéristiques de la synthèse du MGDG chez les plantes. Enfin, le lipide est déacylé lors d'une hydrolyse alcaline douce, ce qui indique que sa partie hydrophobe est constituée d'un diglycéride, comme le MGDG.

Lors de marquages métaboliques à l'acétate radioactif de *T. gondii* vivant, l'accumulation de ce lipide n'a jamais pu être observée sur parasites extracellulaires et intracellulaires. Le second lipide a été détecté lors des deux types de marquages métaboliques avec des propriétés de migration sur chromatographie de couche mince similaires à celles du DGDG. Lors de l'incorporation d'UDP-Gal radioactif sur lysats de *T. gondii*, le lipide

semblable au DGDG est sensible à l'α-galactosidase et insensible à la β-galactosidase, de manière similaire au DGDG de plantes. Ce lipide est sensible à l'hydrolyse alcaline mais de manière incomplète, ce qui indique que sa partie hydrophobe contient partiellement du DAG. En contraste avec ces données biochimiques, aucun homologue de gènes codant pour les MGD et DGD de plantes n'a pu être identifié par analyse *in silico* des génomes de *T. gondii* ou d'autres Apicomplexes.

Dans l'article 2, nous avons tenté de caractériser la localisation d'un lipide reconnu par un anticorps dirigé contre le DGDG (digalactolipid-like epitope ou DGLE). Nous avons utilisé des serums polyclonaux de lapin et de rat, obtenus par immunisation avec du DGDG purifié à partir de feuilles d'épinard. Ces serums ont démontré leur efficacité par marquage des membranes de chloroplastes et reconnaissance de mitochondries végétales chargées en DGDG lors de la carence en phosphate (Jouhet et al. 2004). Dans un premier temps, nous avons montré que ces serums réagissaient uniquement sur des extraits lipidiques de *T. gondii*, sans réaction croisée avec des protéines du parasite ou des cellules humaines utilisées pour les propager. De plus, les serums semblent spécifiques d'un antigène digalactolipidique présent chez *T. gondii*. Une préincubation des serums avec du DGDG abolit l'immunomarquage d'extraits lipidiques du parasite par le serum sur membrane de nitrocellulose. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de la présence d'un lipide aux propriétés similaires à celle du DGDG végétal chez le parasite.

Les marquages cellulaires des parasites soulignent la présence du lipide au niveau des membranes de la pellicule. Aucun marquage de l'apicoplaste n'a pu être détecté. De plus, il semble que le DGLE se relocalise lors du passage du stade extracellulaire au stade intracellulaire. En effet, les parasites extracellulaires montrent une localisation du DGLE sur la membrane plasmique et sur les membranes de l'IMC regroupés dans des domaines membranaires sur l'ensemble de la périphérie du parasite. Le parasite intracellulaire montre un marquage uniquement dans la partie apicale du parasite et des cellules filles lors du processus de division cellulaire. De plus, le marquage des parasites intracellulaires est affecté par un traitement à la cytochalasine D entraînant une relocalisation sur la périphérie du parasite. Une des hypothèses que nous pouvons déduire de l'article 2 est une association du DGLL avec des protéines associées au cytosquelette d'actine. Cette hypothèse semble renforcée par la présence du DGLE au niveau de domaines membranaires de type rafts lipidiques et par le fait que le DGLE est associé aux protéines du cytosquelette lors de la purification du réseau sous-pelliculaire. Enfin, les analyses d'extraits lipidiques enrichis en fractions pelliculaires de *T. gondii* suggère que le DGLE est présent mais en faible quantité et que sa partie hydrophobe serait de type diacyl- ou alkyl-acylglycérol ou encore de type céramide. L'ensemble de ce travail a donc permis l'identification d'un lipide aux propriétés semblables à celles du DGDG mais dont la structure précise et le rôle restent à préciser.

II. Article (page suivante)

Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like epitope in *Toxoplasma gondii*

Cyrille Botté,[*,†] Nadia Saïdani,[*,§] Ricardo Mondragon,[**] Mónica Mondragón,[**] Giorgis Isaac,[††] Ernest Mui,[§§] Rima McLeod,[§§] Jean-François Dubremetz,[§] Henri Vial,[§] Ruth Welti,[††] Marie-France Cesbron-Delauw,[†] Corinne Mercier,[1,†] and Eric Maréchal[1,*]

Unité Mixte de Recherche 5168,* Centre National de la Recherche Scientifique-Commissariat à l'Energie Atomique-Institut National de la Recherche Agronomique-Université Joseph Fourier, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, 38058 Grenoble, France; Unité Mixte de Recherche 5163,† Centre National de la Recherche Scientifique-Université Joseph Fourier, Institut Jean Roget, Campus Santé, 38042 Grenoble, France; Unité Mixte de Recherche 5235,§ Centre National de la Recherche Scientifique-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Université Montpellier II, 34095 Montpellier, France; Departamento de Bioquímica,** Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Avenida. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Distrito Federal, México; Division of Biology,†† Kansas State University, Kansas Lipidomics Research Center, Manhattan, KS 66506-4901; and Department of Ophthalmology and Visual Sciences,§§ Pediatrics (Infectious Diseases), Pathology, and Committees on Genetics, Molecular Medicine, and Immunology, University of Chicago, Chicago, IL 60637

Abstract ***Toxoplasma gondii* is a unicellular parasite characterized by unique extracellular and intracellular membrane compartments. The lipid composition of subcellular membranes has not been determined, limiting our understanding of lipid homeostasis, control, and trafficking, a series of processes involved in pathogenesis. In addition to a mitochondrion, *Toxoplasma* contains a plastid called the apicoplast. The occurrence of a plastid raised the question of the presence of chloroplast galactolipids. Using three independent rabbit and rat antibodies against digalactosyldiacylglycerol (DGDG) from plant chloroplasts, we detected a class of *Toxoplasma* lipids harboring a digalactolipid-like epitope (DGLE). Immunolabeling characterization supports the notion that the DGLE polar head is similar to that of DGDG. Mass spectrometry analyses indicated that dihexosyl lipids having various hydrophobic moieties (ceramide, diacylglycerol, and acylalkylglycerol) might react with anti-DGDG, but we cannot exclude the possibility that more complex dihexosyl-terminated lipids might also be immunolabeled. DGLE localization was analyzed by immunofluorescence and immunoelectron microscopy and confirmed by subcellular fractionation. No immunolabeling of the apicoplast could be observed. DGLE was scattered in pellicle membrane domains in extracellular tachyzoites and was relocalized to the anterior tip of the cell upon invasion in an actin-dependent manner, providing insights on a possible role in pathogenetic processes.** **DGLE was detected in other Apicomplexa (i.e., *Neospora*, *Plasmodium*, *Babesia*, and *Cryptosporidium*).**—Botté, C., N. Saïdani, R. Mondragon, M. Mondragón, G. Isaac, E. Mui, R. McLeod, J-F. Dubremetz, H. Vial, R. Welti, M-F. Cesbro-Delauw, C. Mercier, and E. Maréchal. **Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like epitope in *Toxoplasma gondii*. *J. Lipid Res.* 2008.** 49: **000–000.**

Supplementary key words Apicomplexa • galactolipids • digalactosyldiacylglcycerol • inner membrane complex • membrane domains

Toxoplasma gondii is the unicellular causative agent of toxoplasmosis and one of the parasites of the large Apicomplexa phylum, which includes numerous obligate parasites of both human and veterinary importance (e.g., *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Neospora*, etc.). Like all Apicomplexa, *Toxoplasma* is characterized by unique extracellular and intracellular membrane compartmentalization. *Toxoplasma* resides within the host cell inside a nonfusogenic parasitophorous vacuole (1–5). Its plasma membrane is lined by an inner membrane complex formed by two closely apposed membranes. Inside *Toxoplasma* cells, the endomembrane system (endoplasmic reticulum, nuclear envelope, Golgi network, and plasma membrane) is interconnected with specific apical secretory compartments (i.e., micronemes, rhoptries, and dense granules). These three compartments are sequentially involved in the recognition of and attachment to the host cell (6) and the formation and maturation of the parasitophorous vacuole (4, 7). In addition to a mitochondrion, the envelope of

Manuscript received 19 October 2007 and in revised form 4 January 2008.

Published, JLR Papers in Press, January 8, 2008.
DOI 10.1194/jlr.M700476-JLR200

[1] To whom correspondence should be addressed.
e-mail: corinne.mercier@ujf-grenoble.fr (C.M.);
eric.marechal@cea.fr (E.M.)

Copyright © 2008 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at http://www.jlr.org

Master Proof JLR m700476

which has membranes that are disconnected from the endomembrane system, a second semiautonomous organelle has been described in *Toxoplasma* (i.e., a nonphotosynthetic plastid called the apicoplast) (8–10). The apicoplast is surrounded by four membranes and was acquired by a secondary endosymbiosis of a red alga (8–11). The outermost membranes of the apicoplast are thought to be reminiscent of the alga plasma membrane and the endosymbiotic phagosome, consistent with their connection with the trafficking vesicular system (12). The two innermost membranes are believed to derive from the envelope membranes of the ancestral algal chloroplast, although no evidence could be provided that the constituents of these membranes were similar to those of the plant chloroplast envelope. Global analysis of the major lipid classes of *Toxoplasma* was achieved recently using mass spectrometry lipidomic profiling (13). The lipid composition of each membrane compartment has not been determined yet, limiting our understanding of the mechanisms for the homeostasis, control, and subcellular trafficking of membrane lipids in *Toxoplasma*, a series of processes that are critical to understanding pathogenesis.

Intense remodeling of membrane compartments is observed during the *Toxoplasma* life cycle. The biogenesis of the parasitophorous vacuole and cell division require large amounts of polar lipids. Data on membrane lipid synthesis are fragmentary, but they highlight the fact that *Toxoplasma* is an auxotroph for sterols (14) and that the production of acyl lipids relies on orchestrated de novo synthesis and the diversion of precursors from the host cell. Three major and possibly redundant fatty acid synthetic machineries can operate for de novo synthesis: an apicoplast fatty acid synthase of type II (FAS II) (10, 15–21), a cytosolic fatty acid synthase of type I (FAS I) (16), and cytosolic fatty acyl elongases (FAEs) (22, 23). Based on metabolic labeling experiments, Bisanz et al. (24) showed that in free stages, de novo fatty acid synthesis was a source for the acyl moiety of *Toxoplasma* glycerolipids. Because acyl-lipid labeling is abolished by haloxyfop [an inhibitor of plastid acetyl-CoA carboxylases (16)], Bisanz et al. (24) concluded that an active FAS II was essential for the bulk of the acyl-lipid synthesis. Combining conditional mutant analyses and metabolic labeling, Mazumdar et al. (23) showed that FAS II was indeed critical for the biogenesis of the apicoplast itself, and subsequently for the parasite survival, but was unlikely to be the source of acyls for the bulk of acyl lipids. Rather, most *Toxoplasma* glycerolipids appear to be produced using acyls generated by FAS I and/or FAEs, based on thiolactomycin resistance and cerulenin sensitivity (23). Together, these analyses highlight the importance *1*) of *Toxoplasma* FAS and FAEs for bulk acyl-lipid syntheses in free stages and *2*) of FAS II activity for apicoplast biogenesis. Upon invasion, in spite of its autonomous capacity to synthesize acyl lipids, *Toxoplasma* massively scavenges host cell lipid precursors for its membrane biogenesis (24–26).

The presence of the apicoplast in *Toxoplasma* suggested that glycerolipids that are unique to alga and plant plastids might be synthesized by the parasite as well. In particular, monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), which constitute >70% of the membrane lipids from chloroplasts and cyanobacteria (27–30), were sought. The synthesis of three classes of galactolipids has been detected in both *Plasmodium* and *Toxoplasma* cell suspensions after metabolic labeling with radiolabeled UDP-galactose (30). Identification of these low-abundance lipids was attempted by comigration in thin-layer chromatography with standard galactolipids from mammals and plants, hydrolysis of polar heads by galactosidases, and hydrolysis of acyl esters by alkaline treatments. One class exhibited the chromatographic behavior of monogalactosylceramide; the two others coincided with plant MGDG and DGDG (30). After metabolic labeling of acyls with radiolabeled acetate, Bisanz et al. (24) confirmed the synthesis of a galactolipid comigrating with DGDG. *Toxoplasma* lipids exhibiting the analytical and biochemical properties of plant MGDG and DGDG raise the questions of their precise structures, biosynthesis, abundance, localization, and possible roles.

The analysis of minor lipids of *Toxoplasma* is a technical challenge, because of the difficulty of producing sufficient amounts of biological material and the sensitivity of existing techniques. Polyclonal antibodies have been introduced as a new tool to probe the subcellular localization and trafficking of DGDG in plants (31). In this study, we used anti-DGDG antibodies obtained by three independent immunizations of two rabbits and one rat with homogeneously pure chloroplast DGDG for the immunodetection of a class of lipids harboring a digalactolipid-like epitope (DGLE) by immunofluorescence (IF) and immunoelectron microscopy (IEM) throughout the life cycle of *Toxoplasma*. Cell membrane fractionation and mass spectrometry were used to attempt to characterize DGLE structure. The occurrence of DGLE in other apicomplexans was also investigated by immunostaining approaches.

MATERIALS AND METHODS

Lipids

Lipids were either purified from plant material or purchased. The purity of lipids, which is critical for this study, was analyzed carefully by two-dimensional thin-layer chromatography (2D-TLC). MGDG, DGDG, trigalactosyldiacylglycerol (TriGDG), and sulfolipid (SL) were purified from spinach leaf chloroplasts. Briefly, chloroplast lipids were extracted (see below) and a first series of separations by 2D-TLC (see below) allowed the separation of each lipid class; if required, a second series of 2D-TLC allowed the purification to homogeneity of each lipid class. Diacylglycerol (DAG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycerol (PG), monogalactosylcerebroside (MGCB), lactocerebroside (LCB), and sphingomyelin (SM) were purchased from Sigma and checked for purity.

Rabbit and rat anti-DGDG antibodies

Two rabbit polyclonal sera were raised against DGDG (anti-DGDG) by immunization of New Zealand White rabbits (Charles River Laboratories) with 2.5 mg of homogeneously pure DGDG extracted from spinach chloroplast membranes, as described (30). DGDG used for immunization was purified by 2D-TLC.

Proofs Only

162
Master Proof JLR m700476

Briefly, the immunization procedure consisted of a first subcutaneous injection at day 1 (0.35 mg of DGDG in Freund's adjuvant), a second and third series of subcutaneous and intramuscular injections at days 10 and 21 (0.35 mg of DGDG in Freund's adjuvant for both subcutaneous and intramuscular injections), and a fourth and fifth series of injections at days 36 and 50 (0.35 mg of DGDG in Freund's adjuvant for subcutaneous injections and 0.35 mg of DGDG without adjuvant for intramuscular injections) before serum collection at day 57. A rat polyclonal anti-DGDG serum was obtained by immunization of a Lewis rat (Charles River Laboratories) with 2.5 mg of pure DGDG.

Plant material

Photosynthetic *Arabidopsis thaliana* cell suspension was cultured and processed for the IF detection of DGDG in chloroplast membranes as described (31). Chloroplasts and chloroplast envelope membranes from spinach leaves were purified as described (31).

Culture of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Cryptosporidium parvum*, and *Plasmodium falciparum*

Toxoplasma gondii tachyzoites [RH; American Type Culture Collection (ATCC) 50174; Prugniaud type (32)] as well as *Neospora caninum* tachyzoites were propagated in human foreskin fibroblasts (HFFs; ATCC CRL-1635). For pellicle enrichment experiments, parasites were amplified in human cervix adenocarcinoma epithelial HeLa cells (ATCC CCL-2). Human cells were grown in DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, and 10% FBS (Gibco). Extracellular parasites were forced through a 26.5 gauge needle to break host cells and were purified by filtration through a 3 μm polycarbonate membrane before use. *Cryptosporidium parvum* oocysts (bovine genotype 2) were purified from feces obtained from calves experimentally infected with an isolate maintained at the Institut National de la Recherche Agronomique Laboratory of Avian Pathology (Nouzilly, France). Feces were layered on a discontinuous sucrose density gradient, and purified oocysts were bleached, counted, and permitted to excyst in a 1.5% taurocholic acid solution in BHK 21 medium (Gibco) for 90 min in a 37°C humidified, 5% CO_2 atmosphere. Parasite suspensions were purified through a 5 μm cellulose acetate filter (Sartorius). Twenty-four hours before infection, confluent human ileocecal adenocarcinoma cells (HCT-8; ATCC CCL 244) maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin were trypsinized and seeded into four-well tissue culture chambers (Labtek chamber slides; Nunc). A total of 1.25×10^5 parasites were allowed to invade each well containing monolayer at 80–85% confluence for 2 h at 37°C. Parasites that did not enter cells were removed; fresh medium (RPMI 1640 containing 35 mg/l ascorbic acid, 25 mM glucose, 0.1 IU/ml insulin, 15 mM HEPES, 1 mg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin, and 5% FBS) was added to each well, and parasites were allowed to multiply for 48 h. *Plasmodium falciparum* strain 3D7-infected erythrocytes were maintained at 37°C as described (33). 3D7 *P. falciparum* cultures were enriched in gametocytes as described (34).

Treatment of *T. gondii* with cytoskeleton-specific drugs

Confluent HFF cells grown on coverslips were infected with RH tachyzoites for 24 h and treated with the dinitroaniline herbicide oryzalin (0.5, 1, or 2.5 μM) for 24 h (35), cytochalasin D (1 or 5 μM) for 30 min (36), or butanedione monoxime (20, 30, or 50 μM) for 1 h (36) before IF analysis.

IF

For most experiments, purified extracellular *Toxoplasma* cells were allowed to settle for 10 min on polylysine-coated coverslips. Suspensions of purified tachyzoites were processed for IF, with or without fixation and permeabilization, as mentioned in the text and figures. To visualize the plasma membrane and the inner membrane complex separately, extracellular tachyzoites were incubated in 5% glycerol in PBS for 30 min at 37°C on an orbital wheel, centrifuged at 2,000 rpm for 10 min, and suspended in PBS before being deposited on coverslips. For intracellular observations, HFF cells were grown to confluence on glass coverslips deposited on four-well plates and infected with the different strains of parasites. *Toxoplasma* cells as well as infected cells were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 (v/v) in PBS, and blocked using 10% FBS in PBS. Mouse brain cysts were permeabilized with a two-step temperature-shock treatment of 15 min in liquid nitrogen followed by 15 min at 37°C before being processed for IF. For *P. falciparum* 3D7 analyses, infected erythrocytes were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and immobilized on polylysine-coated slides. Fixed parasites were briefly permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS, and unspecific binding sites were blocked using 10% FBS in PBS. Parasites and infected cells were stained with the following primary antibodies: polyclonal anti-DGDG sera (1:25 or 1:50) (30), polyclonal rat anti-DGDG serum (1:25), polyclonal rabbit anti-IMC1 serum (1:500; a kind gift from C. Beckers, University of North Carolina) (37), polyclonal rabbit anti-GRA6 serum (1:500; a kind gift from L. D. Sibley, Washington University School of Medicine) (38), monoclonal TG19.179 anti-GRA2 antibody (1:500) (39), monoclonal TG054 anti-SAG-1 antibody (1:500) (40), monoclonal T8.4A12.1C3 anti-SRS9 antibody (previously called P36 or BSR4) (41), and polyclonal rat anti-*Cryptosporidium* serum (42). All antibodies were diluted in 1% FBS in PBS and detected using BODIPY or Texas Red-conjugated goat anti-mouse, anti-rabbit, or anti-rat IgG (H+L) antibodies (1:500) (Molecular Probes).

DNA was labeled with 0.5 μg/ml Hoechst (Molecular Probes) for 5–20 min. Coverslips were mounted with the ProLong Antifade Kit (Molecular Probes). Fluorescent images were acquired with an Axiocam MRm (Zeiss) on an inverted Axioplan 2 microscope (Zeiss), and images were acquired with the Axiovision 3.1 software (Zeiss). For *P. falciparum* analyses, parasites containing a single nucleus and lacking the digestive vacuole were considered as ring-stage parasites, those containing a single nucleus and a digestive vacuole were considered as trophozoite-stage parasites, and those containing two nuclei or more and a digestive vacuole were considered as schizont-stage parasites. Anti-DGDG antibodies were incubated at a 1:25 dilution in 10% FBS in PBS during 1 h, and secondary antibodies (either Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 592 goat anti-rabbit) were incubated using a 1:1,000 dilution in 10% FBS in PBS. Nuclei were labeled using Hoechst 33258 by a 5 min incubation at a 1:10,000 dilution in PBS. Detection of DGDG in *Arabidopsis* cells was carried out as described (31) with anti-DGDG at a 1:25 dilution. The fluorescence of chlorophyll (excitation, 543 nm) was collected at 652 nm. Coverslips were mounted with Immu-Mount (Thermo Electron Corp.). Fluorescent images were acquired with a MicroMax 1300 Y/HS charge-coupled device camera (Princeton Instruments) under the control of the Metavue imaging system (Universal Imaging Corp.) on an upright Leica DMRA2 microscope.

IEM

Immunolocalization of DGLE was achieved on extracellular tachyzoites as described (43). Human larynx carcinoma epithelial cells (Hep-2; ATCC-CCL 23) maintained in DMEM (Gibco),

PROOFS ONLY

Master Proof JLR m700476

supplemented with 10% FBS (Equitech-Bio) under a 5% CO_2 atmosphere at 37°C, were infected by *Toxoplasma* (infection ratio of 10 parasites to 1 host cell) tachyzoites for 24 h. Infected Hep-2 cells and isolated tachyzoites ($5–7 \times 10^7$/ml) were washed three times with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde containing 0.1% glutaraldehyde in serum-free PBS for 1 h at room temperature. Washed parasites were gradually dehydrated in ethanol and embedded in LR White resin (London Resin Co.), which was polymerized overnight, under ultraviolet light, at 4°C. Thin sections were mounted on Formvar-covered nickel grids. Immunolabeling was carried out at room temperature by flotation of the mounted sections on drops of each solution; to minimize nonspecific labeling, grids were incubated with PBS containing 1% skim milk and 0.05% Tween-20 (PBS-MT) for 30 min, and sections were incubated with the anti-DGDG rabbit polyclonal serum (dilution, 1:5 in PBS-MT) for 1 h at room temperature and overnight at 4°C. Grids were thoroughly washed with PBS-T (PBS + 0.05% Tween-20) and then incubated for 2 h at room temperature, with the corresponding secondary antibody (goat anti-rabbit polyclonal antibody) coupled to 10 nm gold particles (Axell) (dilution, 1:40 in PBS-T). Incubation with each antibody solution was performed in a humid chamber with intervening washes. After thorough washing in PBS and distilled water, sections were contrasted with 2% uranyl acetate and a satured solution of lead citrate and then examined with a transmission electron microscope (JEOL 2000 EX). As negative controls, sections were incubated with normal rabbit serum diluted in PBS-MT and then with the secondary antibody coupled to gold particles. As a positive control, sections were incubated with a rabbit polyclonal serum against a whole extract of *Toxoplasma* tachyzoites and then revealed with the secondary antibody coupled to gold particles. Immunolocalization of DGLE in tachyzoite cytoskeletal preparations was carried out as described (44).

Purification and analysis of *Toxoplasma* pellicle

Pellicle (inner membrane complex and plasma membrane) was purified from extracellular *Toxoplasma* parasites by sucrose gradient centrifugation and high-salt glycerol treatment as described (45–47).

Purification and analysis of *Toxoplasma* detergent-resistant membranes

Detergent-resistant membranes (DRMs) were isolated from *Toxoplasma* tachyzoites according to the procedure described previously (48).

Glycerolipid extraction, separation, and quantification

Lipids were extracted from *T. gondii* tachyzoites (2×10^9 cells) and from purified membrane fractions as described (49). Quantification of *Toxoplasma* glycerolipids was performed after methanolysis. Briefly, known amounts of C21:0 fatty acid were added to lipid extracts, then acyl esters were transesterified to the methyl esters and FAs were methylated using 3 ml of 2.5% H_2SO_4 in methanol for 1 h at 100°C. The reaction was stopped by the addition of 3 ml of water and 3 ml of hexane. The hexane phase was analyzed by gas-liquid chromatography (Perkin-Elmer) on a BPX70 (SGE) column. Retention times and peak intensities of fatty acid methyl esters were compared with those of standards. The obtained amount of fatty acids was used to calculate the initial glycerolipid content. Quantified lipids were dried under argon and frozen at −20°C for subsequent analyses.

Sterol extraction and quantification

Sterols (including cholesterol and steryl esters) were extracted and quantified by a resofurin-based fluorometric assay (Calbiochem) according to the manufacturer's instructions.

Acyl-lipid mass spectrometry analysis

Mass spectrometry analyses of *Toxoplasma* pellicle lipid extracts were carried out by injecting 2–20 nmol of total polar lipids per milliliter. Analyses were performed as described previously (13). The sample in chloroform-methanol-300 mM aqueous ammonium acetate (300:665:35) was infused into an Applied Biosystems Q-TRAP with an Advion Triversa microchip electrospray system at 0.11 μl/min (ionization voltage was set to 1.8 kV and gas pressure to 0.1 p.s.i.). Polar lipids from pellicle membranes were determined and quantified based on known amounts of internal standards for each lipid class: phosphatidic acid (PA), LysoPC, PC, ePC [alk(en)yl-acyl phosphocholine], LysoPE, PE, ePE [alk(en)yl-acyl phosphoethanolamine], phosphatidylinositol, phosphatidylserine (PS), ePS [alk(en)yl-acyl phosphoserine], MGDG, DGDG, Cer, EthCer (ceramide phosphoethanolamine), SM (also termed ChoCer or choline ceramide in this paper), and MHexCer and DHexCer. Amounts of lipids with masses coinciding with those of MGDG, DGDG, and PA include weak peaks close to the noise/contamination baseline. To identify potential glycolipids, scans to detect ions producing a neutral loss of 179 (i.e., loss of ammoniated hexose minus water or $[C_6H_{13}O_5N]$) or ions corresponding to neutral loss of 341 (i.e., loss of ammoniated dihexose minus water or $[C_{12}H_{23}O_{10}N]$) were performed. The final profile of acyl lipids, calculated in mol%, was normalized by taking into account the sterol content quantified in the initial sample.

Lipid nitrocellulose dot-blotting and immunolabeling with anti-DGDG sera

MGDG, DGDG, TriGDG, PE, PC, SL, DAG, PG, SM, MGCB, LCB, and total lipid extracts from spinach chloroplast envelope, HFF cells, and *Toxoplasma* were solubilized in butanol and spotted onto a nitrocellulose membrane. Membranes were saturated for 1 h in TBS (10 mM Tris, pH 7.5, and 9 g/l NaCl) complemented with 1% (w/v) nonfat dry milk, incubated with rabbit anti-DGDG serum (1:100), washed, and developed with a goat serum anti-rabbit IgG (H+L) coupled with horseradish peroxidase (1/10,000) (Sigma). For competition assays, anti-DGDG serum [100 μl, 1:100 in 1% (w/v) nonfat dry milk in TBS] was preincubated for 16 h at 4°C with 100 μg of DGDG purified from spinach. Peroxidase activity was revealed in 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 12.5 mM luminol (3-aminophalhydrazine), and 0.2 mM coumaric acid in the presence of H_2O_2. Autoradiography was performed with Hyperfilm ECL (Amersham).

Western blots

Proteins of whole cell extracts or obtained after pellicle fractionation were quantified (50) and separated by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were stained in isopropanol-acetic acid (3:1, v/v) containing 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (R-250; Sigma) or electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting. Membranes were blocked for 1 h with saturation solution (5% powdered milk, 5% goat serum, 0.05% Tween-20, and 0.05% Triton X-114 in PBS) and incubated for 1 h with primary antibodies: rabbit anti-DGDG serum (1:100), rabbit anti-IMC1 (1:5,000), or monoclonal TG 17.054 anti-SAG1 (1:5,000). After incubation with peroxidase-conjugated goat secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories), immunolabeled polypeptides were detected using the Supersignal ECL system (Pierce Chemical).

Proofs Only

Master Proof JLR m700476

RESULTS

Specific antibodies raised against spinach chloroplast DGDG react with a class of *Toxoplasma* lipids harboring a DGLE

Metabolic labeling experiments with radiolabeled UDP-galactose and acetate have demonstrated the synthesis of a lipid class comigrating with DGDG in *Toxoplasma* (24, 30). In the present study, we attempted to characterize this digalactolipid-like lipid and to provide additional information on its subcellular localization. We made use of rabbit polyclonal antibodies raised against DGDG homogeneously purified from spinach chloroplasts (30, 31). Anti-lipid antibodies are usually more difficult to manipulate than anti-protein antibodies (mainly because of the very different molecular size and hydrophobicity of lipids vs. proteins); they must be used at higher concentrations (dilution 1:100 in nitrocellulose immunostaining assays and 1:25 in IF experiments), require an accurate exposure of the lipid epitope (regions where the lipid is sufficiently concentrated), and cannot be easily purified without an existing method to accurately graft the lipid epitope on a purification matrix. For these reasons, we checked the validity of the experiments presented here with three independent rabbit and rat anti-DGDG sera, controlled the results with those obtained with preimmune serum, and carried out competitive labeling with homogeneously pure DGDG. In this study, the class of *Toxoplasma* lipids harboring a DGLE was named DGLE.

Figure 1 shows the results obtained with one of the rabbit anti-DGDG sera. Purified DGDG (10 μg) and total lipids from the spinach chloroplast envelope (200 μg) spotted on nitrocellulose membranes were used as positive controls for the immunostaining of lipids dot-blotted on nitrocellulose membranes (Fig. 1A). No signal was detected with DAG, phospholipids (PG, PC, PE), SM, monogalactolipids or trigalactolipids (MGDG, TriGDG), sulfoquinovosyldiacylglycerol (SL), MGCBs, or LCBs (Fig. 1A). Other than LCB, MGCB, and SM, all of these lipids share a DAG hydrophobic moiety with DGDG. Therefore, this immunoreactivity profile shows that the rabbit anti-DGDG antibodies react with the digalactolipid polar head. The rabbit polyclonal anti-DGDG antibodies consistently reacted with lipids extracted from the spinach chloroplast envelope and did not react with HFF lipids (200 μg) (Fig. 1A). As a negative control, preimmune serum failed to react with purified DGDG (10 μg), spinach chloroplast envelope lipids (200 μg), or *Toxoplasma* total lipids (200 μg) (Fig. 1B). Consistent with a previous report by Jouhet et al. (31), Fig. 1C shows that the rabbit anti-DGDG serum allows the specific detection of chloroplast membranes of permeabilized *Arabidopsis* cells (DGDG is not extracted from membranes in IF permeabilization treatments). The rabbit anti-DGDG serum did not show any significant cross-reactivity with total protein extracts from *Toxoplasma* or HFF proteins (Fig. 1D).

Figure 1E, F shows the reactivity of the rabbit anti-DGDG serum with *Toxoplasma* lipids. Preincubation of anti-DGDG with purified DGDG abolished the reactivity on purified DGDG and on *Toxoplasma* total lipid extract (Fig. 1E). These results showed that DGDG saturated the anti-DGDG antibodies of the rabbit serum and competed efficiently with the *Toxoplasma* lipids, highlighting the structural similarity between DGDG and DGLE polar heads. Thus, we reasonably supposed that DGDG and DGLE were immunostained with a similar intensity and that a dose-dependent immunoreactivity of the anti-DGDG rabbit serum with increasing amounts of spotted DGDG (Fig. 1F) allowed the relative quantification of DGLE in various *Toxoplasma* and HFF samples. Therefore, the DGLE proportion in *Toxoplasma* total lipids was estimated at ~0.25 mol% (Fig. 1F) and represents a minor lipid class.

A second rabbit and a rat were independently immunized with homogeneously pure DGDG according to the same procedure. The two additional sera obtained after immunization with DGDG reacted similarly with *Toxoplasma* DGLE (data not shown). Collectively, these results support the notion that both rabbit and rat polyclonal antibodies, raised against plant chloroplast DGDG, immunoreact with a class of *Toxoplasma* lipids whose polar heads share structural features with that of DGDG [i.e., terminated by a dihexosyl group structurally close to α-galactosyl (1→6)β-galactose]. Anti-DGDG sera have been used to investigate the subcellular localization of DGLE by IF and IEM experiments. In the experiments described below, results obtained with the first rabbit anti-DGDG serum are presented, except as indicated.

In extracellular *Toxoplasma* parasites, DGLE is localized in membrane domains, at the surface of the plasma membrane, and in the inner membrane complex

To localize DGLE in extracellular parasites, freshly lysed tachyzoites were labeled with the rabbit anti-DGDG serum without any fixation and permeabilization and then observed by epifluorescence. In parallel, parasites were fixed, permeabilized with Triton X-100, and labeled with anti-DGDG (**Fig. 2A**). IF images were captured and signal intensity was enhanced using Axiovision 3.1 software (Zeiss). Preimmune serum did not allow any labeling (Fig. 2A, left). The absence of labeling with anti-IMC1, an antibody raised against an inner membrane protein (IMC-1) (37), was used as a control for plasma membrane integrity (Fig. 2A, right). DGLE was localized with a dotted pattern at the parasite periphery, independently of the permeabilization step (Fig. 2A, center). A series of images focused at the top, medial, and bottom sections of the same parasite showed that the dotted patterns of both non-permeabilized and permeabilized parasites were scattered around the parasitic surface (Fig. 2B) and that no intense labeling could be detected in central compartments of the cell.

To refine the localization of DGLE at the cell periphery, extracellular tachyzoites were treated with 1% glycerol to allow local swelling and osmotic separation of the plasma membrane from the inner membrane complex. Under these conditions, the plasma membrane forms small blebs at the cell surface. Figure 2C shows that the rabbit anti-DGDG serum labeled both the plasma membrane

Proofs Only

Master Proof JLR m700476

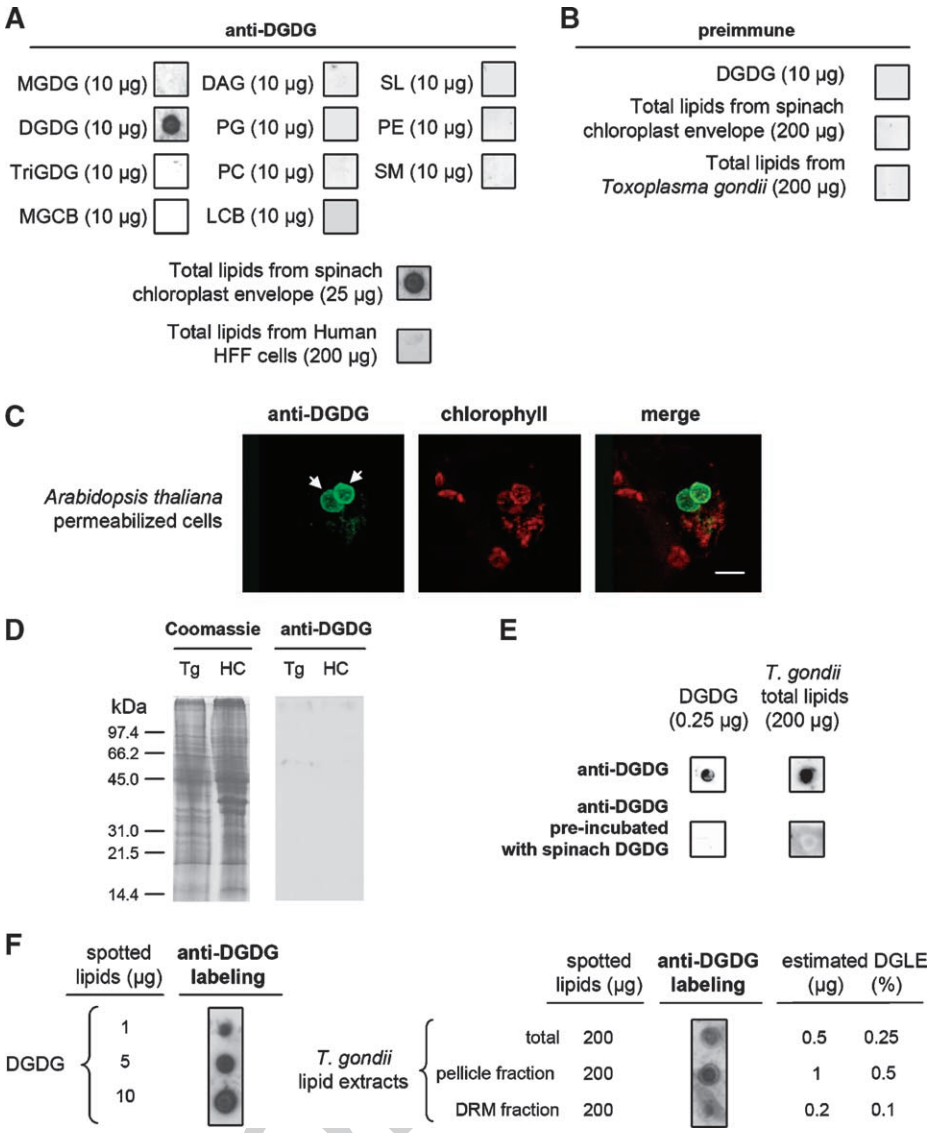


Fig. 1. Immunoblot analyses of lipid standards and *T. gondii* lipid extracts using rabbit anti-digalactosyldiacylglycerol (DGDG) polyclonal antibodies. A: Immunoreactivity of the rabbit anti-DGDG serum toward lipid standards (10 µg) [i.e., diacylglycerol (DAG), DGDG, lactocerebroside (LCB), monogalactosylcerebroside (MGCB), monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), trigalactosyldiacylglycerol (TriGDG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), sulfolipid (SL), and sphingomyelin (SM)] and total lipids purified from spinach chloroplast envelope (25 µg) and human foreskin fibroblast (HFF) cells (200 µg). To assess the specificity of the anti-DGDG serum, purified DGDG and total lipids from the spinach chloroplast envelope were used as positive controls. No signal was detected with spotted DAG, phospholipids (PG, PC, and PE), sphingolipid (MGCB, LCB, and SM), or simple glycoglycerolipids such as galactolipids (MGDG and TriGDG) or sulfoquinovosyldiacylglycerol (SL). Therefore, this immunostaining profile shows that the anti-DGDG antibodies react with the lipid polar head. B: Immunoreactivity of the preimmune serum against purified DGDG (10 µg), total spinach chloroplast envelope (200 µg), or total *T. gondii* lipids (200 µg). C: Immunofluorescence (IF) immunostaining of chloroplasts, in permeabilized *Arabidopsis* cells, with the rabbit anti-DGDG serum. D: SDS-PAGE of protein extracts from *Toxoplasma* parasites (Tg) and from HFF host cells (HC) revealed either by Coomassie blue staining (Coomassie) or by immunoblot analysis with the rabbit anti-DGDG serum. E: Immunoreactivity of the rabbit anti-DGDG serum, preincubated for 12 h with purified DGDG, with purified DGDG (0.25 µg) or total *T. gondii* lipids (200 µg) (lower lane) and immunoreactivity of the untreated rabbit serum anti-DGDG with the same lipids (upper lane). This result highlights the very high structural similarity between the DGDG epitopes and the digalactolipid-like epitope (DGLE). F: Dose-dependent reactivity of the rabbit serum anti-DGDG to increasing quantities of purified spinach DGDG (1, 5, or 10 µg) spotted on a nitrocellulose membrane. Supposing that DGDG and DGLE were immunostained with a similar intensity, the dose-dependent immunoreactivity of the anti-DGDG rabbit serum allowed a relative quantification of DGLE in various *Toxoplasma* samples. Total lipid extracts from *T. gondii* (200 µg) as well as pellicle (200 µg) and raft (200 µg) lipid extracts were spotted onto nitrocellulose membranes and probed with the rabbit anti-DGDG serum. DRM, detergent-resistant membrane.

web & print 4C/FPO

166
Master Proof JLR m700476

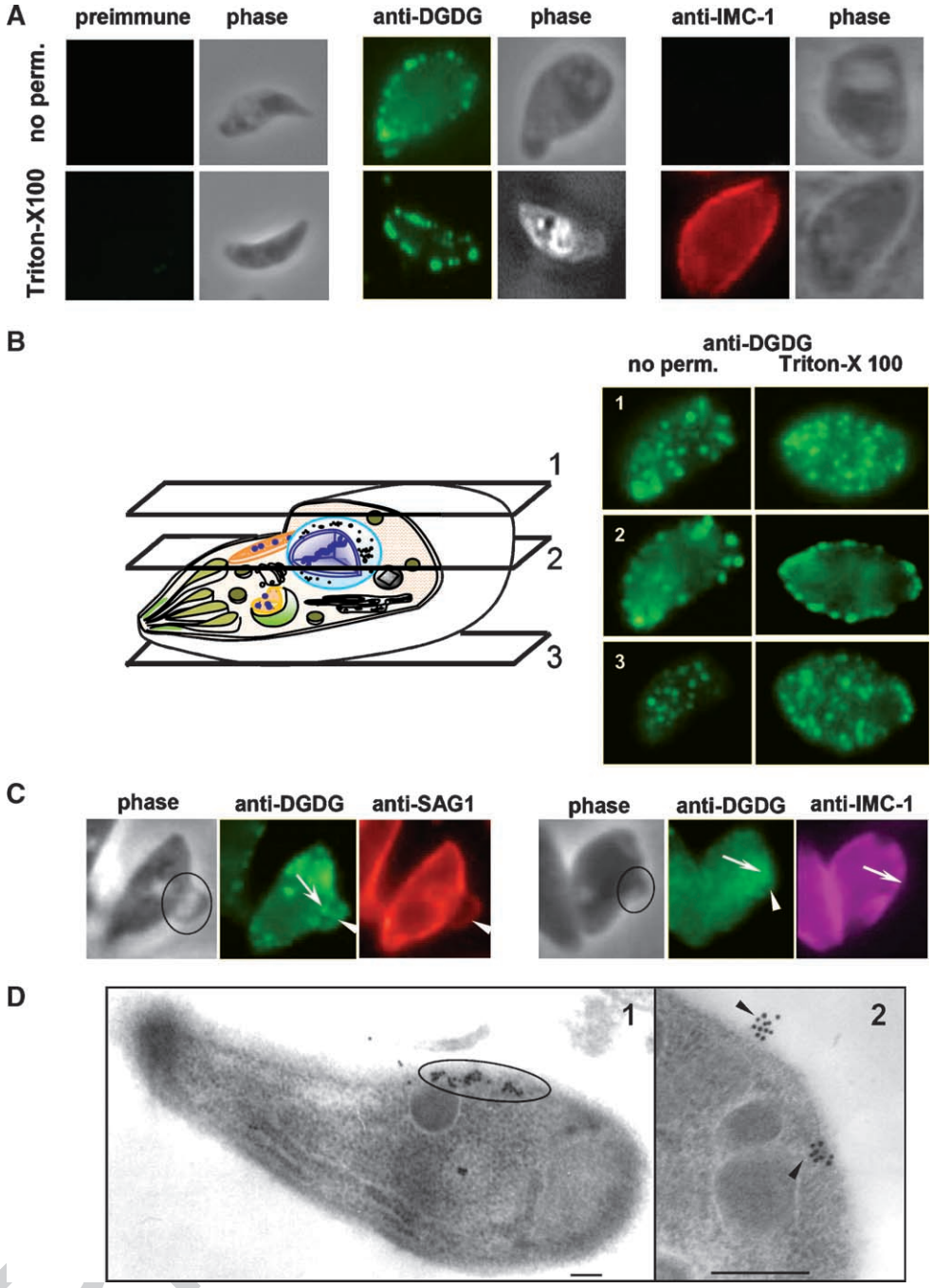


Fig. 2. Immunolocalization of DGLE in extracellular *T. gondii* tachyzoites. A: IF analysis of DGLE in extracellular parasites. Freshly lysed tachyzoites were labeled with rabbit preimmune (left) or anti-DGDG (center and right) serum without any fixation and permeabilization (no perm.) and then observed by epifluorescence. In parallel, parasites were fixed, permeabilized with Triton X-100, and then labeled with anti-DGDG (Triton X-100). The absence of labeling with anti-IMC-1 was used as a control for the absence of cell permeabilization. B: Three-dimensional distribution of DGLE in extracellular *T. gondii*. Immunofluorescence was analyzed by adjustment of imaging focus at the top (1), medial (2), or bottom (3) sections of the same parasite. DGLE is detected as microdomains at the parasite periphery. C: IF analysis of DGLE in the plasma membrane and inner membrane complex after pellicle physical membrane separation. Parasites were treated with 1% glycerol for 1 h, allowing physical separation of the plasma membrane (arrowheads) from the inner membrane complex (arrows) and producing plasma membrane blebs (circles). Treated parasites were colabeled with both monoclonal anti-SAG1 antibody (red) and rabbit anti-DGDG serum (green) or with both rabbit anti-IMC1 (purple) and rat anti-DGDG (green) sera. D: Immunogold labeling of extracellular parasites with rabbit anti-DGDG serum. 1, Labeling at the level of the pellicle (circle). 2, Dotted labeling at the surface of the plasma membrane and at the level of the inner membrane complex (arrowheads). Bars = 500 nm.

web & print 4C/FPO

Master Proof JLR m700476

(colabeling with antibodies raised against the surface protein SAG1) and the inner membrane complex (colabeling with antibodies raised against IMC-1). When freshly isolated parasites were immunogold-labeled with the rabbit anti-DGDG serum, DGLE was consistently detected at the cell periphery (Fig. 2D, panel 1) and exposed at the plasma membrane surface or within the inner membrane complex (Fig. 2D, panel 2).

To assess the localization of DGLE in the pellicle, extracellular parasites were fractionated on sucrose gradients (45) to obtain pellicle-enriched fractions (**Fig. 3A**). Proteins from these fractions were analyzed by Western blot using compartment markers: clear enrichments in both SAG1 and IMC1 were observed in the pellicle fraction (Fig. 3A). When lipids were extracted, spotted onto nitrocellulose, and probed with the rabbit anti-DGDG serum, DGLE was immunodetected (Fig. 3A). DGLE represented ~0.5% of the total lipid content of the pellicle fractions (Fig. 1F).

Attempt to assess the structure of DGLE by mass spectrometry lipidomic analysis of the pellicle membranes purified from extracellular *Toxoplasma*

We analyzed the lipid profile of the pellicle-enriched fraction by mass spectrometry and attempted to identify DGLE candidate(s) in the minor peaks corresponding to accurate glycolipidic structures (Fig. 3B). The amounts of the main phospholipids, and *Toxoplasma*-specific enrichment in phosphoethanolamine ceramide, confirmed previous analyses performed on whole parasites (13, 24). Based on immunoblot analyses, the proportion of lipids reacting with the antisera was estimated to be in the range of 1.2–6 nmol/mg total glycerolipids. Immunolabeling of DGLE is consistent with *1*) the occurrence of DGDG but also with *2*) digalactolipids having an alternative hydrophobic moiety (i.e., acylalkylglycerol or ceramide; Fig. 3B) and *3*) dihexosyl lipids that might be cross-detected by the antibody but harboring different sugars, such as Glc, GalNAc, or GlcNAc. Furthermore, we cannot exclude the possibility that antibodies react with *4*) more complex glycolipids terminated by a dihexosyl group. Here, we particularly examined nonsubstituted monohexosyl and dihexosyl lipids. Scans for neutral loss of 179 [i.e., loss of ammoniated hexose minus water ($C_6H_{13}O_5N$)] or neutral loss of 341 [i.e., loss of ammoniated dihexose minus water ($C_{12}H_{23}O_{10}N$)] produced a few peaks close to the detection thresholds in the MGDG/MGAAG (700–900) or DGDG/DGAAG (890–1,050) mass ranges, respectively. In the neutral loss 179 scan, consistent with the loss of one hexosyl residue, minor peaks were detected at *m/z* 732, 734, 760, 764, 776, 792, and 804. In the neutral loss 341 scan, consistent with the loss of two hexosyl residues, minor peaks were detected at *m/z* 894, 896, 908, 910, 922, 936, 954, and 966. These weak peaks might be attributable to the occurrence of hexosyl diacyl lipids in the sample in the low picomole range, consistent with the quantity detected in the immunostaining dot-blot experiments. Some of the weak peaks, including those at *m/z* 894, 896, and 922, are distinct from the standard galactolipids and could correspond, as $[M + NH_4]^+$, to alk(en)yl-acyl dihexosylglycerolipids.

In contrast with glycosylated glycerolipids, the monohexosylceramides and dihexosylceramides were detected in higher quantity (Fig. 3B). Among dihexosylceramides, digalactosylceramide could contribute to the binding of anti-DGDG antibodies, particularly if the digalactosyl conformation resembles that of the DGDG polar head [α-galactosyl(1→6)β-galactose].

Although the low abundance of DGLE is a technical limitation for global characterization, in the range of low-level contamination in the mass spectrometer, so that no conclusive result could be drawn regarding the structure of the DGLE hydrophobic moiety, mass spectrometry lipidomic analyses indicate the clear presence of dihexosyl lipids with a ceramide moiety and allow for the possibility of other hydrophobic moieties (DAG, acylalkylglycerol) at low levels. Any of these structures may represent the DGLE that reacts with the anti-DGDG antibodies.

During host cell invasion and endodyogenic multiplication, DGLE relocates to the anterior tip of the *Toxoplasma* cells

Localization of DGLE was analyzed during intracellular parasite development. **Figure 4A** shows that the preimmune serum did not react with human or *Toxoplasma* cells. Because the parasite population was not synchronized at the time of host cell invasion, different stages of parasite development were observed on the same slide at 24 h after infection. Figure 4B summarizes these observations. At the time of host cell invasion, when the parasite squeezes through the moving junction (51), a relocalization of DGLE was observed. At the posterior end of the parasite (Fig. 4B, panel 1), which was still outside the host cell, a dotted labeling was observed, reminiscent of that observed at the surface of extracellular parasites (Fig. 2). By contrast, concentration of DGLE was observed in the apical part of the parasite, which was already inside the intracellular forming vacuole. Early after vacuole formation, *Toxoplasma* is known to accumulate at its posterior end the dense granule protein GRA2 (4). Colabeling of recently invaded parasites with anti-DGDG rabbit antibodies, a monoclonal anti-GRA2, and Hoechst reagent showed that DGLE was concentrated opposite to GRA2 (i.e., at the anterior part of the parasite) (Fig. 4C). Together, Fig. 4B, C show that after invasion and the formation of the parasitophorous vacuole, DGLE relocates rapidly to the anterior tip of the parasite.

During the first division of the parasite (Fig. 4B, panel 2), DGLE remained concentrated as a gradient at the anterior of the mother cell and was also detected in duplicated structures at the apex of the daughter cells. Colabeling with anti-DGDG rat serum and monoclonal anti-IMC1 (Fig. 4D) showed that DGLE did not fully overlap with IMC1, the localization of which follows the complete inner membrane complex of daughter cells (Fig. 4D, arrowheads). Therefore, anti-DGDG/anti-IMC1 colabeling highlights a gradient of DGLE at the anterior part of the inner membrane complex. DGLE participation in apical pole devel-

Proofs Only

168
Master Proof JLR m700476

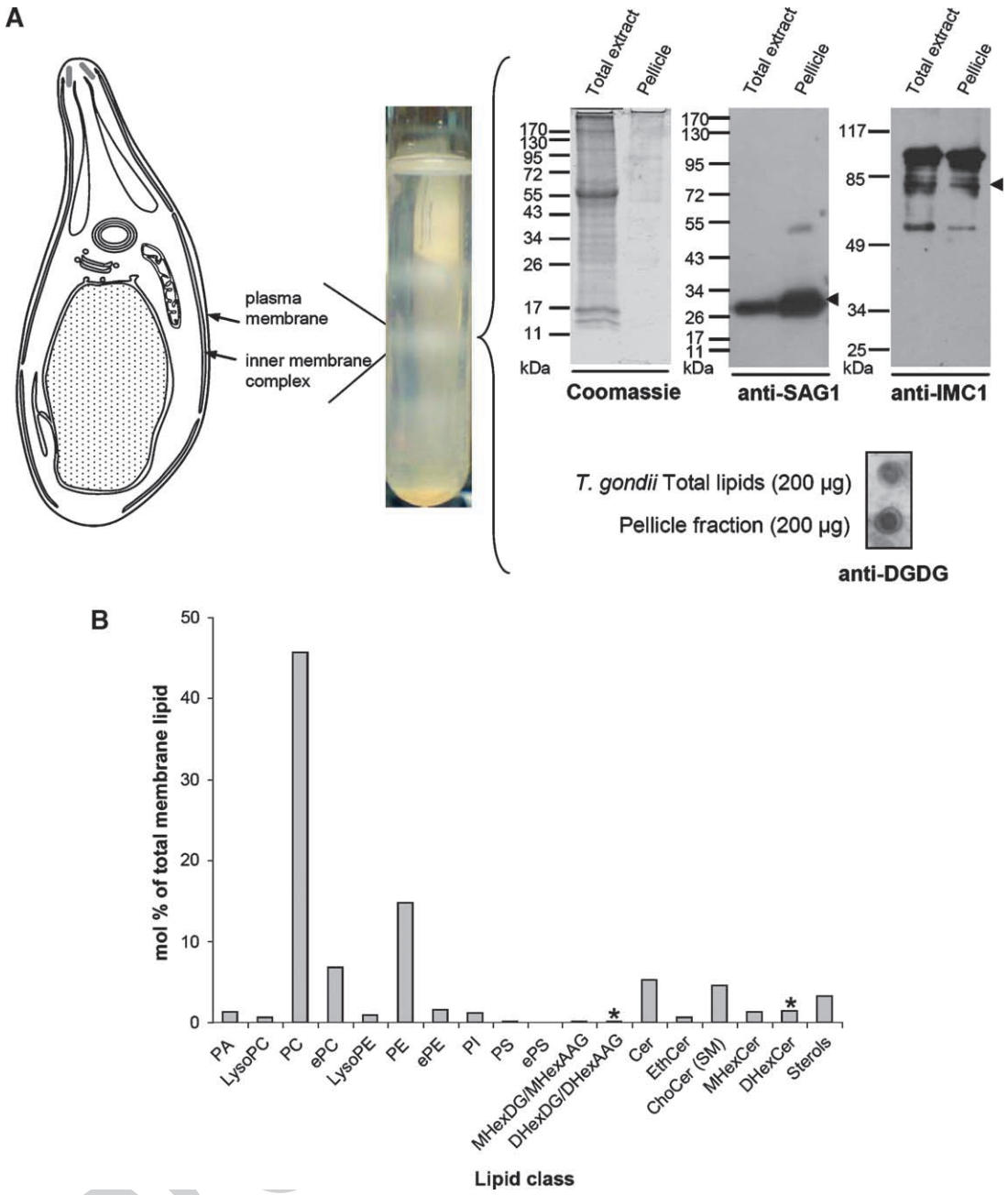


Fig. 3. Lipid analyses of pellicle fractions purified from extracellular *T. gondii* tachyzoites. A: Purification of pellicle membranes. Pellicle membranous structures were fractionated from extracellular *T. gondii* tachyzoites (scheme at left) after isopycnic centrifugation on a saccharose gradient (center). Enrichment in pellicle-specific proteins (Pellicle) was assessed by immunoblot analysis using plasma membrane and inner membrane complex markers (i.e., monoclonal anti-SAG1 and rabbit anti-IMC1 serum). Loaded samples (Total extract and Pellicle) correspond to the same initial amount of unfractionated and fractionated parasites (10^8 parasites). Lipids were extracted and 200 µg was analyzed by immunoblot with rabbit anti-DGDG serum. B: Lipid profile of *Toxoplasma* pellicle membranes. Polar lipids from pellicle membranes were analyzed by mass spectrometry and quantified based on known amounts of internal standards for each lipid class. Sterols (including cholesterol and steryl esters) were quantified by a resofurin-based fluorometric assay. The histogram gives average values of two series of quantifications. Glycosylated lipids were analyzed based on the presence of one or two hexosyl residues on the polar head, consistent with the structure of one or two galactosyl residues. Lipids that might terminate by an α-galactosyl(1→6)galactose and be detected by anti-DGDG antibodies are labeled with asterisks. Amounts of MHexDG/MHexAAG, DHexDG/DHexAAG, and PA include weak peaks corresponding to structures that were not verifiable as belonging to these classes. PA, phosphatidic acid; LysoPC, lyso-phosphatidylcholine; ePC, ether-linked PC [i.e., alk(en)yl, acyl PC]; LysoPE, lyso-phosphatidylethanolamine; ePE, ether-linked PE [i.e., alk(en)yl, acyl PE]; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; ePS, ether-linked PS [i.e., alk(en)yl, acyl PS]; MHexDG, monohexosyldiacylglycerol (including MGDG); MHexAAG, monohexosyl-alk(en)yl-acyl glycerol (including MGAAG); DHexDG, dihexosyldiacylglycerol (including DGDG); DHexAAG, dihexosyl-alk(en)yl-acyl glycerol (including DGAAG); Cer, ceramide; EthCer, phosphoethanolamine ceramide; ChoCer; phosphocholine ceramide or SM; MHexCer, monohexosylceramide (including galactosylceramide); DHexCer, dihexosylceramide (including digalactosylceramide).

web & print 4C/FPO

Master Proof JLR m700476

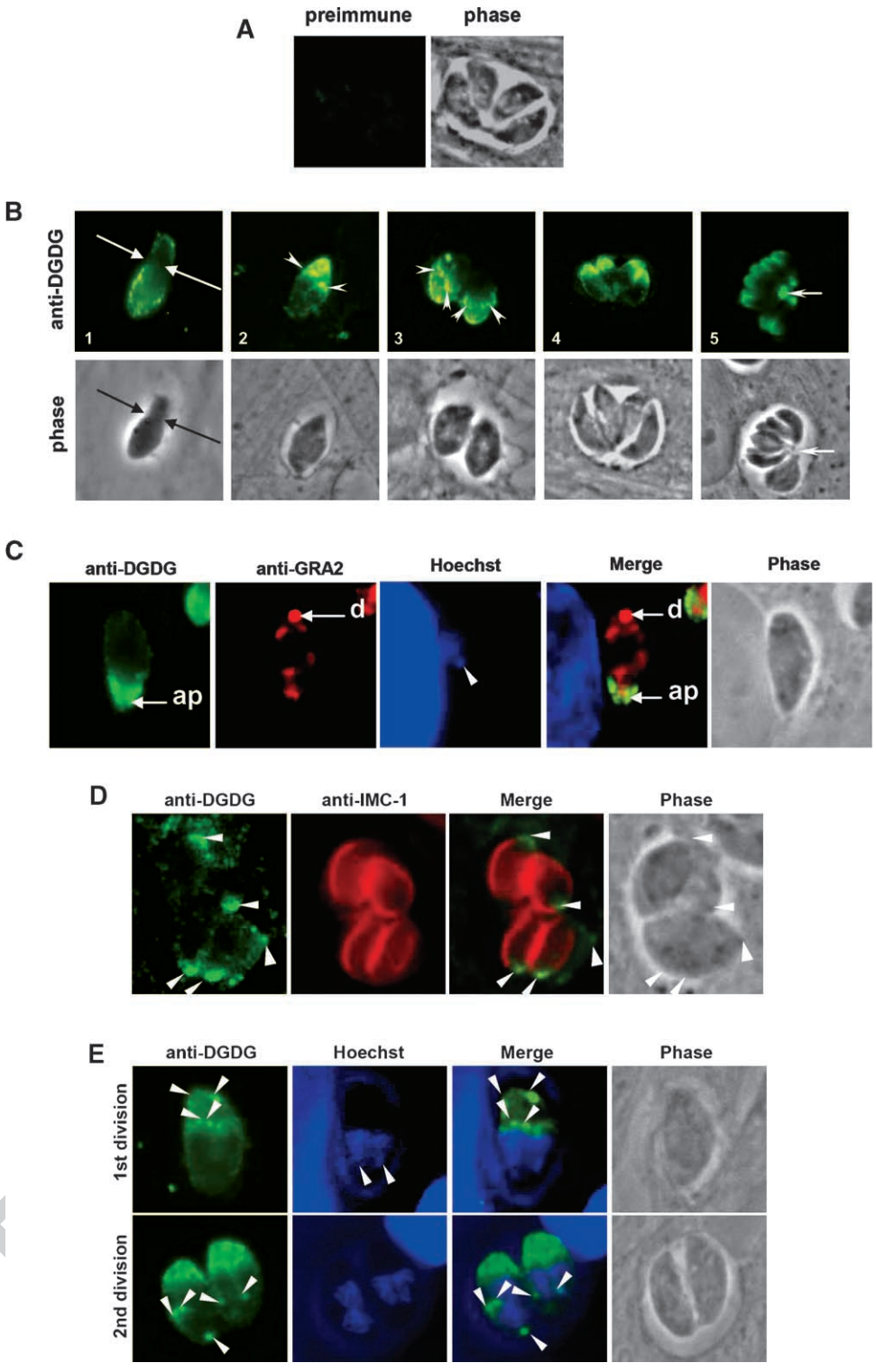


Fig. 4. Immunolocalization of DGLE in intracellular parasites. A: Immunostaining of intracellular parasites with preimmune serum. B: Sequence of intracellular parasites labeled with rabbit anti-DGDG. 1, Arrows indicate the moving junction. 2, 3, Arrowheads indicate the anterior tip of daughter parasites forming within the mother cell. 5, The arrow shows the intravacuolar residual body. C: Parasites recently invaded (<1 h) and colabeled with rabbit serum anti-DGDG, monoclonal anti-GRA2, and Hoechst reagent. ap, anterior part of the intracellular parasite; d, posterior GRA2 dot. The arrowhead indicates the apicoplast nucleic content. D: Colabeling of dividing intracellular parasites with both rat anti-DGDG serum and rabbit anti-IMC1 serum. Arrowheads indicate the anterior part of parasites, including those of daughter cells. E: Colabeling of dividing parasites with rabbit anti-DGDG serum and Hoechst reagent. Arrowheads indicate localizations where DGLE is concentrated in dividing parasites.

web & print 4C/FPO

Master Proof JLR m700476

opment was further supported by superimposition of the divided nucleus and the anti-DGDG labeling shaping the future apical inner membrane complex of daughter parasites (Fig. 4E). During the subsequent rounds of division (Fig. 4B, panels 3–5), DGLE localization was similar, at the anterior tips of the parasites and of their dividing daughter cells. After division, parasites remain attached to each other by a vacuolar structure known as the residual body, which contains remnants of the mother parasites (52). Within the vacuolar compartment, DGLE was detected at the level of this residual body but was not detected in any other vacuolar membrane, as shown by IF (Fig. 4B, panel 5).

DGLE localization in membrane domains of the parasite pellicle is affected by the depolymerization of parasite actin

Because DGLE was localized in patches at the parasite periphery of extracellular parasites and at the anterior tip of intracellular parasites, where it remained during endodyogeny, we addressed the question of a possible clustering of DGLE in DRMs (or rafts) and the potential relation with the parasite cytoskeleton.

DRMs were isolated from extracellular parasites, according to the protocol recently reported by Azzouz et al. (48). Sterol and steryl ester quantification demonstrated a consistent enrichment in the DRM fraction (11.35 mol% of the membrane lipids) compared with the pellicle fraction (3.3 mol%). When lipid extract from the DRM fraction was spotted onto nitrocellulose and incubated with the rabbit anti-DGDG serum, DGLE was detected: the DGLE content of the DRM fraction was estimated at ~0.1%, based on the intensity of the immunostaining with anti-DGDG antibodies (Fig. 1F). Because this proportion is lower than that of pellicle lipids (i.e., 0.5%) (Fig. 1F), this analysis shows that the DGLE membrane domains visualized by imaging experiments do not coincide strictly with sterol-rich DRMs.

To characterize the possible relation of DGLE membrane domains with the cytoskeleton, various treatments with cytoskeleton-destabilizing drugs, either depolymerizing microtubules (oryzalin) or actin (cytochalasin D) or affecting myosin A (butanedione monoxime), were carried out before DGLE visualization (**Fig. 5A, B**). Oryzalin or butanedione monoxime treatment did not change the distribution of DGLE at the anterior part of the parasite (Fig. 5A, left and central panels). By contrast, treatment of infected cells with cytochalasin D resulted in the redistribution of DGLE to the periphery of the cell (Fig. 5A, right panel). These results suggest that DGLE might be directly or indirectly linked to parasite polymerized actin, which is atypically localized between the plasma membrane and the inner membrane complex in Apicomplexa (53), and that DGLE does not interact with microtubules or myosin A.

Actin filaments are particularly difficult to observe in apicomplexan parasites (53). Nevertheless, filamentous actin was recently detected as short filaments located between the subpellicular network and the plasma membrane of *Toxoplasma* (44). When preparations of parasite subpellicular network, known to preserve both microtubules and filamentous actin, were incubated with the rabbit anti-DGDG serum, labeling was observed at the extreme tip of the conoid (Fig. 5C, panels 1, 2), along the subpellicular microtubules (Fig. 5C, panel 3), and along the whole cell surface (Fig. 5C, panels 4, 5). These observations further support a possible association of DGLE with parasite filamentous actin.

Search for DGLE in other apicomplexan parasites

We examined the possible occurrence of DGLE in other apicomplexan parasites (**Fig. 6**). A distribution pattern similar to that observed in *Toxoplasma* was detected in the closely related apicomplexan parasite *N. caninum* (Fig. 6A). DGLE was also detected in *C. parvum*, an Apicomplexa without plastid (Fig. 6B). In *P. falciparum*, the main malarial parasite, DGLE was detected, with a subcellular localization that appeared to be remodeled along parasitic stages in the human host (Fig. 6C). In ring stages, DGLE showed a crescent-like distribution as marginal or peripheral dots (Fig. 6C, panels 1, 2). Trophozoite-stage parasites (Fig. 6C, panel 3) exhibited DGLE domains at the cell periphery. A localization of the DGLE at the level of the developing merozoite membranes was then observed in the schizont-stage parasites (Fig. 6C, panels 4, 5). Eventually, an inner membrane complex-like distribution was observed in the gametocyte stage, with a regular network of superficial dots (Fig. 6C, panel 6). We further detected DGLE in *Babesia divergens* (data not shown). We did not detect DGLE in *Trypanosoma brucei*, a nonapicomplexan unicellular parasite (data not shown). Together, these results show that the anti-DGDG serum labels a lipid found in numerous parasites of the Apicomplexa phylum. In all cases, DGLE appears to be clustered in membrane domains at the cell periphery and to be mobilized at the anterior tip upon invasion.

DISCUSSION

The presence of a plastid in *Toxoplasma* suggested that MGDG and DGDG, the main chloroplast and cyanobacteria lipids (27–29), might also be important constituents of the apicoplast membranes. In plants and algae, MGDG and DGDG are synthesized within plastid envelope membranes (29, 31, 54–58). In plants, MGDG is produced by the galactosylation of DAG, whereas it is generated by a two-step glucosylation and epimerization in cyanobacteria (59). In both plants and cyanobacteria, DGDG is formed by the addition of a galactosyl residue to MGDG (29, 54). Upon phosphate deprivation, DGDG is exported outside plastids to the plasma membrane (60) and the mitochondria (31). No MGDG synthase or DGDG synthase homologous sequences could be detected in the genome of some plastid-containing organisms, such as *Euglena*, in which MGDG and DGDG are well-established constituents (61), suggesting that their synthesizing enzymes might have strongly diverged during evolution. Searching both *Toxoplasma* and *Plasmodium* databases did not reveal any gene candidate for MGDG synthesis, leaving the question of the monogalactolipid-synthesizing enzymes unresolved. A

Proofs Only

Master Proof JLR m700476

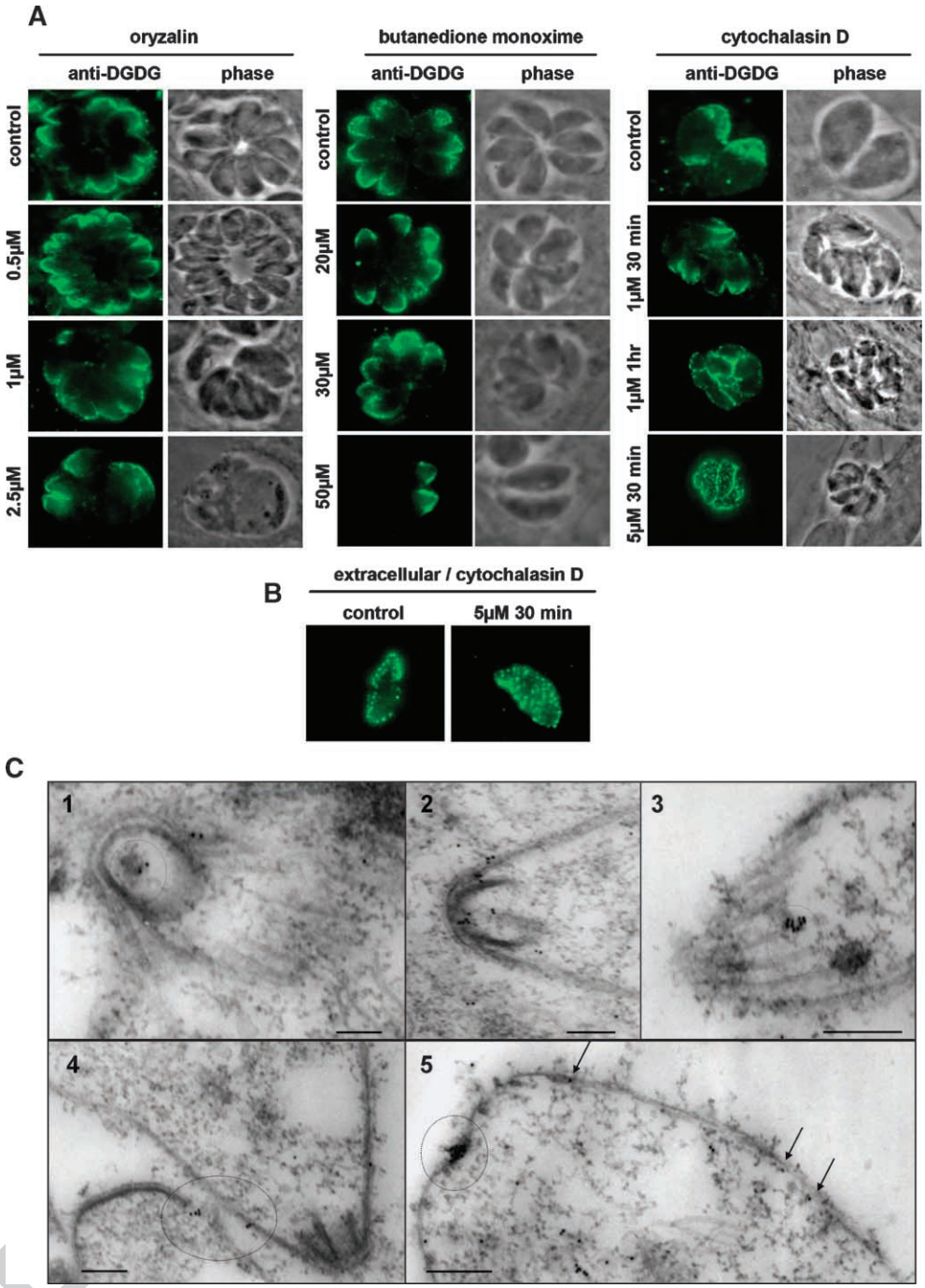


Fig. 5. Analysis of the relation between DGLE pellicle membrane domains and the *T. gondii* cytoskeleton. A: Evolution of DGLE pellicle membrane domains after chemical impairment of the *T. gondii* cytoskeleton of intracellular tachyzoites with oryzalin, butanedione monoxime, and cytochalasin D. Infected cells were treated with oryzalin, a tubulin-destabilizing agent, butanedione monoxime, a myosin A binding drug, or cytochalasin D, an actin-depolymerizing factor. After labeling with rabbit anti-DGDG serum, a relocalization of DGLE similar to that observed in extracellular parasites was observed only under conditions in which actin filaments were disrupted. DGLE membrane domains formed spontaneously after the cytochalasin D time course. B: Evolution of DGLE pellicle membrane domains after treatment of the *T. gondii* cytoskeleton of extracellular tachyzoites with cytochalasin D. Extracellular parasites were treated with 5 μM cytochalasin D for 30 min and labeled with rabbit anti-DGDG serum. No apparent change in DGLE localization was observed. C: Immunogold labeling of the parasite subpellicular network with the rabbit anti-DGDG serum. Immunolocalization of DGLE in cytoskeletal preparations was carried out as described (44). DGLE is concentrated mainly at the extreme tip of the conoid (1, circle) as well as along the inner membranes, in close proximity to subpellicular microtubules, which are preserved after detergent treatment (2–4, arrows and circles). DGLE was also found concentrated at the posterior end (5, circle). Bars = 200 nm.

web & print 4C/FPO

Master Proof JLR m700476

web & print 4C/FPO

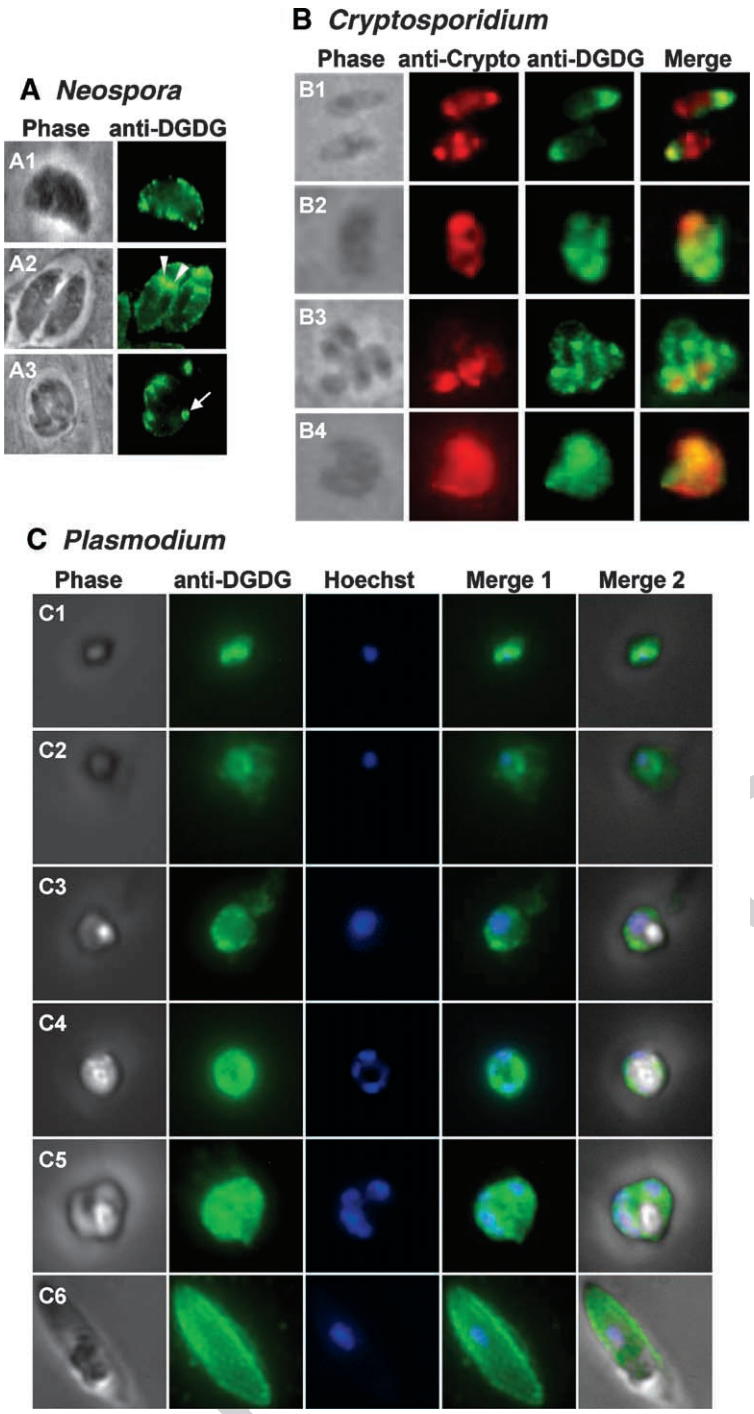


Fig. 6. Localization of DGLE in *N. caninum*, *C. parvum*, and *P. falciparum*. A: Immunolabeling of *N. caninum* tachyzoites with rabbit anti-DGDG serum. A1, Recently invaded tachyzoite. A2, Replicating pair of parasites. A3, Vacuole containing four parasites. Arrowheads indicate the newly formed parasites within the mother cell; the arrow shows the intravacuolar residual body. B: Immunolabeling of *C. parvum* cells with both rabbit anti-DGDG serum and rat anti-*Cryptosporidium* serum. B1, Extracellular sporozoites exhibiting an apical distribution of DGLE. B2, B3, DGLE localization at the periphery of intracellular sporozoites, with stronger presence at the apical pole. B4, Distribution of DGLE at the membrane of the meront-stage parasites. C: Distribution of DGLE during the asexual cycle of *P. falciparum*. Cultures of *P. falciparum*-infected red blood cells were fixed and permeabilized using Triton X-100. Immunolabeling was performed using anti-DGDG antibody, and nuclei were stained with Hoechst 33258. Acquisitions were ordered according to the life stage of the parasites. C1, C2, A crescent-like distribution of DGLE as marginal dots was observed in the ring stages. C3, The DGLE distribution is localized as peripheral dots close to the membranes of the trophozoite-stage parasites. C4, C5, Reorganization of DGLE to the developing merozoite membranes in schizont-stage parasites. C6, An inner membrane complex-like distribution as well as reticulated superficial dots were observed in the gametocyte stage.

single gene in *Toxoplasma* (49.m00002; PF10_0316 in *P. falciparum*), coding for a 624 amino acid protein, contains a 387 amino acid segment with ~24% identity with cyanobateria dgdA, a 389 amino acid DGDG synthase (*Synechocystis* slr1508) (62), and also has strong homology with lipopolysaccharide glycosyltransferases involved in glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis. This gene might encode an enzyme of broad specificity catalyzing the synthesis of DGLE and should be functionally analyzed in the future.

Here, we used specific polyclonal antibodies from rabbit or rat, raised against plant DGDG, to investigate the occurrence and cell dynamics of a class of lipids harboring a DGLE in *Toxoplasma* and other Apicomplexa. We did not detect any reactivity of any of the anti-DGDG antibodies with mammalian lipid extracts or cell membranes. Analysis of the anti-DGDG specificity assessed by nitrocellulose immunostaining experiments (Fig. 1) shows that the antibodies have no significant cross-reactivity with *Toxoplasma* proteins and that they do not specifically bind to the hydrophobic moiety of DGDG (i.e., the DAG structure). Because preincubation of the antibodies with DGDG competes with both chloroplastic and *Toxoplasma* lipids, a strong structural similarity to the polar head of DGDG seems

173
Master Proof JLR m700476

required for the antibody binding. Based on these analyses, DGLE detected in *Toxoplasma* lipid extracts is possibly a dihexosyl lipid whose polar head is close to an α-galactosyl(1→6)β-galactose and, based on previous metabolic analyses (24, 30), whose hydrophobic moiety contains at least one hydrolyzable acyl ester (30). We do not exclude the possibility that other lipid structures, with a more complex polar head terminated by a dihexosyl group, might also be detected using anti-DGDG antibodies.

Inconsistent with the initial idea sustaining the search for chloroplast galactolipids in Apicomplexa, none of our IF or IEM experiments allowed the detection of DGLE in an internal structure of *Toxoplasma* that resembles the apicoplast. Galactolipid lower abundance, epitope distribution, or access of antibodies to internal membranes might not allow immunodetection in this organelle (Fig. 4C). Galactolipids might be synthesized by apicoplast enzymes but rapidly exported to other cell compartments, in a similar manner to which DGDG is exported outside chloroplasts in phosphate-deprived plants (31, 60). Alternatively, evolution of the galactolipid synthetic machinery might have occurred with relocation outside the apicoplast, or it may be completely independent on any chloroplast-related process. In extracellular life stages of *Toxoplasma*, DGLE was detected at the periphery of the cell by both IF and IEM imaging, partly exposed at the surface of the plasma membrane (Fig. 2A, B, D), but also in the inner membrane complex (Fig. 2C, D). Localization in pellicle membranes was confirmed by immunostaining of lipid extracts of pellicle-enriched fractions (Fig. 3A). Therefore, DGLE appears as a minor constituent of the pellicle of tachyzoites, with a dotted or patched pattern that suggests a concentration in membrane domains.

Upon invasion, DGLE relocates to the anterior part of the cell (Fig. 4). Interestingly, we could apparently reverse the relocation of DGLE by treating intracellular *Toxoplasma* with cytochalasin D, an actin-depolymerizing agent (Fig. 5A). This result suggests that DGLE relocation might be directly or indirectly determined by actin-dependent processes and that DGLE might be a factor of the invasion mechanism. In the current understanding of invasion, conserved multiprotein machineries are involved, including both the parasite acto-myosin motor located between the parasite plasma membrane and the inner membrane complex and the microneme secretory apparatus (44, 52, 63). During invasion, adhesive transmembrane proteins (secreted from micronemes) bind to the host cell. These adhesive proteins are linked to the invasive motor via an interaction between their cytoplasmic tail and aldolase, which in turn interacts with actin linked to myosin A. The unconventional myosin A is rigidly anchored to inner membrane complex proteins (IMC-1 and IMC-3) through an interaction with protein intermediates, which include the myosin A-interacting protein (MTIP in *Plasmodium* and MLC1 in *Toxoplasma*) and the gliding-associated proteins of 45 and 50 kDa (GAP45 and GAP50). The cytosolic face of the inner membrane complex is then associated directly with 22 subpellicular microtubules, which maintain the parasite shape and which are also involved in the cell-gliding motility (44, 52, 63). Therefore, DGLE that rapidly moves to the anterior part of the cell during invasion might be associated with some of these constituents, an hypothesis further supported by IEM detection of DGLE in the vicinity of cytoskeleton structures (Fig. 5C). Because the DGLE gradient was not disorganized by oryzalin, a tubulin-destabilizing agent, or butanedione monoxime, affecting myosin A (Fig. 5A), our study suggests that during invasion DGLE might be associated with actin and/or micronemal proteins. Alternatively, Johnson et al. (64) recently showed that GAP50 and the myosin complex are immobilized within the inner membrane complex at the level of DRM domains, which are enriched in sterols and have a higher density than DRMs classically reported in eukaryotic cells. DGLE might be a component of such inner membrane complex DRMs.

Toxoplasma division is a binary process called endodyogeny during which a single chromosome replication is followed by concurrent mitosis and parasite budding (65). In our study, DGLE was detected within dividing cells at the tip of the duplicated inner membrane complexes of the daughter cells (Fig. 4). Because DGLE was also detected at the tip of the mother cell and as part of the residual body, the DGLE of the daughter cells is likely newly synthesized rather than recycled.

Attempts to determine the precise structure of DGLE by mass spectrometry analyses of the pellicle membranes (Fig. 3B) allowed us to inventory some minor lipids, particularly dihexosyl lipids with various hydrophobic moieties (ceramides, DAG, acylalkylglycerol), that might react with the anti-DGDG antibodies. Immunolabeling of DGLE is consistent with the occurrence of DGDG, and/or digalactolipids having an alternative hydrophobic moiety (i.e., acylalkylglycerol or ceramide; Fig. 3B), and/or dihexosyl lipids that might be cross-detected by the antibody but harboring different sugars, such as Glc, GalNAc, or GlcNAc. Furthermore, we cannot exclude the possibility that antibodies react with more complex glycolipids terminated by a dihexosyl group. Whereas dihexosyl ceramides could be unambiguously assessed, peaks corresponding to dihexosyl DAG or dihexosyl acylalkylglycerol were close to the detection threshold, and no conclusive result could be drawn regarding the unambiguous determination of the DGLE structure. Previous reports of the metabolic labeling of a lipid comigrating with DGDG after incubation with radiolabeled UDP-galactose (30) and acetate (24) support the idea that the DGLE hydrophobic moiety is DAG or acylalkylglycerol. Because numerous glycolipids generated by the same enzyme can share an identical polar head but harbor different hydrophobic moieties (e.g., MGCB and MGDG generated by galactocerebroside synthase based on the supplied substrate, ceramide or DAG, respectively), the possibility that the detected DGLE corresponds to glycosyl glycerolipids or glycosyl ceramides or to both classes cannot be rigorously excluded. Recently, the parasitic trematode *Fasciola hepatica* was shown to exhibit mammalian-type glycolipids, including α-galactosyl(1→4)β-galactose- and α-galactosyl

Proofs Only

174
Master Proof JLR m700476

(1→3)β-galactose-terminating glycoceramides, as well as nonmammalian β-galactosyl(1→6)β-galactose-terminating glycoceramides that account for cestode serological cross-reactivity (66). It is possible, therefore, that like glycolipids of the neogala series [i.e., β-galactosyl(1→6)β-galactose], the α-galactosyl(1→6)β-galactose-terminating glycolipids might be related to the pathogenic process.

We also attempted to refine the distribution of DGLE in membrane domains by analyzing the lipid content of DRMs. In a recent report, DRMs isolated from the pellicle of extracellular parasites were shown to be enriched in cholesterol, GM1 ganglioside, SM, phospholipids, and still unidentified lipids. They were also shown to be associated with proteins involved in invasion and motility, suggesting their localization at the inner membrane complex (53). Here, DRM fractions purified according to the same procedure were enriched in sterols and contained DGLE, although no specific enrichment in DGLE could be measured (Fig. 1F). The galactosyl head groups of lipids are known to interact and promote the organization of stacked domains (67). Therefore, DGLE might spontaneously form membrane domains, possibly associated with DRMs, with some specific cellular functions including protein anchoring. Thus, the actin-dependent migration of DGLE to the anterior part of the parasite, occurring during early infection processes, might be part of a mechanism recruiting other components to the apex of the cell.

DGLE was detected in important apicomplexan parasites (*Toxoplasma*, *Neospora*, *Plasmodium*, *Babesia*, and *Cryptosporidium*) (Fig. 6). In all cases, DGLE was localized at the periphery of the cell, either as pellicle membrane domains or as an apical gradient. This study shows that DGLE is found broadly in the Apicomplexa phylum, in both apicoplast-containing (*Toxoplasma*, *Neospora*, *Plasmodium*, and *Babesia*) and apicoplast-free (*Cryptosporidium*) species. If DGLE synthesis derived from an ancestral chloroplastic DGDG synthetic machinery, this result suggests that the corresponding enzymes are no longer localized within a plastid, at least in *Cryptosporidium*.

After this descriptive work, future studies include the precise characterization of the hydrophobic moiety of DGLE, requiring very large-scale cultures of the parasites, lipid class purification, and analysis. Although this work was motivated by the analysis of chloroplast galactolipids in Apicomplexa, based on a series of experimental evidence, technical limitations did not allow us to give any definitive demonstration regarding the occurrence of these precise lipidic structures in Apicomplexa. It becomes clear that the analysis of apicoplast lipids requires a purification procedure for this organelle, respecting its membrane integrity. The current understanding of galactolipid synthesis in plastid-containing organisms is still incomplete, lacking some of the enzymes in important photosynthetic organisms that might be helpful to explore Apicomplexa genomes. In spite of the apparently small number of glycosyltransferases in Apicomplexa [as inventoried in the CAZy database (68)], genes sharing some similarity with cyanobacteria dgdA can be detected, and efforts should focus on their analyses and on the search for other glycolipid-synthesizing enzymes to functionally advance our understanding of simple glycolipid classes in the context of Apicomplexa pathogeneses.

The authors are indebted to S. González (Unidad de Microscopia Electrónica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México) for expert microscopy; to A. Zoppé (Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France), A. Sparks and M. Roth (Kansas State University) for technical assistance; and to C. Bisanz (Institut Jean Roget, Grenoble, France), C. Beckers (University of North Carolina), M. A. Hakimi (Institut Jean Roget), S. Khaldi and G. Gargala (Université de Médecine-Pharmacie, Rouen, France), A. Grichine (Institut Albert Bonniot, Grenoble, France), J. Jouhet (Commissariat à l'Energie Atomique), L. Lecordier (Université Libre de Bruxelles, Belgium), K. Musset (Institut Jean Roget), L. D. Sibley (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO), D. Soldati (University of Geneva, Switzerland), and G. Wards (University of Vermont, Burlington) for sharing invaluable reagents (lipids, antibodies, and cell lines). The authors thank M. A. Block and M. A. Hakimi for fruitful discussions. This work was funded by grants from Oséo-Innovation (Grants A0106220V and A0502020V), the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR 05EMPB01702), and the Conseil Régional Rhône-Alpes, Cluster 9 (to E.M.); by the National Insitutes of Health (Grants RO1 NIAID TMP 16945 01-20, 27530 01-20, 4328x 01-11) and the Research to Prevent Blindness Foundation (to R.M.); and by fellowships from the French Ministry of Research (to C.B.) and the Conseil Régional Rhône-Alpes, Emergence (to N.S.). The Kansas Lipidomics Research Center was supported by the National Science Foundation (Grants EPS 0236913, MCB 0455318, and DBI 0521587), the Kansas Technology Enterprise Corporation, K-IDeA Networks of Biomedical Research Excellence of the National Institutes of Health (Grant P20 RR-16475), and Kansas State University.

REFERENCES

1. Håkansson, 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:** 3132–3144.
2. Mordue, D. G., N. Desai, M. Dustin, and L. D. Sibley. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* **190:** 1783–1792.
3. Charron, A. J., and L. D. Sibley. 2004. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic.* **5:** 855–867.
4. Mercier, C., K. D. Z. Adjogble, W. Däubener, and M. F. Cesbron-Delauw. 2005. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all Apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* **35:** 829–849.
5. Mordue, D. G., and L. D. Sibley. 1997. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J. Immunol.* **159:** 4452–4459.
6. Keeley, A., and D. Soldati. 2004. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.* **14:** 528–532.
7. Dubremetz, J. F. 2007. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell. Microbiol.* **9:** 841–848.
8. McFadden, G. I., M. E. Reith, J. Munholland, and N. Lang-Unnasch. 1996. Plastid in human parasites. *Nature.* **381:** 482.
9. Köhler, S., C. F. Delwiche, P. W. Denny, L. G. Tilney, P. Webster, R. J. Wilson, J. D. Palmer, and D. S. Roos. 1997. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science.* **275:** 1485–1489.

Proofs Only

Master Proof JLR m700476

10. Ferguson, D. J. P., F. L. Henriquez, M. J. Kirisits, S. P. Muench, S. T. Prigge, D. W. Rice, C. W. Roberts, and R. McLeod. 2005. Maternal inheritance and stage specific variation of the apicoplast in *Toxoplasma gondii* during development in the intermediate and definitive host. *Eukaryot. Cell.* **4:** 814–826.
11. Wilson, I. 1993. Plastids better red than dead. *Nature.* **366:** 638.
12. Van Dooren, G. G., R. F. Waller, K. A. Joiner, D. S. Roos, and G. I. McFadden. 2000. Traffic jams: protein transport in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today.* **16:** 421–427.
13. Welti, R., E. Mui, A. Sparks, S. Wernimont, G. Isaac, M. Kirisits, M. Roth, C. W. Roberts, C. Botté, E. Maréchal, and R. McLeod. 2007. Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* reveals unusual polar lipids. *Biochemistry.* **46:** 13882–13890.
14. 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:** 167–180.
15. Waller, R. F., and G. I. McFadden. 2005. The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr. Issues Mol. Biol.* **7:** 57–79.
16. Zuther, E., J. J. Johnson, R. Haselkorn, R. McLeod, and P. Gornicki. 1999. Growth of *Toxoplasma gondii* is inhibited by aryloxyphenoxypropionate herbicides targeting acetyl-CoA carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96:** 13387–13392.
17. Gleeson, M. T. 2000. The plastid in Apicomplexa: what use is it? *Int. J. Parasitol.* **30:** 1053–1070.
18. McLeod, R., S. Muench, J. Rafferty, D. Kyle, E. Mui, M. Kirisits, D. Mack, C. Roberts, B. Samuel, R. Lyons, et al. 2001. Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan Fab I. *Int. J. Parasitol.* **31:** 109–113.
19. Maréchal, E., and M. F. Cesbron-Delauw. 2001. The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci.* **6:** 200–205.
20. Roberts, C. W., R. McLeod, D. W. Rice, M. Ginger, M. L. Chance, and J. J. Goad. 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatic parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* **126:** 129–142.
21. Muench, S., S. Prigge, M. J. Kirisits, R. McLeod, J. B. Rafferty, M. J. Kirisitis, C. W. Roberts, E. J. Mui, and D. Rice. 2007. Studies of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* enoyl acyl carrier protein reductase and implications for the development of antiparasitic agents. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **63:** 328–338.
22. Zhu, G. 2004. Current progress in the fatty acid metabolism in *Cryptosporidium parvum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51:** 381–388.
23. Mazumdar, J., H. Wilson, E. Masek, C. A. Hunter, and B. Striepen. 2006. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103:** 13192–13197.
24. Bisanz, C., O. Bastien, D. Grando, J. Jouhet, E. Maréchal, 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:** 197–205.
25. Charron, A. J., and L. D. Sibley. 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* **115:** 3049–3059.
26. Gupta, N., M. M. Zahn, I. Coppens, K. A. Joiner, and D. R. Voelker. 2005. Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J. Biol. Chem.* **280:** 16345–16353.
27. Carter, H. E., R. H. McCluer, and E. D. Slifer. 1956. Lipids of wheat flour. I. Characterization of galactosylglycerol components. *J. Am. Chem. Soc.* **78:** 3735–3738.
28. Douce, R. 1974. Site of biosynthesis of galactolipids in spinach chloroplasts. *Science.* **183:** 852–853.
29. Maréchal, E., M. A. Block, A. J. Dorne, R. Douce, and J. Joyard. 1997. Lipid synthesis and metabolism in the plastid envelope. *Physiol. Plant.* **100:** 65–77.
30. Maréchal, E., N. Azzouz, C. S. de Macedo, M. A. Block, J. E. Feagin, R. T. Schwarz, and J. Joyard. 2002. Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites. *Eukaryot. Cell.* **1:** 653–656.
31. Jouhet, J., E. Maréchal, B. Baldan, R. Bligny, J. Joyard, J., and M. A. Block. 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* **167:** 863–874.
32. Martrou, P., M. Pestre, R. Loubet, A. Nicolas, and G. Malinvaud. 1965. La toxoplasmose congénitale (note concernant un cas mortel). *Limousin Med.* **53:** 3–7.
33. Trager, W., and J. B. Jensen. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *J. Parasitol.* **91:** 484–486.
34. Carter, R., L. Ranford-Cartwright, and P. Alano. 1993. The culture and preparation of gametocytes of *Plasmodium falciparum* for immunochemical, molecular, and mosquito infectivity studies. *Methods Mol. Biol.* **21:** 67–88.
35. Stokkermans, T. J., J. D. Schwartzman, K. Keenan, N. S. Morrissette, L. G. Tilney, and D. S. Roos. 1996. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. *Exp. Parasitol.* **84:** 355–370.
36. Dobrowolski, J. M., and L. D. Sibley. 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* **84:** 933–939.
37. Mann, T., and C. Beckers. 2001. Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115:** 257–268.
38. Labruyère, 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:** 311–324.
39. 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:** 114–124.
40. 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:** 747–749.
41. Tomavo, S., B. Fortier, M. Soete, C. Ansel, D. Camus, and J. F. Dubremetz. 1991. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **59:** 3750–3753.
42. Gargala, G., A. Baishanbo, L. Favennec, A. François, J. J. Ballet, and J. F. Rossignol. 2005. Inhibitory activities of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase-targeted dihydroxyisoflavone and trihydroxydeoxybenzoin derivatives on *Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum*, and *Cryptosporidium parvum* development. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49:** 4628–4634.
43. Sengupta, K., V. Hernández-Ramírez, A. Rios, R. Mondragón, and P. Talamás-Rohana. 2001. *Entamoeba histolytica*: Monoclonal antibody against b1 integrin-like molecule (140 kDa) inhibits cell adhesion to extracellular matrix components. *Exp. Parasitol.* **98:** 83–89.
44. Patron, A. S., M. Mondragon, S. Gonzalez, J. R. Ambrosio, A. L. B. Guerrero, and R. Mondragon. 2005. Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* **35:** 883–894.
45. Lei, Y., D. Birch, M. Davey, and J. T. Ellis. 2005. Subcellular fractionation and molecular characterization of the pellicle and plasmalemma of *Neospora caninum*. *Parasitology.* **131:** 467–475.
46. Foussard, F., Y. Gallois, G. Tronchin, R. Robert, and G. Mauras. 1990. Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition. *Parasitol. Res.* **76:** 563–565.
47. Rabjeau, A., F. Foussard, G. Mauras, and J. F. Dubremetz. 1997. Enrichment and biochemical characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite plasmalemma. *Parasitology.* **114:** 421–426.
48. Azzouz, N., H. Shams-Eldin, S. Niehus, F. Debierre-Grockiego, U. Bieker, J. Schmidt, C. Mercier, M. F. Cesbron-Delauw, J. F. Dubremetz, T. K. Smith, et al. 2006. *Toxoplasma* grown in human cells use GalNAc-containing GPI precursors to anchor plasma membrane proteins while the immunogenic glycosylated GPI precursors remain free at the parasite cell surface. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38:** 1914–1925.
49. Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37:** 911–917.
50. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:** 265–275.
51. Carruthers, V. B., and J. C. Boothroyd. 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **9:** 1–7.
52. Van der Zypen, E., and G. Piekarski. 1967. Endodyogeny in *Toxoplasma gondii*: a morphological analysis. *Z. Parasitenkd.* **29:** 15–35.
53. Baum, J., A. T. Papenfuss, B. Baum, T. P. Speed, and A. F. Cowman. 2006. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **4:** 621–628.
54. Benning, C., and H. Ohta. 2005. Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J. Biol. Chem.* **280:** 2397–2400.
55. Jouhet, J., E. Maréchal, and M. A. Block. 2007. Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog. Lipid Res.* **46:** 37–55.

Proofs Only

Master Proof JLR m700476

56. Miège, C., E. Maréchal, M. Shimojima, K. Awai, M. A. Block, H. Ohta, K. I. Takamiya, R. Douce, and J. Joyard. 1999. Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur. J. Biochem.* **265:** 990–1001.
57. Awai, K., E. Maréchal, M. A. Block, D. Brun, T. Masuda, H. Shimada, K. I. Takamiya, H. Ohta, and J. Joyard. 2001. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98:** 10960–10965.
58. Maréchal, E., K. Awai, M. A. Block, D. Brun, T. Masuda, H. Shimada, K. I. Takamiya, H. Ohta, and J. Joyard. 2000. The multigenic family of monogalactosyldiacylglycerol synthases. *Biochem. Soc. Trans.* **28:** 731–738.
59. Awai, K., T. Kakimoto, C. Awai, T. Kaneko, Y. Nakamura, K. Takamiya, H. Wada, and H. Ohta. 2006. Comparative genomic analysis revealed a gene for monoglucosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in cyanobacteria. *Plant Physiol.* **141:** 1120–1127.
60. Andersson, M. X., M. H. Stridh, K. E. Larsson, C. Liljenberg, and A. S. Sandelius. 2003. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* **537:** 128–132.
61. Botté, C., C. Jeanneau, L. Snajdrova, O. Bastien, A. Imberty, C. Breton, and E. Maréchal. 2005. Molecular modelling and site directed mutagenesis of plant chloroplast MGDG synthase reveal critical residues for activity. *J. Biol. Chem.* **280:** 34691–34701.
62. Awai, K., H. Watanabe, C. Benning, and I. Nishida. 2007. Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation. *Plant Cell Physiol.* **48:** 1517–1523.
63. Lebrun, M., V. B. Carruthers, and M. F. Cesbron-Delauw. 2007. *Toxoplasma* secretory proteins and their roles in cell invasion and intracellular survival. *In Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan—Perspectives and Methods. K. Kim and L. M. Weiss, editors. Elsevier/North Holland, Amsterdam. 265–316.
64. Johnson, T. M., Z. Rajfur, K. Jacobson, and C. Beckers. 2007. Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell.* **18:** 3039–3046.
65. White, M. W., M. E. Jerome, S. Vaishnava, M. Guerini, M. Behnke, and B. Striepen. 2005. Genetic rescue of a *Toxoplasma gondii* conditional cell cycle mutant. *Mol. Microbiol.* **55:** 1060–1071.
66. Wuhrer, M., C. Grimm, R. D. Dennis, M. A. Idris, and R. Geyer. 2004. The parasitic trematode *Fasciola hepatica* exhibits mammalian-type glycolipids as well as Gal(beta1-6)Gal-terminating glycolipids that account for cestode serological cross-reactivity. *Glycobiology.* **14:** 115–126.
67. Bottier, C., J. Gean, F. Artzner, B. Desbat, M. Pezolet, A. Renault, D. Marion, and V. Vie. 2007. Galactosyl headgroup interactions control the molecular packing of wheat lipids in Langmuir films and in hydrated liquid-crystalline mesophases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768:** 1526–1540.
68. Coutinho, P. M., E. Deleury, G. J. Davies, and B. Henrissat. 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328:** 307–317.

Proofs Only

Master Proof JLR m700476

Résultats - Chapitre IV

Antigène digalactolipidique à la surface de *Toxoplasma gondii* et exploration d'applications diagnostiques et thérapeutiques éventuelles

Les résultats présentés dans le chapitre III détaillent la compartimentation et la dynamique du DGLE (digalactolipid like epitope) au cours du cycle cellulaire de *Toxoplasma gondii*. Cette étude repose sur la reconnaissance du DGLE par une série d'anticorps polyclonaux dirigés contre du digalactosyldiacylglycérol chloroplastique pur (DGDG). Elle montre qu'il est possible de stimuler une production d'anticorps dirigé contre un lipide de *Toxoplasma* chez le lapin ou le rat. De plus, le DGLE est présent au niveau de la membrane plasmique du parasite et notamment sur le feuillet externe de cette membrane. Ces travaux suggèrent que la tête polaire du DGLE pourrait représenter une cible potentielle pour des outils diagnostiques ou pour des approches vaccinales. Nous avons entrepris dans un premier temps d'explorer le potentiel d'anticorps polyclonaux anti-DGDG sur modèle *in vitro* de détection de *T. gondii*. En effet, si un serum produit par injection de DGDG chez le lapin ou le rat est capable de reconnaître le parasite et qu'il présente un intérêt pour des approches thérapeutiques nouvelles, il est envisageable de produire ce type de serum en plus grande quantité. Par ailleurs, nous avons évalué la faculté du serum anti-DGDG de bloquer le processus invasif de *Toxoplasma*, comme préalable pour le développement d'un éventuel vaccin. L'ensemble de ces études réalisées sur le modèle *Toxoplasma* vise par ailleurs à être étendu à d'autres Apicomplexes, pour lesquels les outils diagnostiques et les approches vaccinales sont limités.

Ce chapitre résume les premiers résultats collectés sur les propriétés immunogéniques du serum de lapin anti-DGDG dans une visée thérapeutique. Nous présenterons dans un premier temps, une étude de l'effet d'un serum anti-DGDG sur la forme libre du parasite, puis au cours du processus d'invasion du parasite dans la cellule hôte. Enfin, nous présenterons une étude restreinte visant à évaluer la capacité d'un serum anti-DGDG à activer certaines voies du système immunitaire inné.

I. Activité d'un serum de lapin obtenu par immunisation à l'aide de DGDG chloroplastique, sur le parasite Toxoplasma gondii

A. Le serum anti-DGDG provoque l'immunoagglutination de toxoplasmes extracellulaires

Une immunoagglutination est une agglutination spécifique d'un antigène, activée par des anticorps, par réticulation visible à l'œil ou en microscopie optique simple. Dans ce type de réaction, du fait de la réticulation des corps étrangers porteurs des antigènes (appelés ici « particules »), les antigènes sont en suspension et non en solution, et sédimentent *in vitro*. La formation des réseaux de particules nécessite un rapport particulier entre antigènes et anticorps. Ces conditions de stoechiométrie respectées, la réaction d'immunoagglutination est dite dans la zone d'équivalence. Lorsqu'un des réactifs est en trop grande concentration, il n'y a pas d'agglutination visible (phénomène de zone). Ce type de réaction d'agglutination est 1000 fois plus sensible que les réactions de précipitation. Les meilleures agglutinines sont les IgM (immunoglobulines pentamériques).

L'immunoagglutination est un test standard pour le diagnostic de nombreux agents pathogènes et infectieux. C'est par exemple un des tests utilisés pour la détection de certaines bactéries de l'eau destinée à la consommation. Ce test est également utilisé pour diagnostiquer la présence du virus HIV dans les fluides corporels. Il existe trois grands principes d'immunoagglutination :

- L'agglutination directe pour laquelle l'antigène fait partie intégrante de la particule qui le porte. L'antigène est alors dit de surface. L'utilisation d'anticorps spécifiques permet de détecter la présence des antigènes dans un milieu (méthode qualitative). Ce type de test est utilisé pour identifier la plupart des antigènes bactériens de surface (bactério-diagnostique).
- L'agglutination passive pour laquelle l'antigène est artificiellement fixé à la particule qui le porte. L'ensemble (particule + antigène) est appelé « particule sensibilisée ». Les antigènes peuvent être fixés par différentes techniques : par adsorption sur une particule immunologiquement inerte telle que des billes de latex, par fixation immunologique sur une particule dérivée d'une hématie, ou par couplage chimique. Ces techniques permettent de détecter et doser (méthode quantitative) les antigènes comme les facteurs rhumatoïdes par exemple. Ce type de test est également réalisable pour la sérologie de la toxoplasmose (Wang et al. 2004).
- L'agglutination inverse pour laquelle il s'agit de l'anticorps qui est fixé sur une particule, le tout formant alors une particule sensibilisée. Cette technique permet de détecter des antigènes solubles (méthode qualitative). Cette technique est très utilisée pour mettre en évidence rapidement des antigènes bactériens sans avoir à cultiver les bactéries. Ce test est par exemple utilisé pour la détection des méningocoques ou du virus de la grippe.

Les études menées sur la localisation du DGLE chez *T. gondii*, réalisées grâce aux serums anti-DGDG, ont montré que la tête polaire du DGLE est présentée en surface du

parasite. Par ailleurs, les propriétés d'immunoagglutination du serum anti-DGDG avaient été démontrées sur chloroplastes purifiés (Jouhet et al. 2004) par reconnaissance du DGDG présenté en surface de l'enveloppe chloroplastique. Ce même serum de lapin anti-DGDG, a permis de détecter par immunoagglutination, la présence du DGDG en surface de mitochondries isolées à partir de plantes cultivées en carence de phosphate (Jouhet et al. 2004). Ces travaux suggèrent que le serum anti-DGDG pourrait peut-être provoquer une immunoagglutination des parasites par action directe.

1. Immunoagglutination de toxoplasmes vivants en présence de serum anti-DGDG

Des parasites fraîchement lysés (10^7 par conditions) ont été collectés et rincés en présence de tampon PBS. Les parasites vivants ont ensuite été incubés avec différentes dilutions du serum anti-DGDG (de 1/1 à 1/10) ou de serum pré-immun (mêmes dilutions). Les deux serums ont préalablement été décomplémentés par la société en charge de la production du serum immun anti-DGDG (ESD, Châtillon-sur-Chalaronne, France) et pendant 30 minutes à 52°C pour le pré-immun. Les parasites ont ensuite été observés en microscopie optique à intervalles réguliers.

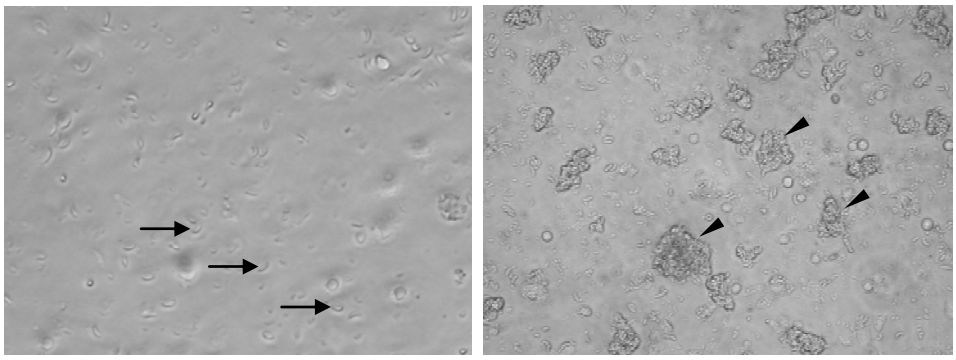


Figure 1 : Immunoagglutination de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* à l'aide d'un serum de lapin immunisé avec du DGDG purifié de chloroplastes d'épinard. Le serum pré-immun (à gauche) ne montre aucune propriété agglutinante : les tachyzoïtes restent sous forme libre (flèches). Le serum immun (à droite) agglutine les parasites (pointes de flèches).

Les parasites passent très rapidement, moins de 10 minutes, de la forme de parasite isolé à des formes agglutinées grâce à l'action du serum anti-DGDG (Figure 1, droite). Les amas que forment ces parasites peuvent compter jusqu'à plusieurs dizaines de tachyzoïtes (Figure 1 droite, pointes de flèches). De plus, selon la concentration de serum immun utilisé, un effet dose sur l'agglutination des parasites est observé, la concentration la plus efficace étant celle pour laquelle le serum est utilisé pur. Le serum pré-immun ne provoque aucun phénomène d'agglutination sur les parasites qui restent libres dans le milieu(Figure 1, gauche). L'immunoagglutination observée est vraisemblablement provoquée par la

reconnaissance d'épitopes de surface du parasite, *i.e.* le DGLE par les anticorps spécifiques du serum immun.

2. Immunoagglutination de toxoplasmes fixés selon les conditions d'un test diagnostique hospitalier

Nous avons évalué les propriétés d'agglutination dans les conditions utilisées pour des tests diagnostiques de types commerciaux, c'est-à-dire lorsque le parasite est fixé. Nous avons pour cela utilisé le kit hospitalier « Toxo-Screen DA », BioMérieux (Desmonts et Remington 1980). Ce kit est utilisé en diagnostic, pour détecter les IgG anti-toxoplasmiques dans le serum humain par agglutination directe d'antigènes sensibilisés. Il est aussi utilisé au laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Grenoble, pour détecter les IgG anti-toxoplasmiques dans les serums de souris inoculées avec des échantillons biologiques. Un agent réducteur (β-mercapto-éthanol) permet de dénaturer simplement les IgM et de valider leur présence dans le serum.

L'antigène utilisé est une suspension de toxoplasmes formolés (souche Sabin), dilués dans un tampon albumine, pH 8,95. Ces toxoplasmes sédimentent spontanément lorsque la suspension est mise en décantation. La présence d'une agglutinine réticule uniformément les toxoplasmes et empêche cette décantation. Le kit comprend un serum de chèvre positif (Figure 2, positive CTR), calibré par rapport à un étalon proposé par l'OMS et un serum de chèvre négatif (Figure 2, negative CTR). L'agglutination est réalisée en plaques de microtitration à fond rond, en duplicat pour chaque serum (absence de βME sur la première ligne ; présence de βME sur la deuxième ligne). Lorsque le contrôle négatif est traité à la dilution 1/20 en l'absence de βME, un signal positif est toutefois observé, limite de ce contrôle signalée par le fabricant.

La lecture du test (réaction positive) est la suivante. Un témoin antigène montre une décantation des parasites en bouton ou en anneau (Figure 2, Ag CTR). Pour une réaction positive, l'agglutination des parasites conduit à la réticulation des toxoplasmes en suspension, formant un voile uniforme (Figure 2, positive CTR) ; pour une réaction négative, une sédimentation des parasites en bouton ou en anneau est observée dans le cas d'une réaction négative (Figure 2, negative CTR). Il existe des situations intermédiaires avec agglutination sous forme de voile tapissant la moitié du fond de la cupule.

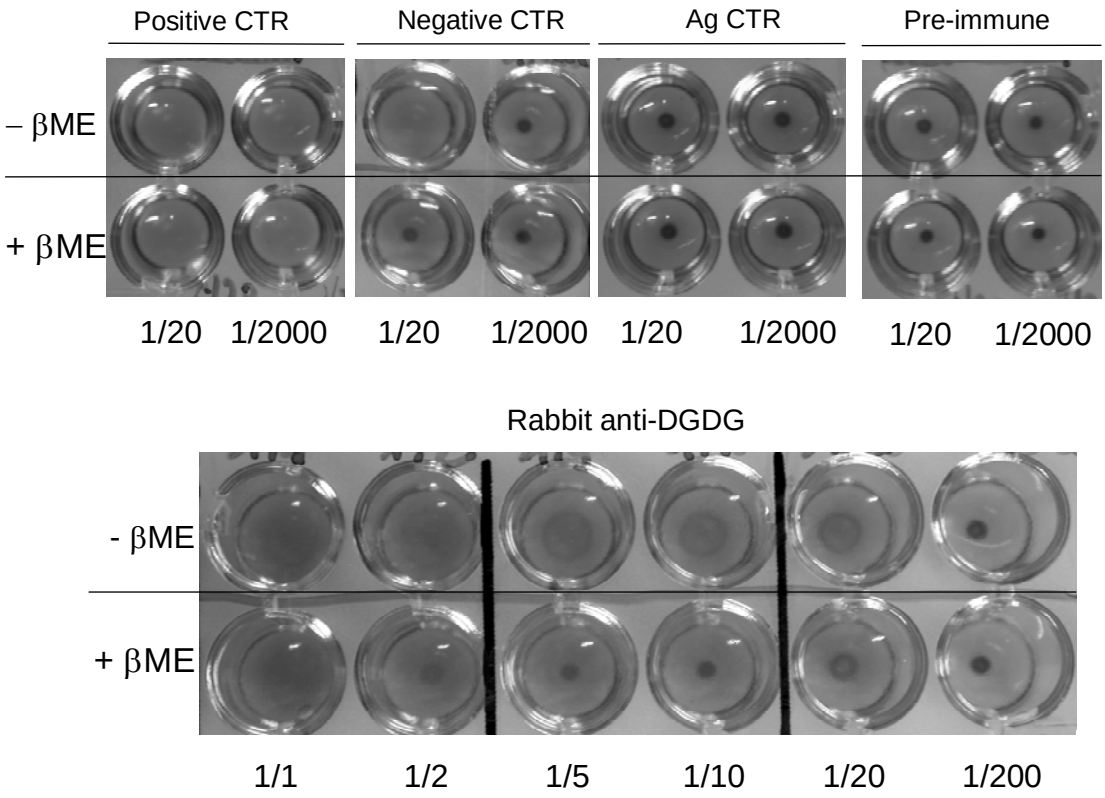


Figure 2 : Test d'immunoagglutination de *Toxoplasma* à l'aide du kit Toxo-Screen DA bioMérieux. La partie supérieure montre le résultat des tests pour le serum positif de chèvre (positive CTR), le serum négatif de chèvre (negative CTR), les parasites seuls (résultats négatifs, Ag CTR) et le serum pré-immun (Pre-immune) dont les résultats sont négatifs aux dilutions 1/20 et 1/2000. La partie inférieure montre le test réalisé en parallèle avec le serum de lapin anti-DGDG à différentes concentrations. Le voile correspondant à une réaction positive d'agglutination est visible avec ou sans présence de βME.

Le serum de lapin anti-DGDG permet donc une immunoagglutination des toxoplasmes fixés dans les conditions d'un test diagnostique hospitalier. Sans βME, la réaction est positive aux concentrations 1/1 et 1/2, est intermédiaire pour les concentrations 1/5, 1/10 et 1/20 et devient négative à 1/200 (Figure 2). L'activité du serum proviendrait donc en partie de la présence d'IgM. L'absence d'effet du βME à haute concentration de serum indique que d'autres classes d'immunoglobulines présentes dans le serum peuvent aussi agglutiner les parasites. Ce test valide les observations faites sur parasites vivants quant aux propriétés immunoagglutinantes du serum anti-DGDG. Il permet une détermination sommaire des classes d'immunoglobulines porteuses de cette activité agglutinante et il illustre enfin la possibilité de développer un test diagnostic fondé sur la reconnaissance d'un épitope digalactolipidique en surface des parasites.

B. Le serum de lapin anti-DGDG inhibe l'invasion de *Toxoplasma gondii* dans la cellule hôte

La plupart des stratégies actuellement développées pour lutter contre les Apicomplexes, visent entre autres, le blocage des formes parasitaires invasives. Plusieurs équipes travaillent donc sur la recherche d'antigènes de surface dont la reconnaissance permettrait de stopper l'invasion parasitaire. Concernant *T. gondii*, plusieurs études ont montré que la reconnaissance d'antigènes de surface et plus particulièrement de SAG1, entraîne une inhibition de l'invasion du parasite dans la cellule hôte (Mineo et al. 1993, Velge-Roussel et al. 2001). En complément de l'étude de l'immunoagglutination provoquée par la reconnaissance d'un épitope digalactolipidique par un serum anti-DGDG, nous avons évalué le potentiel d'inhibition d'invasion de ce serum.

L'invasion de cellules hôtes par *Toxoplasma gondii* est analysée après préincubation des parasites en présence de serum anti-DGDG. Pour chacune des conditions testées, 10^7 parasites fraîchement lysés ont été collectés et rincés en PBS. Les toxoplasmes ont ensuite été remis en suspension en présence de différentes concentrations des anticorps et du serum pré-immun testés, dilués dans du tampon PBS, puis incubés pendant 30 minutes à 37°C. Après élimination du milieu d'incubation et remise en suspension en milieu de culture, les parasites ont été placés au contact de cellules HFF pour invasion pendant 1 h à 37°C. L'ensemble des cellules a été fixé et coloré par de l'éosine et du bleu Trypan. Nous avons ensuite effectué un comptage des parasites intracellulaires sur l'ensemble des conditions expérimentales. Les résultats sont consignés sur la Figure 3. Les parasites ont été incubés avec différentes concentrations du serum de lapin anti-DGDG (1/1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 et 1/40). Seule la concentration 1/1 du serum pré-immun est montrée. Des parasites non traités (incubés en non complémenté de serum) constituent le contrôle négatif (référence du test, 100%). Un lot de parasites ayant subi une pré-incubation en présence d'un anticorps monoclonal anti-SAG1 (1/1) constitue un témoin positif pour cette analyse. Le test a été réalisé trois fois et chaque condition expérimentale a été effectuée en duplicat.

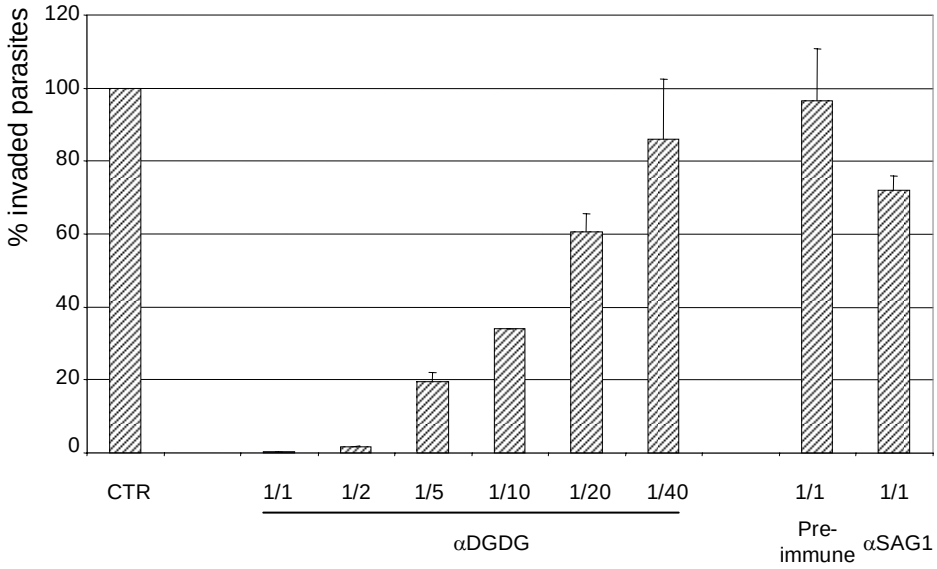


Figure 3 : Test d'inhibition d'invasion des tachyzoïtes de Toxoplasma gondii. Les parasites prétraités à 37°C en présence de serum de lapin anti-DGDG (noté αDGDG), de serum pré-immun ou de l'anticorps monoclonal anti-SAG1 (noté αSAG1) pendant 30 min, ont été mis au contact de cellules HFF. Après 1 h d'invasion, les préparations ont été fixées, colorées puis le nombre de parasites intracellulaires a été compté. La référence de ce test est fixée par le nombre de parasites intracellulaires incubés 30 min en PBS plutôt qu'avec un serum.

La Figure 3 montre que le serum de lapin anti-DGDG inhibe l'invasion de *T. gondii*. De même que pour l'agglutination, un effet dose est observé. Le nombre de parasites intracellulaires est quasi nul aux fortes concentrations de serum (1/1 et 1/2). Une augmentation régulière du nombre de parasites intracellulaires aux concentrations 1/5, 1/10 et 1/20 est observée par rapport au contrôle de parasites incubés en PBS. Le serum pré-immun ne montre aucun effet similaire, avec un nombre de parasites intracellulaires proche de celui observé dans les conditions du contrôle incubé en PBS. Nous avons vérifié que l'anticorps anti-SAG1 possédait les propriétés inhibitrices de l'invasion rapportées par Mineo et al. (1993) et Velge-Roussel et al. (2001). Nous avons utilisé pour cela ; deux anticorps monoclonaux, Tg17.054 (Rodriguez et al. 1985) et DG52 (produit par J.C Boothroyd, Stanford University School of Medicine) à différentes concentrations, en parallèle avec les dilutions du serum anti-DGDG (résultats non montrés). L'ensemble des comptages effectués avec les anticorps anti-SAG1 indique une activité inférieure à celle du serum anti-DGDG. Les meilleurs résultats montrent une inhibition de 70% de l'invasion par rapport au monoclonal anti-SAG1 (Tg 17.054) utilisé au 1/1. L'action du serum anti-DGDG semble donc prévenir l'invasion des tachyzoïtes *in vitro* avec efficacité.

II. Effet du serum de lapin anti-DGDG sur l'activation du système immunitaire inné au cours de la réponse anti-toxoplasmique

A. Le serum anti-DGDG active la phagocytose de *T. gondii* par les macrophages *via* l'opsonisation du parasite

L'opsonisation est le processus par lequel certaines immunoglobulines activent la phagocytose de l'antigène auquel elles sont liées. Ces substances, appelées opsonines, recouvrent l'antigène, ce qui facilite la fixation des cellules phagocytaires qui sont dotées de récepteurs pour ces opsonines.

Toxoplasma gondii est capable d'envahir l'ensemble des cellules nucléées des animaux à sang chaud, y compris les cellules phagocytaires comme les macrophages ou les monocytes. Peu après l'invasion active du parasite dans ce type cellulaire, la vacuole parasitophore empêche la fusion avec les endosomes précoces ou les lysosomes de la cellule hôte (Sibley et al. 1985). Ce processus permet au parasite d'échapper à la dégradation lysosomale et donc de contourner le système immunitaire inné de l'organisme hôte. La phagocytose des parasites libres peut toutefois se produire lorsque celui-ci est opsonisé, par exemple par des IgG : il y a alors reconnaissance du fragment constant (Fc) de l'anticorps par les récepteurs spécifiques du fragment Fcγ des IgG (FcγR) présents en surface de la cellule phagocytaire. Ce phénomène entraîne la phagocytose du parasite puis une fusion des vacuoles lysosomales avec le phagosome. Il y a alors acidification du compartiment, causant la dégradation du parasite par action concertée avec l'ensemble des acteurs lysosomaux (Sibley et al., 1985, Joiner et al., 1990, Mineo et al., 1993).

Une étude menée sur l'opsonisation de *T. gondii* par des IgG anti-SAG1, montre que ce processus n'empêche pas l'invasion du parasite dans les macrophages (Fadul et al. 1995). En effet, les parasites opsonisés sont capables d'envahir les macrophages puis de se répliquer dans la cellule.

Nous avons engagé une série d'analyses pour évaluer si une opsonisation induite par une incubation avec le serum anti-DGDG pouvait conduire à une augmentation de la phagocytose et à la dégradation de toxoplasmes opsonisés par les macrophages de rat BN. Afin de discriminer les parasites qui auraient envahi les macrophages de ceux phagocytés et en voie de dégradation, nous avons utilisé un système de fluorescence double. Des parasites de la souche RH-YFP (Gubbels et al. 2003), prétraités ou non avec le serum anti-DGDG ou le serum pré-immun, ont été mis à en contact avec des leucocytes (contenant essentiellement des macrophages) issus de péritoines de rats. Les leucocytes ont été préincubés en présence de Lysotracker (Invitrogen) qui permet de visualiser les compartiments acides de types lysosomaux (ou phagosomes fusionnés à des vésicules) par une fluorescence rouge. Après invasion, il est donc possible de distinguer les parasites extracellulaires ou ayant envahi les macrophages grâce à la flurorescence de la YFP seule, des parasites phagocytés et en cours de digestion grâce à une double fluorescence verte/rouge (jaune lors de la fusion des fluorescences). Il est ainsi possible de réaliser des comptages des populations phagocytées.

Un dernier marquage au Hoechst permet la reconnaissance des leucocytes (fluorescence bleue de l'ADN contenu dans les noyaux ; Figure 4, A).

Les parasites ont été pré-incubés en parallèle pendant 30 minutes avec du serum anti-DGDG (dilutions 1/1, 1/5 et 1/10), un anticorps monoclonal anti-SAG1 (Tg 17.054, mêmes concentrations), le serum pré-immun et du milieu PBS non complémenté en parallèle. Nous avons utilisé environ 5000 macrophages et un rapport d'environ 50 parasites par macrophages pour chacune des conditions expérimentales. Les traitements ont été effectués trois fois en duplicata. Le nombre de parasites phagocytés est variable d'une expérience à une autre, le comptage a donc été réalisé sur 20 champs représentatifs (Figure 4, B). Le nombre de parasites phagocytés lors du contrôle sans traitement constitue la référence du test. L'effet sur l'opsonisation des différents traitements est exprimé en pourcentage (positif ou négatif) par rapport au contrôle.

Les résultats (Figure 4) montrent que le serum anti-DGDG entraîne une augmentation du nombre de parasites phagocytés par comparaison avec le lot contrôle. L'effet est plus marqué lorsque le serum est utilisé pur (dilution 1/1), avec une augmentation d'environ 15% à 20%, par rapport au contrôle alors que cette augmentation n'est que de 10% lorsque le serum est utilisé à la dilution 1/5. On n'observe pratiquement plus d'effet à une dilution au 1/10. Le serum pré-immun ne semble pas provoquer d'augmentation du nombre de vacuoles lytiques contenant des parasites. De plus, comme précédemment rapporté (Fadul et al. 1995), l'opsonisation par l'anti-SAG1 n'entraîne pas d'augmentation notable de la phagocytose des parasites. Les résultats obtenus lors de ce test avec l'anticoprs anti-SAG1 corroborent les travaux antérieurs rapportant que l'anti-SAG1 peut être internalisé dans la vacuole parasitophore avec le parasite et ne pas gêner sa division (Fadul et al. 1995). Le serum anti-DGDG semble par comparasion induire la voie phagocytaire.

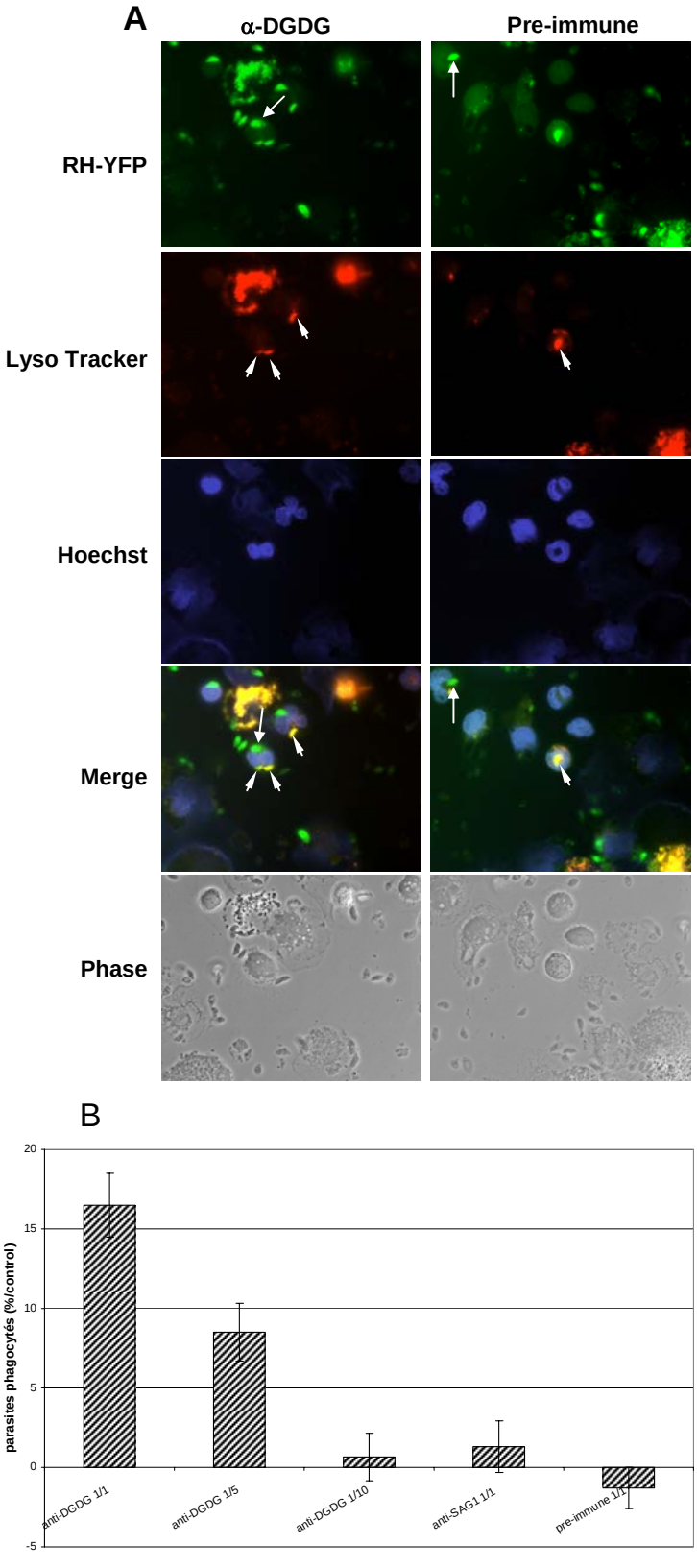


Figure 4 : Effet de l'opsonisation des tachyzoïtes, par les Ig présentes dans le serum de lapin anti-DGDG, sur l'augmentation de leur phagocytose par les macrophages de rat BN. (A) Des leucocytes extraits du péritoine de rat BN ont été isolés, comptés, mis à adhérer sur lame (1 h) et préincubés avec du Lysotracker (1/50.000, 1h) dans du milieu de culture. Des toxoplasmes de souche RH-YFP ont été placés au contact des leucocytes pendant 3 h à 37°C. L'ensemble a été fixé et perméabilisé avec du Triton X-100 (0.1%), coloré par la méthode de Hoechst (1/15.000 final en PBS) et monté sur lames. Les parasites extracellulaires ou envahis (flèches blanches) sont visualisés par mesure de la fluorescence dans le vert (594 nm). Les parasites phagocytés et en voie de dégradation (pointes de flèches blanches) sont visualisés par mesure de fluorescence rouge (488 nm) et verte (jaune sur la superposition -merge-). (B) Le graphique représente la variation du pourcentage de parasites phagocytés et en voie de digestion en pourcentage par rapport au contrôle (parasites n'ayant subi aucun prétraitement).

B. Le serum de lapin anti-DGDG active la voie classique du complément grâce à l'opsonisation du parasite

Le système du complément est une cascade biochimique du système immunitaire inné, entraînant une cytolyse de l'organisme sur lequel il se fixe, une chimiotaxie, une opsonisation pour la phagocytose et une inflammation. Succinctement, l'activation de ce système permet la destruction de pathogènes et le recrutement d'un grand nombre d'acteurs du système immunitaire pour une réponse régulée. Le système du complément est constitué de plus de 35 protéines circulantes sous forme de pro-enzymes qui sont activées en cascade par clivage (pour revue générale, Janeway et al., 2001). Les protéines principales sont notées de C1 à C9. Il existe trois voies biochimiques d'activation du complément :

- la voie classique du complément ;
- la voie alternative du complément ;
- la voie des lectines liant les mannoses.

La voie classique est activée par le complexe antigène-anticorps. C'est donc cette voie que pourrait activer le serum de lapin anti-DGDG par sa fixation en surface de *T. gondii*. Seuls 3 isotypes d'IgG (Ig1, Ig2 et Ig3) et les IgM sont capables d'activer cette cascade. L'interaction du complexe protéique C1 avec le fragment constant de deux (ou plusieurs) IgG ou encore d'une IgM pentamérique permet d'initier la cascade. Le complexe antigène-anticorps-C1 permet de cliver les protéines C4 et C2, qui s'associent puis clivent la protéine C3 en C3a et C3b. C3b se fixe sur la membrane du pathogène entraînant la formation, avec d'autres protéines du complément, d'un pore aboutissant à la lyse de la cellule touchée. C3b joue aussi un rôle en tant qu'opsonine et facilite la phagocytose par les macrophages. Nous avons donc décidé d'évaluer si le serum anti-DGDG était capable d'activer la voie classique du complément.

Afin de mesurer l'activation de la voie classique du complément par le serum de lapin anti-DGDG, nous avons utilisé le protocole de détermination dite de la « TH50 » (temps nécessaire pour observer 50% d'hémolyse, Abbal et al. 1991, Dumestre et al. in press) avec détermination de la présence de la protéine C4 hémolytique (Gaither et al. 1974). Brièvement, des érythrocytes de mouton sont sensibilisés avec un anticorps anti-érythrocytaire pour former une particule sensibilisée. Une solution de serum humain (NHS) est ensuite ajoutée à la solution contenant cette particule sensibilisée. Le NHS contient l'ensemble des protéines du complément, y compris le complexe C1q nécessaire à l'initiation de la voie classique du complément. Au contact de l'érythrocyte sensibilisé, C1q initie la cascade du complément, ce qui entraîne la lyse des hématies. Cette lyse et plus particulièrement, la libération de l'hémoglobine qui en résulte, est mesurée au cours du temps par spectromètrie et le point d'inflexion de la courbe constitue le temps nécessaire à la lyse de 50% des hématies (TH50). Cette mesure constitue le TH50 de référence. Le serum à tester (serum de lapin anti-DGDG) est préalablement incubé avec l'antigène puis incubé avec le NHS pendant 1 h à 37°C. Lors de cette étape, les protéines du complément peuvent en partie être consumées par le complexe serum-antigène. La solution NHS-serum-antigène est ensuite mélangée à la solution contenant les hématies sensibilisées.

La mesure du TH50 est alors effectuée. La capacité d'un serum à activer le complément conduit à une augmentation du TH50 de référence, liée à la baisse du nombre d'érythrocytes lysés. Elle peut donc être quantifiée par rapport au contrôle.

Nous avons incubé des parasites extracellulaires fraîchement lysés (8.10^6 par condition) en présence de plusieurs dilutions du serum de lapin anti-DGDG (1/1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50 et 1/100) ainsi qu'avec du serum pré-immun. Les parasites ont ensuite été rincés en PBS puis incubés 1 h à 37°C avec du NHS séronégatif à la toxoplasmose. Le milieu contenant les parasites prétraités par les serums et le NHS sont incubés avec les hématies sensibilisées pour la mesure du TH50. Le TH50 de référence a été mesuré dans un mélange hématies sensibilisées-NHS-PBS. De plus, du fait que certains pathogènes sont capables d'activer le complément (voie alternative et voie des lectines) par leur seule présence, nous avons réalisé une mesure de contrôle du TH50 sur des parasites extracellulaires sans prétraitement au serum avec le NHS. La Figure 5 consigne l'ensemble des résultats de mesure du TH50 et rend directement compte de l'abaissement de la lyse érythrocytaire par rapport au contrôle. Ces mesures ont été réalisées lors de trois expérimentations indépendantes en triplicats.

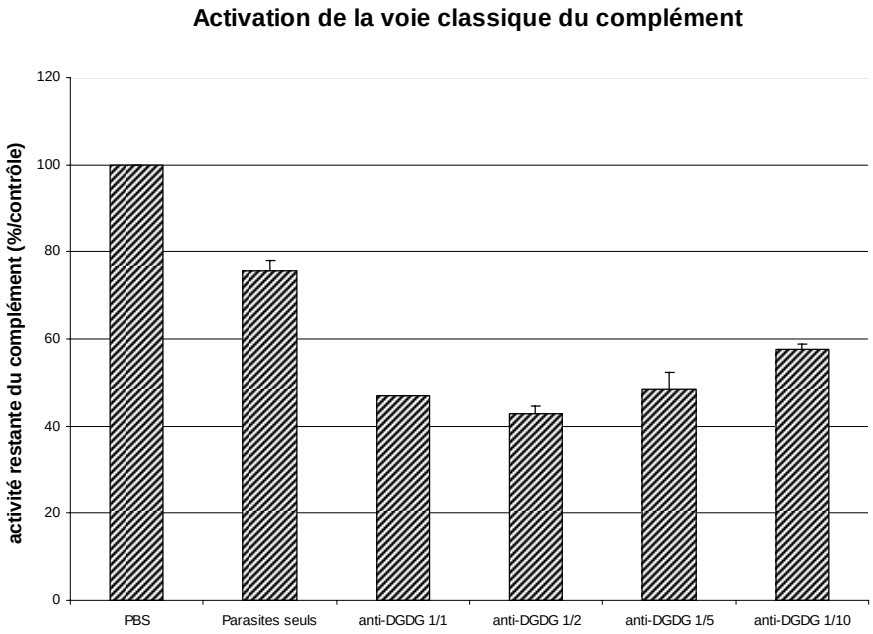


Figure 5 : Effet du serum de lapin anti-DGDG incubé en présence de *T. gondii* sur la voie classique d'activation du complément par mesure du temps nécessaire pour lyser 50% des érythrocytes sensibilisés (TH50). Les parasites (8.10^6 par condition) ont été préincubés en présence de différentes dilutions d'un serum de lapin anti-DGDG. Après élimination du milieu de prétraitement, les toxoplasmes sont mis en solution avec du serum humain séronégatif pour la toxoplasmose (NHS, contenant les protéines du complément) puis avec des hématies sensibilisées. L'efficacité de chaque dilution de sérum à activer la voie classique du complément est appréciée par le temps nécessaire pour lyser 50% des hématies sensibilisées et par comparaison de ce temps avec le temps mesuré pour lyser 50% des hématies incubées en présence de PBS et de NHS. L'activité complément restante est exprimée par le ratio : TH50 contrôle (PBS+NHS+hématies) ./. TH50 de l'échantillon (parasites + sérum+ NHS + hématies) X 100.

Les mesures du TH50 (Figure 5) montrent que le prétraitement des toxoplasmes par le serum de lapin anti-DGDG (dilutions 1/1 à 1/10) active la voie classique du complément de manière significative. Le maximum de cette activation est atteint à la dilution 1/2 (42% d'activité complément restante seulement, par rapport au 100% de la référence parasites en PBS). C'est à cette dilution que les conditions de stoechiométrie semblent être les plus favorables à la réaction. Le prétraitement par le serum anti-DGDG dilué au 1/10, au 1/5 ou au 1/1 conduit à une diminution marquée de l'activité complément restante mais proportionnelle à la dilution, par rapport au contrôle PBS. Il est intéressant de noter que les parasites seuls, incubés en présence de NHS et d'hématies sensibilisées induisent une diminution de cette activité complément restante, par rapport au contrôle PBS (77% d'activité seulement). Ces résultats suggèrent que le toxoplasme pourrait activer la cascade du complément indépendamment de la présence d'anticorps spécifiques : il pourrait donc activer la voie alterne ou la voie des lectines.

Ce test reste toutefois incomplet sans une mesure complémentaire du TH50 réalisé sur le serum de lapin anti-DGDG incubé en présence de NHS et d'hématies sensibilisées. Il est en effet possible que le serum puisse activer la voie classique du complément par lui-même. Des mesures prenant cette condition en compte sont en cours afin de valider l'ensemble du test.

III. Discussion

Les analyses réalisées dans ce chapitre sur les effets immunologiques d'un serum de lapin anti-DGDG fournissent des informations sur son potentiel d'utilisation en tant qu'outil diagnostique, une détermination sommaire des classes d'immunoglobulines porteuses de l'activité agglutinante ainsi que des indications supplémentaires sur le rôle du digalactolipide chez *T. gondii*.

Le serum anti-DGDG permet une agglutination des parasites vivants et fixés. De plus, cette agglutination est proportionnelle à la quantité de serum présente dans le milieu réactionnel. La reconnaissance de l'antigène digalactolipidique (au niveau de la tête polaire d'un lipide appelé DGLE) décrite dans le chapitre II, engendre vraisemblablement cet effet, *via* les anticorps présents dans le serum de lapin. En plus d'apporter de nouvelles informations sur la présence de l'antigène en surface du parasite, ces résultats sont cohérents avec l'agglutination de chloroplastes et de mitochondries d'Angiospermes (en carence de phosphate), tous deux porteurs de DGDG à la surface de leur membrane la plus externe. Sachant que les IgM sont les isotypes les plus efficaces pour l'immunoagglutination et que ceux-ci sont très abondants dans le serum anti-DGDG au vu de l'action du βME lors de l'expérience sur parasites fixés (Figure 2), il est possible de conclure que :

- des IgM présentes dans le serum de lapin immunisé reconnaissent le digalactolipide de surface ; toutefois, nous n'avons pas déterminé si les IgM présentes dans le serum anti-DGDG sont spécifiques du digalactolipide ;

- d'autres classes d'immunoglobulines du serum sont capables de reconnaitre la surface de *Toxoplasma gondii* puisque le phénomène d'agglutination n'est pas totalement supprimé par l'action du βME.

Ces résultats posent la question de savoir si les épitopes reconnus par les IgG de ce serum et visualisés sur la surface des parasites extracellulaires (chapitre III) sont distribués de la même manière que ceux reconnus par les IgM. Cette question pourrait être résolue par des marquages de parasites libres avec l'anticorps anti-DGDG puis l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-IgM couplé à un fluorophore. On pourrait alors éliminer l'hypothèse de réactions croisées entre les anticorps du serum de lapin séronégatif et d'autres antigènes que l'épitope dont ils sont spécifiques. Chez l'homme, par exemple, il est démontré que les IgM qui constituent le facteur rhumatoïde (auto-anticorps) réagissent avec les parasites lors des tests de détection de la toxoplasmose.

La propriété agglutinante du serum anti-DGDG en fait cependant un outil potentiel de diagnostic.

Le serum anti-DGDG inhibe l'invasion du parasite dans les cellules hôtes de manière dose-dépendante. Les anticorps monoclonaux anti-SAG1 utilisés dans les expériences décrites dans ce chapitre confirment les études selon lesquelles des anticorps monoclonaux anti-SAG1 seraient capables de prévenir l'invasion parasitaire (Mineo et al. 1993, Velge-Roussel et al. 2001). Cependant, nos études démontrent que l'effet observé avec l'anti-SAG1 (Tg 17.054) est beaucoup plus faible qu'avec le serum anti-DGDG. Ceci est d'autant plus intriguant que SAG1 est une des protéines majeures de la surface de *T. gondii* et qu'au contraire, le digalactolipide reconnu par le serum anti-DGDG semble être un composant mineur de la pellicule du parasite (Botté et al. soumis, chapitre III). De plus, si on considère que les inhibiteurs de la MGDG synthase végétale invalident la synthèse de cet antigène et que le traitement de parasites par ces inhibiteurs n'entraîne aucun effet sur la motilité et la sécrétion des micronèmes, on pourrait imaginer un rôle du DGLE dans l'attachement précoce du parasite à la cellule hôte. Or, en amont de l'attachement des protéines majeures (SAG, MIC) à la cellule hôte, un attachement précoce de glycanes du parasite à la cellule hôte pourrait avoir lieu (Carruthers et al., 2000). Réciproquement, le processus d'attachement de *T. gondii* semble également mettre en jeu la reconnaissance de nombreux polymères oligosaccharidiques présents sur la cellule hôte, par des protéines parasitaires telles que TgMIC1 (Blumenschein et al. 2007) et SAG1 (Graille et al. 2005).

L'attachement du parasite semble donc dépendre en partie d'interactions avec des sucres. Afin de vérifier l'implication potentielle du DGLE dans l'invasion parasitaire, une galactosidase spécifique des liaisons α et β (portées par l'antigène digalactolipidique) pourrait être utilisée sur les parasites. Les parasites traités seraient ensuite soumis à un test d'inhibition d'invasion tel que nous l'avons mené.

Il n'en reste pas moins que le traitement des parasites par le serum de lapin anti-DGDG est efficace pour prévenir l'invasion du parasite. On pourrait raisonnablement attribuer cet effet aux IgM spécifiques du DGLE. En effet, une étude rapporte que les IgM

spécifiques des tachyzoïtes de *T. gondii* limitent la dissémination des parasites lors des phases précoces de l'infection aiguë, par réduction du nombre de parasites intracellulaires (Couper et al. 2005). Les auteurs n'ont pas identifié qu'elle était la cible de ces IgM spécifiques mais ils ont suggéré une reconnaissance possible des protéines SAG1, SAG2 ou encore AMA1. Nos résultats montrent que le serum anti-DGDG contient des IgM et qu'il inhibe l'invasion active du parasite. On pourrait donc penser que ce sont les IgM du serum, spécifiques du DGLE, participent à la réduction du nombre de parasites intracellulaires. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par purification des IgM et/ou des IgG du serum puis par la recherche des effets des différentes fractions sur l'invasion. Il faut noter que lors d'une infection, y compris lors de la toxoplasmose chez l'homme, les IgM sont les premiers types d'immunoglobulines produits lors de la réponse immunitaire et qu'elles ne perdurent que peu de temps (jusqu'à 3 mois). La plupart des diagnostics de la phase aiguë de maladies infectieuses sont d'ailleurs basés sur la détection de ces IgM. Lors des protocoles d'immunisation des lapins pour la production de serums spécifiques, la cinétique d'apparition des immunoglobulines est à peu près la même.

On peut s'interroger sur la présence d'IgM spécifiques du DGLE dans le serum anti-DGDG. D'après le protocole d'immunisation des lapins, le prélèvement terminal de sang aurait été réalisé à la limite de la disparition des IgM dans le sang. De plus, de nombreuses infections sont à l'origine d'IgM résiduelles qui persistent dans le sang jusqu'à 6 mois après l'infection. C'est peut-être le cas dans le serum anti-DGDG. Il n'existe pas d'étude portant sur la cinétique d'apparition des immunoglobulines lors de l'immunisation par un lipide, du fait de la rareté de ce type de protocole réussi. On ne peut donc pas comparer ce qui s'est produit lors du prélèvement du serum de lapin anti-DGDG avec les nombreux exemples d'immunisation par des protéines. Cependant, les données expérimentales réunies ici suggèrent l'existence d'IgM spécifiques de l'antigène digalactolipidique dans ce serum.

Le serum de lapin anti-DGDG induit la phagocytose par l'opsonisation des tachyzoïtes. L'effet n'est observé que pour les fortes concentrations du serum (dilutions 1/1, 1/5 et 1/2 ; non montré). Encore une fois, l'identification de l'isotype d'immunoglobulines responsables de cet effet est nécessaire. Les cellules phagocytaires et en particulier les macrophages, possèdent des récepteurs du fragment constant de l'ensemble des Ig du système immunitaire. On pourrait donc purifier les IgG du serum et vérifier si la phagocytose est toujours facilitée ou non en utilisant les IgG purifiées. Une deuxième solution serait d'utiliser des souris génétiquement modifiées, dont l'expression des FcγR est réduite (Mineo et al. 1993) et mesurer l'effet du serum anti-DGDG sur la phagocytose des parasites par les macrophages de ces souris.

Le serum de lapin anti-DGDG induit l'activation de la voie classique du complément. Le protocole expérimental ne permet pas de vérifier si cette activation entraîne la mort du parasite. Cependant, il est probable que la protéine C4 hémolytique soit formée et qu'elle induise l'ensemble de la cascade enzymatique, ce qui résulte en la formation de pores lytiques dans la membrane du pathogène. De plus, cette activation du complément devrait permettre le recrutement de cellules phagocytaires *via* l'interaction entre la membrane du parasite et la

protéine C3b et le recrutement d'autres leucocytes grâce au rôle chimiotactique de certaines protéines du complément formées elles aussi lors de la cascade.

En conclusion, l'immunisation de lapins avec du DGDG a permis l'obtention d'un serum anti-DGDG reconnaissant bien entendu le DGDG chez les organismes photosynthétiques mais reconnaissant aussi un digalactolipide de type végétal chez le parasite *T. gondii*. Il nous est maintenant possible d'établir une séquence d'évènements caractérisant les effets *in vitro* de ce serum (Figure 6).

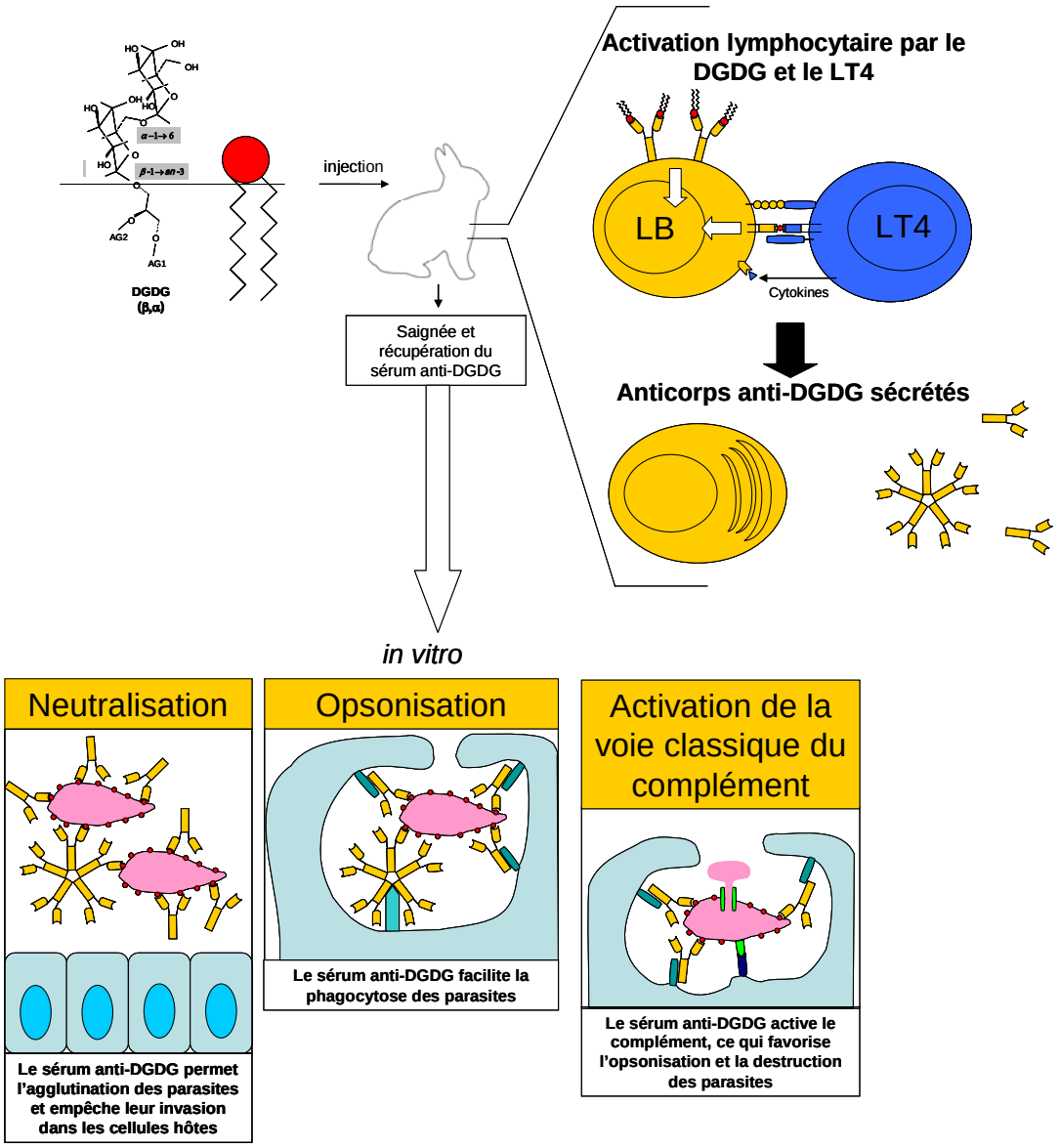


Figure 6 : Schéma récapitulatif de la production du serum de lapin anti-DGDG et de ses effets *in vitro*. Des lapins ont été immunisés avec du DGDG purifié à partir de chloroplastes d'épinards. La tête polaire (βGal-αGal) induit une réponse des lymphocytes B qui sont alors activés en cellules plasmocytaires et synthétisent des anticorps circulants contre cet antigène. Le serum de ces lapins est récupéré, il est spécifique du DGDG des organismes végétaux et reconnaît la tête polaire d'un épitope proche d'un digalactolipide (DGLE) chez *T. gondii*. Ce DGLE est détecté à la surface des parasites apicomplexes. Il permet l'agglutination des parasites vivants et fixés *in vitro*. Il neutralise l'invasion des parasites dans les cellules hôtes *in vitro*. Il facilite la phagocytose des parasites et active la voie classique du complément par opsonisation *in vitro*.

Les résultats *in vitro* bien qu'encore incomplets fournissent des arguments sur la faisabilité d'une stratégie vaccinale basée sur la reconnaissance de l'antigène digalactolipidique de *T. gondii* (Figure 6). Dans un premier temps, la priorité est donnée à la vérification des effets observés *in vitro* chez un modèle animal (la souris). Des expériences préliminaires de transfert passif de serum de lapin anti-DGDG à la souris (*i.e.* injection du serum par intra-veineuse suivie d'une infection par injection intra-péritonéale de tachyzoïtes de *T. gondii* et suivi de la survie des souris) sont en cours. Les premières expériences de contrôle montrent que l'injection d'un serum de lapin n'entraîne pas de choc anaphylactique létal chez la souris. Si le transfert passif protège la souris, l'étape suivante consistera en une véritable vaccination de l'animal. Des souris seront immunisées avec une quantité conséquente de DGDG, comme cela avait été le cas lors de la synthèse du serum de lapin anti-DGDG. Après avoir vérifié la présence des anticorps anti-digalactolipides dans le serum des animaux, un nombre létal de parasites sera injecté à ces souris. La survie démontrerait que les souris ont généré une réponse protectrice contre le toxoplasme, ce qui validerait *in vivo*, les résultats *in vitro* présentés dans ce mémoire.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre a fait l'objet d'un dépôt de brevet d'invention :

Botté C, Saïdani N., Block M., Dubremetz J-F, Vial H, Cesbron-Delauw M-F, Mercier C. and Maréchal E (2007). *Antigène digalactolipidique exposé à la surface des parasites apicomplexes et ses applications diagnostiques et thérapeutiques* (Surface exposure of digalactolipid antigene in apicomplexan parasites and therapeutical and diagnostic applications. Exposition de surface d'antigènes digalactolipidiques chez les parasites apicomplexes, applications thérapeutiques et diagnostiques).

Conclusion

Chez les plantes, les galactolipides (monogalactosyldiacylglycérol, MGDG et digalactosyldiacylglycérol, DGDG) sont les lipides principaux des membranes plastidiales. Outre leur rôle structurant des bicouches lipidiques, les galactolipides sont essentiels au processus de la photosynthèse. Lors de la carence en phosphate, condition à laquelle la plante est très souvent exposée, le DGDG semble compenser l'absence des phospholipides dans l'ensemble des membranes de la cellule. Leur synthèse est donc cruciale pour la biogenèse du plaste et pour la survie de la cellule végétale. Les galactolipides sont synthétisés au niveau des membranes du chloroplaste par deux activités galactosyltransférases, catalysées par les MGDG synthases (MGD) et DGDG synthases (DGD). Les gènes codants pour ces protéines sont identifiés et la localisation précise de chacune des enzymes au niveau des membranes du chloroplaste est connue. Les MGDG synthases qui sont à l'origine des deux classes de galactolipides sont les enzymes clés ce cette voie de biosynthèse. Leur structure tridimensionnelle était inconnue au début des travaux présentés dans ce manuscrit.

A l'exception des cryptosporidies, les Apicomplexes possèdent eux aussi un plaste nommé l'apicoplaste. Cet apicoplaste a été acquis par endosymbiose secondaire. Il est probablement issu d'une algue rouge. Cet héritage est responsable de nombreuses voies biochimiques caractéristiques des végétaux. L'apicoplaste est essentiel à la survie du parasite, tout comme son homologue chez les plantes. La synthèse de lipides aux propriétés chromatographiques indiscernables du MGDG et du DGDG a été mesurée chez *Toxoplasma gondii*. Il a été supposé que les activités galactosyltransférases permettant de produire des galactolipides chloroplastiques étaient présentes chez *T. gondii* et qu'elles pourraient être localisée au niveau des membranes de l'apicoplaste.

L'objectif de ma thèse était tout d'abord d'élaborer un modèle structural de la MGDG synthase végétale afin de comprendre son mode de fonctionnement, d'apporter des informations structurales sur cette famille d'enzymes chez les eucaryotes dotés de plastes. Nous souhaitions aussi identifier et développer une nouvelle classe d'inhibiteurs de cette enzyme et évaluer ces composés sur différents modèles d'eucaryotes ayant un plaste, développement rationalisé par le modèle de la MGDG synthase. Le dernier objectif était d'identifier le rôle des galactolipides présumés chez les Apicomplexa, par approche immunocytologique sur le modèle *T. gondii*.

Les MGDG synthases chloroplastiques sont des enzymes membranaires difficiles à cristalliser. En collaboration avec l'équipe de Christelle Breton (CERMAV, Grenoble), nous avons tout d'abord établi un modèle structural des MGDG synthases d'*Arabidopsis thaliana*

(atMGD1, atMGD2 et atMGD3) et de *Spincacia oleracea* (soMGD1) (Chapitre I) basé sur les homologies de séquences qu'elles partagent avec les MURG, une famille de glycosyltransférases bactériennes. Les MURG catalysent le transfert du *N*-acétylglucosamine à partir d'un donneur couplé à l'UDP, sur le lipide 1 des membranes bactériennes lors de la synthèse du peptidoglycane. L'enzyme d'*Escherichia coli* a été cristallisée et sa structure résolue. Les MURG font partie de la même famille de glycosyltransférases que les MGD et possèdent 20 % d'identité de séquences avec ces dernières. Nous avons réalisé un modèle structural de la MGDG synthase fondé sur ces homologies de séquences, fournissant des informations sur la structure générale de la protéine mais aussi sur la topologie et la composition en acides aminés du site catalytique présomptif ainsi que des sites présomptifs d'acceptation des substrats (UDP-GAL et DAG). Grâce aux connaissances accumulées au laboratoire sur la biochimie et la synthèse de MGD recombinantes, nous avons tenté de valider le modèle moléculaire par une stratégie rationalisée de mutations ponctuelles suivie de tests d'activité des mutants. Nous avons obtenu une série de mutants ponctuels montrant tous une inhibition marquée de l'activité galactosyltransférase. Ces résultats soutiennent le modèle prédit pour la structure tridimensionnelle de la MGDG synthase. Selon ce modèle, l'enzyme est repliée en double Rossman fold de manière similaire à MURG, à l'exception de deux boucles n'ayant aucune homologie avec MURG. Certains résidus de cette boucle manquante ont été proposés comme candidats pour la fixation et la sélection du DAG. Le modèle permet de définir avec précision l'ensemble des acides aminés responsables de la fixation des différents composants de l'UDP-Gal (uracile, ribose, galactose) ainsi qu'une boucle elle aussi impliquée dans l'acceptation du nucléotide sucre. Les mutations des cystéines et des lysines localisées à proximité du site présomptif de l'UDP-Gal entraînent une perte totale de l'activité. On pense qu'elles pourraient avoir un rôle durant l'activité catalytique de la liaison du galactose sur le DAG. Enfin, la présence de résidus hydrophobes de surface regroupés dans une des régions de l'enzyme suggère que ces résidus formeraient un domaine d'association de la protéine avec la membrane.

Par la suite, nous avons montré que des inhibiteurs de la MGDG synthase 1 d'*Arabidopsis thaliana* (atMGD1) identifiés dans une chimiothèque de 23360 composés par criblage pharmacologique à haut débit effectué en collaboration avec la société CEREP (Chapitre II), possédaient des effets herbicides, algistatiques et anti-parasitaires. Ces résultats ont été obtenus sur trois modèles d'organismes eucaryotes dotés de plastes : *Arabidopsis thaliana*, modèle Angiosperme, *Chlamydomonas reinhartdii*, modèle d'algue verte et *Toxoplasma gondii*, modèle Apicomplexe. Nous avons tout d'abord identifié deux inhibiteurs de la MGDG synthase recombinante atMGD1 grâce à un test miniaturisé automatisé. Nous avons validé la bioactivité de ces composés sur l'ensemble de la famille multigénique des MGDG synthases d'*Arabidopsis*. Nous avons développé un test pour mesurer l'effet de ces molécules sur le développement de deux organismes photosynthétiques : une plantes verte, *A. thaliana* et une algue verte, *C reinhartdii*. Ces mesures ont montré que les inhibiteurs sont capables de bloquer le

développement de ces deux organismes. Ces études ont aussi permis pour la première fois de valider, par KO chimique, l'hypothèse selon laquelle le MGDG était essentiel à la survie des plantes. La seconde partie de ce travail a consisté à déterminer les propriétés anti-parasitaires de ces inhibiteurs sur *T. gondii* propagé *in vitro* dans des fibroblastes humains. Un effet délétère sur *T. gondii* a été observé, avec des effets toxiques limités sur cellules humaines. Ces résultats sont cohérents avec la présence d'une cible (protéine entière ou site de liaison) homologue chez les Apicomplexes. Après avoir mis au point un test de mesure approprié chez *T. gondii*, nous avons pu mesurer les IC50 de ces molécules sur le parasite et fait de même sur plantes et algues vertes.

Nous nous sommes ensuite engagés dans un programme collaboratif entre l'UMR 5168 (équipe d'Eric Maréchal ; iRTSV, CEA Grenoble), l'UMR 5163 (équipe de Marie-France Cesbron-Delauw ; Institut Jean Roget, Grenoble), l'UMR 5539 (équipes de Jean-François Dubremetz et d'Henri Vial, projet de thèse de Nadia Saïdani ; Université de Montpellier) et l'iBITEC-S (équipe de Roman Lopez et Bernard Rousseau ; CEA Saclay) dans un programme d'optimisation des molécules inhibitrices des MGDG synthases, visant à développer des candidats herbicides et/ou anti-parasitaires. En un an et demi, nous avons synthétisé et mesuré l'activité de plus de 200 dérivés des molécules initiales sur l'ensemble des modèles. Au cours de cette campagne nous avons déterminé les IC50 de toutes ces molécules ainsi que leurs effets possibles sur la prolifération sur modèle d'érythroblastes humains. Nous avons ainsi caractérisé des composés dont les valeurs d'IC50 se rapprochent de celles utilisées dans le cas de traitements par des herbicides chez les plantes et par des anti-parasitaires chez *T. gondii*, avec un index thérapeutique amélioré (Chapitre II). Des familles de dérivés présentent un large spectre d'inhibition de croissance et de prolifération de l'ensemble des organismes modèles, ou bien sont spécifiques de l'un ou l'autre des modèles.

Nos connaissances sur l'existence des galactolipides chez les parasites Apicomplexes restaient malgré tout restreintes. Nous avons étudié la présence et la localisation cellulaire de la classe de lipides proches du DGDG (digalactolipid like epitope, DGLE) grâce à une série d'outil développé au laboratoire, à savoir deux serums polyclonaux de lapin et un serum de rat, tous obtenus par immunisation des animaux avec du DGDG purifié à partir de chloroplastes de feuilles d'épinards. Un serum anti-DGDG de lapin permet de détecter par immunofluorescence ainsi que par immunoaglutination, les chloroplastes des plantes ainsi que les mitochondries (lorsqu'elles sont chargées en DGDG dans le cas de la carence en phosphate). La spécificité de ces anticorps a été examinée par immunoblot. Nous avons montré d'une part que les serum polyclonaux anti-DGDG ne reconnaissent substantiellement ni les protéines de *T. gondii,* ni celles de cellules humaines, et ce même pour les protéines faiblement représentées. Les études de spécificité sur les grandes classes lipides ont montré que les serums obtenus sont dirigés contre un digalactolipide et plus particulièrement, contre la tête polaire composée d'un groupement digalactosyl ayant une anomérie α-galactose(1→6)β-galactose. De plus, d'après les marquages

métaboliques réalisés au cours des études précédentes, ce lipide contiendrait au moins un acyl ester hydrolysable dans sa partie hydrophobe. Les analyses de localisation cellulaire chez le tachyzoïte de *T. gondii*, ont ensuite montré que la classe de DGLE n'était pas détectable sur les membranes de l'apicoplaste. En revanche, le DGLE a été localisé sur les trois membranes qui composent la pellicule de *T. gondii*, la membrane plasmique et celles de l'IMC (complexe membranaire interne). De plus, ce lipide est distribué de manière ponctiforme uniformément réparti sur la périphérie des parasites extracellulaires, formant des regroupements semblables aux domaines membranaires. Lorsque le parasite est intracellulaire, il semble que le DGLE se relocalise pour former un gradient de densité au niveau du pôle apical de la cellule. Il est localisé de manière similaire sur le pôle apical des futures cellules filles lors du processus d'endodyogénie. De plus, le DGLE est détecté au niveau d'une zone correspondant au corps résiduel en fin de division cellulaire. De manière surprenante, le traitement des tachyzoïtes en présence de cytochalasine D (agent dépolymérisant des filaments d'actine) entraîne une redistribution du digalactolipide depuis un marquage de type intracellulaire vers un marquage observé lors des stades extracellulaires. Des préparations du réseau sous-pelliculaire ont montré qu'effectivement, le DGLE est associé aux protéines du cytosquelette. Les traitements dirigés contre d'autres polymères du cytosquelette (microtubules, filaments intermédiaires) ne provoquent pas le même effet. Le DGLE pourrait donc être impliqué dans l'association avec certaines protéines du glideosome (ex : laprotéine GAP50) au sein de domaines membranaires de l'IMC. On observe un marquage similaire chez certains stades de *Plasmodium falciparum*, de *Neospora caninum* et de *Cryptosporidium parvum* (résultats de N. Saïdani et résultats personnels non montrés). La localisation du DGLE chez *Cryptosporidium* indiquerait que la synthèse du DGLE ne se situerait pas au niveau de l'apicoplaste. Enfin, l'analyse de fractions pelliculaires en spectrométrie de masse ne permet pas de déterminer la structure exacte du DGLE : il s'agit d'un lipide mineur qui pourrait être un dihexosyldiacylglycérol, un dihexosylalkylacylglycérol ou encore un dihexosylcéramide, dont l'identité reste à déterminer.

L'étude des lipides de *T. gondii* par immunomarquage montre qu'il est possible de stimuler chez le lapin et le rat, par immunisation avec du DGDG, une production d'anticorps reconnaissant un épitope superficiel de *Toxoplasma*. Le DGLE détecté est exposé au niveau de la membrane plasmique du parasite et notamment, sur le feuillet externe de cette membrane. Ces résultats nous ont menés à étudier la tête polaire du DGLE en tant que cible pour des outils diagnostiques ou pour des approches vaccinales (Chapitre IV). Notre approche préliminaire a consisté à utiliser le serum de lapin anti-DGDG comme modèle pour des études *in vitro* chez *T. gondii*. Nous avons montré que le serum anti-DGDG provoquait en particulier l'immunoagglutination des parasites vivants et extracellulaires. L'utilisation d'un test diagnostique clinique soutient ce résultat en montrant l'agglutination des parasites fixés grâce à un traitement par le serum. Le serum anti-DGDG provoque une inhibition marquée de l'invasion du parasite à l'intérieur de la cellule hôte et une augmentation de la phagocytose par les

macrophages lorsque le serum opsonise la surface du parasite extracellulaire. Enfin, ce serum provoque une activation de la voie classique du complément.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de progresser

1) dans la compréhension des processus de synthèse des galactolipides chez les plantes. Ils ont permis en particulier d'étudier la relation entre la structure des enzymes de synthèse du MGDG et leur fonction moléculaire ;
2) sur la synthèse et la localisation de lipides structurellement apparentés au MGDG et au DGDG chez les Apicomplexes. L'ensemble ouvre des possibilités thérapeutiques nouvelles.

Beaucoup de données permettant de comparer métabolisme et dynamique des galactolipides chez les plantes et les Apicomplexes, restent néanmoins inconnues et notamment en ce qui concerne les Apicomplexes. Il sera important dans un premier temps, de déterminer quelle est la(les) protéine(s) reconnue(s) par les inhibiteurs des MGDG synthases végétales. Cette caractérisation de la cible parasitaire pourra bénéficier des connaissances acquises sur les relations de QSAR (quantitative structure-activity relationship) déduites des profils de bioactivité des dérivés étudiés ici (déduction des groupements pharamocophoriques déterminant le spectre pharmacologique de chaque dérivé sur l'ensemble, ou certains des organismes étudiés), ainsi que d'un dérivé biotinylé synthétisé suivant ces relations de QSAR. Ce dérivé biotinylé, pour lequel nous avons déjà démontré qu'il inhibait la prolifération de *T. gondii*, pourra en particulier être exploité pour réaliser des analyses par chromatographies d'affinité d'extraits protéiques de *T. gondii*. Une analyse transcriptomique après traitements par des inhibiteurs est-elle aussi envisageable afin d'orienter les études futures sur des gènes candidats susceptibles de réaliser une synthèse lipidique concordante, ou bien des gènes dont l'expression est spécifiquement modifiée par le traitement. Ce type d'approche permettrait aussi d'aider à élucider le mode de fonctionnement de ces inhibiteurs chez *T. gondii*.

Concernant la MGDG synthase végétale, l'action des inhibiteurs devra être analysée pour dégager les mécanismes enzymatiques mis en jeu à l'échelle moléculaire lors de leur fixation. Des travaux pour affiner la structure des MGDG synthases sont en cours dans l'équipe de Christelle Breton (CERMAV, Grenoble). Il sera intéressant de tenter de caractériser précisément le site sur lequel les inhibiteurs agissent par « docking virtuel ». La précision du site de fixation sera un élément supplémentaire pour la recherche de cibles homologues (portées par une enzyme ayant une activité glycosyltransférase, ou une protéine de fonction différente mais présentant un site semblable pour ces ligands) chez les Apicomplexes.

Le rôle du DGLE est lui aussi à approfondir. En effet, la relocalisation lors du passage du stade extracellulaire au stade intracellulaire ainsi que sous l'effet de la cytochalasine D restent

inexpliqués. De plus, la localisation au niveau de la membrane plasmique, des membranes de l'IMC. Sa présence dans des domaines membranaires et son association avec les constituants du réseau sous-pelliculaire (et protéines associées) suggèrent une possible interaction avec le glideosome et/ou des protéines de micronèmes. Des comarquages du DGLE avec certaines de ces protéines (par exemple MIC2, GAP50 ou GAP45) par immunofluorescence seront nécessaires. Des protocoles de superposition lipides-protéines sur membrane de nitrocellulose (« fatblots ») entre du DGDG purifié et ces protéines (recombinantes ou natives si elles peuvent être purifiées) sont également envisageables pour répondre à ces questions. Néanmoins, les études structurales engagées ici par approches d'immunomarquage et par la détermination de profil lipidomique par spectrométrie de masses trouvent leurs limites techniques. Les études futures nécessiteront en particulier des fractionnements membranaires et lipidiques, en quantités suffisantes pour résoudre les structures lipidiques suivies.

Enfin, les études préliminaires réalisées sur le potentiel thérapeutique du DGDG/DGLE chez *T. gondii* doivent être validées *in vivo*, tout d'abord par transfert passif puis par une véritable tentative vaccinale à l'aide de DGDG, suivie d'une infection par des parasites. Les connaissances relatives au DGLE chez *T. gondii* permettront par ailleurs d'examiner le métabolisme des glycolipides chez d'autres modèles parasitaires Apicomplexes pour lesquels de nouvelles approches thérapeutiques sont recherchées.

Annexe

Contribution à l'établissement du profil lipidomique de *Toxoplasma gondii*

Article 3

Ruth Welti, Ernie Mui, Alexis Sparks, Sarah Wernimont, Giorgis Isaac, Michael Kirisits, Mary Roth, Craig W. Roberts, Cyrille Botté, Eric Maréchal and Rima McLeod (2007)
« Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* reveals unusual polar lipids »
Biochemistry, sous presse

Lipidomic Analysis of *Toxoplasma gondii* Reveals Unusual Polar Lipids†

Ruth Welti,‡ Ernie Mui,§ Alexis Sparks,‡ Sarah Wernimont,§ Giorgis Isaac,‡ Michael Kirisits,§ Mary Roth,‡ Craig W. Roberts,|| Cyrille Botté,⊥ Eric Maréchal,⊥ and Rima McLeod*,§

Kansas Lipidomics Research Center, Division of Biology, Kansas State University, Manhattan Kansas 66506, Departments of Ophthalmology and Visual Sciences, Pediatrics (Infectious Diseases) Committees on Molecular Medicine, Immunology and Genetics and The College, University of Chicago, Chicago Illinois 60637, Strathclyde Institute of Pharmacy & Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland, UK, and Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, UMR 5168 CNRS-CEA-INRA-Université J. Fourier, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, Grenoble, France

Received June 18, 2007; Revised Manuscript Received September 10, 2007

ABSTRACT: Analysis of the polar lipids of *Toxoplasma gondii* by electrospray ionization tandem mass spectrometry provides a detailed picture of the lipid molecular species of this parasitic protozoan. Most notably, *T. gondii* contains a relatively high level, estimated to about 2% of the total polar lipid, of ceramide phosphoethanolamine. The ceramide phosphoethanolamine has a fatty amide profile with only 16- and 18-carbon species. Compared with the host fibroblasts in which it was grown, *T. gondii* also has higher levels of phosphatidylcholine but lower levels of sphingomyelin and phosphatidylserine. Analysis at the molecular species level indicated that *T. gondii* has greater amounts of shorter-chain fatty acid in its polar lipid molecular species than the host fibroblasts. Shorter-chain fatty acids with a combined total of 30 or fewer acyl carbons make up 21% of *Toxoplasma*'s, but only 3% of the host's, diacyl phosphatidylcholine. Furthermore, diacyl phosphatidylcholine with two saturated acyl chains with 12, 14, or 16 carbons make up over 11% of parasite phosphatidylcholine but less than 3% of the host phosphatidylcholine molecular species. The distinctive *T. gondii* tachyzoite lipid profile may be particularly suited to the function of parasitic membranes and the interaction of the parasite with the host cell and the host's immune system. Combined with *T. gondii* genomic data, these lipidomic data will assist in elucidation of metabolic pathways for lipid biosynthesis in this important human pathogen.

Toxoplasma gondii infects 2−3 billion people throughout the world and is known to cause diseases that impair neurologic function and sight. A *T. gondii* infection can be life-threatening to those who are immunologically immature or immunologically impaired by AIDS, cancer, organ transplantation, or their therapy and, in some instances, to persons without known immune compromise.

Potential differences in the lipid metabolism of *T. gondii* and mammalian hosts may provide promising targets for therapeutic drugs. Thus far, manipulation of fatty acid synthesis (*1*−*5*), phosphatidylcholine metabolism (*6*), and sphingolipid synthesis (*7*) have been shown to affect tachyzoite growth and survival. The origin of fatty acids for synthesis of acyl lipids has been intensely investigated by molecular and metabolic labeling approaches. The apicoplast harbors an active fatty acid synthase of type II (FASII) (*1, 2, 8*−*11, 13*). *T. gondii* also contains a cytosolic fatty acid synthase of type I (FAS I) and fatty acyl-elongases (FAEs) (*1*, *5*, *12*). On the basis of metabolic labeling experiments, Bisanz et al. (*13*) showed that in free *T. gondii*, *de novo* fatty acid synthesis was one of the sources for the acyl moiety of glycerolipids. Since acyl lipid labeling is abolished by treatment with haloxyfop, a reported inhibitor of the apicoplast acetyl CoA carboxylase, Bisanz et al. (*13*) concluded that an active FAS II was critical for the bulk of the acyl lipid synthesis. Combining conditional mutant analyses and metabolic labeling, Mazumdar et al. (*5*) demonstrated that FAS II was critical for the biogenesis of the apicoplast itself, and subsequently for parasite survival, but was unlikely the source of the acyl moiety of the bulk of acyl lipids. Rather, most glycerolipids from free *T. gondii* cells appears to be produced using acyl chains generated by FAS I or FAEs, which are resistant to the FAS II inhibitor thiolactomycin but sensitive to the general FAS inhibitor cerulenin (*5*). Together, these analyses highlight the importance (1) of the parasite FAS for bulk acyl lipid syntheses in free stages and (2) of the FAS II activity for the apicoplast biogenesis. Bisanz

† This work was supported by NIH NIAID R01s AI27530, AI43228, AI071319, the Research to Prevent Blindness Foundation, and gifts from the Kieweit, Blackmon, Brennan, Koshland, Langel, Morel, Rosenstein, Cussen, Kapnick, and Rooney-Alden families. Work and instrument acquisition at the Kansas Lipidomics Research Center Analytical Laboratory were supported by grants from NSF (MCB 0455318 and DBI 0521587) and NSF's EPSCoR program (EPS-0236913), with matching support from the State of Kansas through Kansas Technology Enterprise Corporation and Kansas State University, as well from NIH grant P20 RR016475 from the INBRE program of the National Center for Research Resources. This is contribution 07-308-J from the Kansas Agricultural Experiment Station.

* To whom correspondence should be addressed: Rima McLeod, M.D., The University of Chicago, AMBH S206, 5841 S. Maryland Ave., Chicago, IL 60637. Phone: 773-834-4130. Fax: 773-834-3577. E-mail: rmcleod@midway.uchicago.edu.

‡ Kansas State University.

§ University of Chicago.

|| University of Strathclyde.

⊥ Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant.

BATCH: bi12b34 USER: pad29 DIV: @xyv04/data1/CLS_pj/GRP_bi/JOB_i49/DIV_bi7011993 DATE: October 25, 2007

et al. (*13*) surveyed lipid-synthesizing gene candidates in *T. gondii* and identified a glycerol-phosphate acyltransferase and a lysophosphatidate acyltransferase (phosphatidic acid synthase) that are predicted to be localized in the apicoplast, supporting the notion that fatty acids produced by FAS II are important for the organelle membrane expansion. Upon invasion, in spite of its autonomous capacity to synthesize its major membrane acyl lipids, *T. gondii* massively scavenges host cell lipid precursors for membrane biogenesis (*6*, *13*, *14*). Information about *T. gondii* lipids and their biosynthetic machinery and about the relationship between parasite and host cell lipids is still incomplete. Herein, analysis of the polar lipids of *T. gondii* tachyzoites (clonal type 1 RH) is described. Lipidomic analysis results in unprecedented compositional detail that provides new insight into the differences between host and parasite lipids. This information will facilitate metabolic reconstruction of lipid synthesis and metabolism in *T. gondii* following completion of genome sequence annotation.

MATERIALS AND METHODS

Toxoplasma Cell Pellet Preparation. The RH strain of T. *gondii* was maintained by serial passage in human foreskin fibroblast (HFF) (*15*) that were grown to a confluent monolayer in glass Petri dishes (150 mm diameter). Cells were cultured in IMDM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) inactivated at 56 °C for 1 h, 1 IU of penicillin/mL, 100 μg/mL of streptomycin, 0.25 μg/mL of amphotericin B, and 10 mM L-glutamine at 37 °C with 5% CO_2. On day 4 of infection, tachyzoites were harvested from HFF cells by scraping the monolayer. The cell suspension was passed through a 25-gauge needle twice and a 27-gauge needle once. The cell suspension was then passed through a 3.0 μm filter (removing any HFF cells), before centrifuging at 1500 rpm (500*g*) for 15 min. The supernatant was removed, and the parasite pellet was frozen and stored at −70 °C.

Fibroblast Preparation. Human foreskin fibroblasts (HFF) that were not infected were analyzed for comparison. They were grown to a confluent monolayer in glass Petri dishes (150 mm diameter) in IMDM supplemented with 10% FCS inactivated at 56 °C for 1 h, 1 IU of penicillin/mL, 100 μg/mL of streptomycin, 0.25 μg/mL of amphotericin B, and 10 mM L-glutamine at 37 °C with 5% CO_2. The cells were obtained from the Petri dish by scraping the monolayer and centrifuging at 1500 rpm (500*g*) for 15 min. The supernatant was removed, and the cell pellet was frozen and stored at −70 °C.

Lipid Extraction. To 0.8 mL of cells, 1 mL of chloroform and 2 mL of methanol were added. The sample was shaken, and 1 mL of chloroform and 1 mL of water were added. The samples were again shaken and centrifuged at approximately 1500*g* for 5 min. The lower phase was removed. One part chloroform was added, the mixture was shaken again and centrifuged, and again the lower phase was removed. This was repeated, and the combined lower phases were washed once with 0.4 mL of 1 M KCl and once with 0.4 mL of water. The solvent was evaporated, and the sample was dissolved in 1 mL of chloroform.

Lipidomics. An automated electrospray ionization-tandem mass spectrometry approach was used, and data acquisition and analysis and acyl group identification were carried out as described previously (*16*, *17*) with some modifications. An aliquot of extract (0.040 mL) was taken for mass spectrometry analysis. Internal standards were added, the solvent was evaporated, and the lipid was redissolved in chloroform/methanol/300 mM ammonium acetate in water (300/665/35) with a final volume of 1 mL. Internal standards, obtained and quantified as previously described (*16*), were 0.063 nmol di14:0 PC[1], 0.054 nmol di24:1 PC, 0.066 nmol 13:0 lyso PC, 0.066 nmol 19:0 lyso PC, 0.038 nmol di14:0 PE, 0.031 nmol di24:1 PE, 0.039 nmol 14:0 lyso PE, 0.034 nmol 18:0 lyso PE, 0.030 nmol di14:0 PA, 0.032 nmol di20:0(phytanoyl)-PA, 0.023 nmol di14:0 PS, 0.023 nmol di20:0(phytanoyl) PS, 0.015 nmol 16:0−18:0 PI, and 0.007 nmol di18:0 PI, 0.196 nmol d18:1/14:0 Cer, 0.155 nmol d18:1/12:0 Hex-cer and 0.124 nmol d18:1/12:0 Dihex-cer.

Unfractionated lipid extracts were introduced by continuous infusion into an Applied Biosystems 4000 Q-TRAP (MDS Sciex, Ontario, Canada). Samples were introduced using an automated nanospray chip ion source Advion TriVersa NanoMate (Advion BioSciences, Ithaca, NY) at a flow rate of 0.11 μL/min. Ionization voltage was set to 1.8 kV or −1.8 and gas pressure to 0.1 psi, and the source was controlled by ChipSoft 7.1.1 software. The collision gas pressure was set at 2 (arbitrary units) for phospholipids, 1 for glycosyldiacylglycerols, and 5 for Cer, Hex-cer, and Dihex-cer. The collision energies, with nitrogen in the collision cell, were 28 V for PE, 40 V for PC and SM, 47 V for Cer, Hex-cer, and Dihex-cer, −58 V for PI, −57 V for PA, and −34 V for PS. Declustering potentials were 100 V for PE, SM, PC, Cer, Hex-cer, and Dihex-cer and −100 V for PA, PI, and PS. Entrance potentials were 15 V for PE, 14 V for PC and SM, 10 V for Cer, Hex-cer, and Dihex-cer, and −10 V for PI and PA, and PS. Exit potentials were 11 V for PE, 14 V for PC, 15V for Cer, Hex-cer, and Dihex-cer, −15 V for PI, −14 V for PA, and −13 V for PS. The mass analyzers were adjusted to a resolution of 0.7 amu full width at half-height. For each spectrum, 9 to 150 continuum scans were averaged in multiple channel analyzer (MCA) mode. The source temperature (heated nebulizer) was 40 °C, the curtain gas was set at 10 (arbitrary units), and the two ion source gases were turned off.

Lipid species were detected, using the scans previously described, including neutral loss of 87 in the negative mode for PS, and additionally using precursor of 264.2 (sphingosine) in the positive mode for Cer, Hex-cer, and Dihex-cer (*16*, *18*, *19*). Sequential precursor and neutral loss scans of the extracts produce a series of spectra with each spectrum revealing a set of lipid species containing a common fragment. The specificity of precursor scan of 264.2 was confirmed using a neutral loss scan of 162.2 (mono-hexose) and 342.2 (di-hexose) for Hex-cer and Dihex-cer respectively; only peaks observed in both sphingosine and sugar scans were used for quantification. Two internal standards were used for quantification, except for Cer, Hex-cer, and

[1] Abbreviations: Cer, ceramide; PE-cer, ceramide phosphoethanolamine; Dihex-cer, dihexosylceramide; ESI, electrospray ionization; MS, mass spectrometry; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; ePC; (alkyl or alkenyl)/acyl glycerophosphocholine; PE, phosphatidylethanolamine; ePE, (alkyl or alkenyl)/acyl glycerophosphoethanolamine; PI, phosphatidylinositol; ePS, (alkyl or alkenyl)/acyl glycerophosphoserine; Hex-cer, hexosyl ceramide; PS, phosphatidylserine; SM, sphingomyelin; MS/MS, tandem mass spectrometry.

BATCH: bi12b34 USER: pad29 DIV: @xyv04/data1/CLS_pj/GRP_bi/JOB_i49/DIV_bi7011993 DATE: October 25, 2007

Dihex-cer, for which one internal standard was used. Sphingomyelin was determined from the same mass spectrum as PC (precursors of *m*/*z* 184 in positive mode) (*18*−*20*) and by comparison with PC internal standards using a molar response factor for sphingomyelin (in comparison to PC) determined experimentally to be 0.36. PC 28:0 was determined in the absence of added internal standards by comparison with another naturally occurring PC species, which was determined in comparison to internal standards. Ceramide phosphoethanolamine was determined in a similar fashion to sphingomyelin, from the same mass spectrum as PE (neutral loss of *m*/*z* 141) and by comparison with PE internal standards. Because no authentic compound was available, no response factor for PE-cer was determined nor employed. The background of each spectrum was subtracted, the data were smoothed, and peak areas were integrated using a custom script and Applied Biosystems Analyst software. Isotopic overlap corrections were applied, and the lipids in each class were quantified in comparison to the two internal standards of that class using corrected curves determined for the API 4000 mass spectrometer.

Acyl Group Identification and Determination of Ceramide Phosphoethanolamine Structure. The acyl groups of phospholipid species in the *Toxoplasma* lipid extract (without standards) were identified as acyl anions from the appropriate negative ion precursors. The collision energies were 20−55 V. The solvent was chloroform/methanol/300 mM ammonium acetate in water (300/665/35). PI and PE were analyzed as $[M - H]^-$ ions, and PC was analyzed as $[M + OAc]^-$. The relative abundance of the fatty acyl ions was used to designate the position of the acyl chain, as the acyl group in the 2-position generally produces the more abundant ion, although this designation is somewhat equivocal (*21*). The data for determination of PE-cer structure were obtained on an API 4000 without addition of internal standard. The source temperature (heated nebulizer) was 100 °C, the interface heater was on, +5.5 kV was applied to the electrospray capillary, the curtain gas was set at 20 (arbitrary units), the two ion source gases were set at 45 (arbitrary units), the collision gas pressure was 2, and the collision energy was 55 V.

RESULTS

Lipid Classes. Quantitative analysis of polar lipids with masses less than 1000, including diacyl, ether-linked (ePC; i.e. alk(en)yl/acyl PC), and lyso PC, diacyl, ether-linked (ePE), and lyso PE, diacyl and ether-linked (ePS) PS, diacyl PI, diacyl PA, SM, PE-cer, MHexDG (monohexosyldiacylglycerol identified based on MGDG standards), DHexDG (dihexosyldiacylglycerol identified based on DGDG standards), Cer, Hex-cer, and Dihex-cer, of *T. gondii* and its host fibroblasts was performed, using electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). As shown in Figure 1, when the lipid classes were considered as mol % of the total of these lipids from each source, *T. gondii* was found to be enriched in PC (57.4% vs 43.4%), PE-cer (2.4% vs 0.01%), and PA (0.7% vs 0.5%) relative to its host fibroblasts, while the host fibroblasts had (as mol %) relatively more ePC, ePE, lysoPE, diacyl PS, SM, and Hex-cer.

Glycerolipid Molecular Species. An advantage of ESI-MS/MS over traditional methodologies for lipid analysis is that individual lipid molecular species can be identified. In Figure 2, PC molecular species from *T. gondii* and host fibroblasts are depicted. From these data, it is obvious that there are significant differences between the molecular species profile of the parasite and its host. Most strikingly, there are high levels of shorter-chain (28, 30, and 32 carbons in the combined two acyl chains) species in the parasite lipids. PCs with a combined count of 28 and 30 carbons make up about 21% of the *T. gondii* PC molecular species, while these species make up only 3% of the host molecular species. The most prominent of these 28- and 30-carbon species were identified by product ion analysis as 1−16:0,2−14:0 PC, 1−16:1,2−14:0 PC, di14:0 PC, and 1−16:0,2−12:0 PC (Table 1), indicating that saturated 14-carbon and even 12-carbon acyl species are used in phospholipids considerably more frequently by this parasite than by its host. While there are some qualitative differences, the amounts of 34-, 36- and 38- carbon (combined diacyl count) PC molecular species relative to the total polar lipids are roughly similar between the parasite and host. In the longer chain species, the parasite has more PC 40:7, which was shown to be 1−18:1,2−22:6 PC (Table 1). Overall, the PC of *T. gondii* appears to contain PC similar to the host with additional 28-, 30-, and 32-carbon species. Thus, the shorter-chain and mostly saturated species are fairly specific to the parasite.

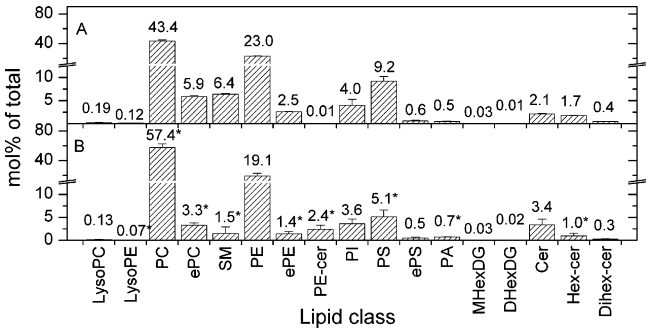


FIGURE 1: Composition of lipid classes in host fibroblasts (A) and *Toxoplasma gondii* (B). Lipids are determined from the total of those lipid classes shown. Numbers above each column indicate the mol % value for that species. The detection of MHexDG and DHexDG was equivocal with trace amounts of several species just at the limit of detection and of uncertain significance. Error bars are standard deviation ($n = 4$). The asterisks indicate lipid classes that differed significantly ($p < 0.05$) in mol % in *Toxoplasma gondii* as compared to the host fibroblast.

PE (Figure 3) of *T. gondii* is quite similar to its host in molecular species composition, but as in PC there are more 28−30- and 32-carbon PE species in the parasite than in the host. Twenty-eight- and 30-carbon species make up about 1.6% of the parasite PE, but only 0.1% of the host PE. PE 30:0 from *T. gondii* was identified as 1−16:0,2−14:0 PE (Table 1).

Whereas PI makes up a similar fraction of the polar lipids of *T. gondii* and host fibroblasts (Figure 1), the molecular species of PI (Figure 4A) of *T. gondii* are less dominated by the PI 38:4 molecular species, which makes up 48% of host PI and 10% of parasite PI. PI 34:1 makes up a greater percentage of the *T. gondii* PI (50%) than of the host PI (2%). This species was determined by product ion analysis (Table 1) to be PI containing 16:0 and 18:1 fatty acyl species.

PS molecular species are shown in Figure 5. In general, *T. gondii* and host PS are similar, but host PS 36:1 species

BATCH: bi12b34 USER: pad29 DIV: @xyv04/data1/CLS_pj/GRP_bi/JOB_i49/DIV_bi7011993 DATE: October 25, 2007

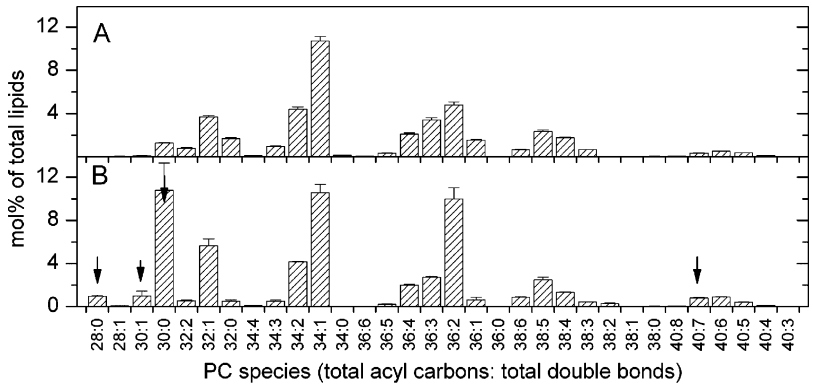


FIGURE 2: Diacyl phosphatidylcholine molecular species of host fibroblasts and *Toxoplasma gondii*. Species shown in A and B are indicated by the total number of acyl carbons: the total number of double bonds. Species are indicated as mol % of total lipids in classes shown in Figure 1. Error bars are standard deviation ($n = 4$). (A) Diacyl phosphatidylcholine molecular species of host fibroblasts. (B) Diacyl phosphatidylcholine molecular species of *Toxoplasma gondii*. Species marked by the arrows, chosen because they are higher in *Toxoplasma* than in the host fibroblasts, were subjected to product ion analysis (Table 1).

Table 1: Identification of Lipid Molecular Species in *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. Selected Lipid Molecular Species That Represented a Larger Fraction of *Toxoplasma gondii*'s Lipids than of Fibroblast Lipids Were Subjected to Product Ion Analysis in the Negative Ion Mode in Order To Identify the Individual Fatty Acyl Components[a]

identification in head group scan	acyl composition
PC 28:0	14:0−14:0 PC > 16:0−12:0 PC
PC 30:1	16:1−14:0 PC
PC 30:0	16:0−14:0 PC
PC 40:7	18:1−22:6 PC
PE 30:0	16:0−14:0 PE
PI 34:1	16:0/18:1 PI[b]

[a] The fatty acyl group presumed to be on the 1-position, because of lower signal abundance as compared to its paired acyl species, is listed first; this method is only suggestive with regard to acyl position (*21*). [b] Cannot determine acyl position. Intensities for 16:0 and 18:1 anions are similar.

is common, making up about 24% of the total PS. *T. gondii* has only about half the relative amount of PS found in the host and has a more equitable distribution of PS among its molecular species, with the highest species (PS 36:2) making up 15% of the PS species.

Sphingolipid Composition. Besides the PC species composition, the most notable difference between the polar lipid composition of *T. gondii* and that of its host fibroblasts is in the sphingolipids containing phosphate. Figure 6 shows a scan of the sphingosine-containing compounds (i.e., precursors of *m*/*z* 264 in positive ion mode) in host fibroblasts (Figure 6A) and *T. gondii* (Figure 6B). Both parasite and host contain Cer, Hex-cer, and Dihex-cer, each with a predominance of 16- and 24-carbon fatty-amide species. Indeed, the sphingolipid spectra were qualitatively quite similar except for signals for SM (e.g., SM 16:0 at *m*/*z* 703) which was higher in the host cells than in *T. gondii*, and the presence of a large peak at *m*/*z* 661 and a smaller one at *m*/*z* 689, which were present in the parasite, but undetectable or at the limit of detection in the host cells. The SM 16:0 peak and other SM peaks were also detectable in a positive ion scan for precursors of phosphocholine (Pre 184), and peaks at *m*/*z* 661 and *m*/*z* 689 were also present in the positive ion scan for the neutral loss of phosphoethanolamine (NL 141) (data not shown). Peaks at *m*/*z* 661 and *m*/*z* 689 were identified by product ion analysis as PE-cer 16:0 and PE-cer 18:0; product ion spectra in the positive ion mode are shown in Figure 6C and 6D. The structures of the SM 16:0, the predominant phosphosphingolipid of host fibroblasts, and PE-cer 16:0, the predominant phosphosphingolipid of *T. gondii*, are shown in Figure 7. Sphingomyelin and PE-cer are related lipids with an ethanolamine moiety in PE-cer in contrast to a choline moiety in SM.

PE-cer and SM molecular species were quantified (Figure 8A and 8B). Because an authentic compound for PE-cer is not available, PE was quantified in relation to diacyl PE internal standards. Our lack of knowledge of a "response factor" for PE-cer only allows us to estimate the PE-cer content at about 2% of the polar lipids. Because the same method was used to analyze PE-cer in *T. gondii* and in the host cells, we were able to ascertain that *T. gondii* has a much higher, on the order of 100-fold higher, concentration of PE-cer than its host.

Correction for Host Cell Membrane Contamination. In separate studies (data not shown), uninfected host cells were passed through a needle and a 3-μm filter in precisely the same manner as the infected cells. The lipidomic data obtained were subtracted from those obtained with the infected cells (i.e., those from the isolated parasites). Because the amount of filtered fibroblast lipids was less than 4% of that of the filtered *T. gondii* lipid species, employing this correction did not significantly change the lipid composition determined for the isolated parasites.

DISCUSSION

Defining the composition and abundance of *T. gondii* lipids provides not only information about the nature of plasma and organelle membranes but also insight into nutrient requirements for parasite metabolism and host parasite interactions (*5*, *23*). Collectively, this information might inform design of new antimicrobials. Herein, a broad-based analysis of composition and relative abundance of T. *gondii* RH strain intracellular tachyzoite polar lipids is reported. Overall the relative abundance of the lipid classes is in reasonable agreement with a previous study (*6*), but, in addition to information about the relative abundance of the various lipid classes, the current study provides information about lipid molecular species and, in particular, about diacyl, ether-linked (i.e., alk(en)yl/acyl) and ceramide-based polar lipids. In addition, this study identifies a class of sphingolip-

BATCH: bi12b34 USER: pad29 DIV: @xyv04/data1/CLS_pj/GRP_bi/JOB_i49/DIV_bi7011993 DATE: October 25, 2007

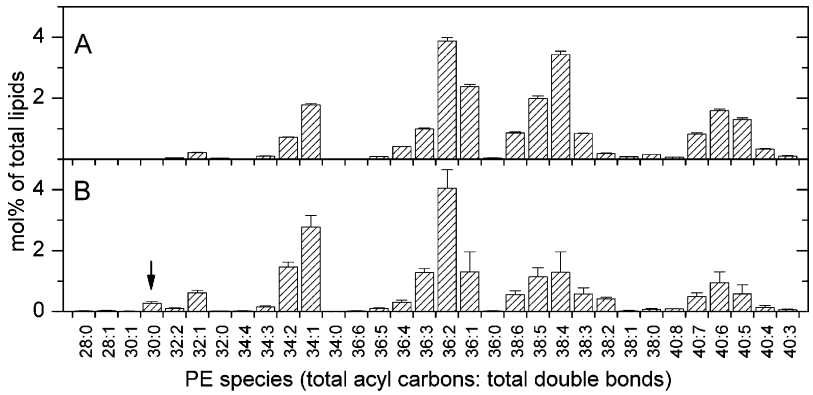


FIGURE 3: Diacyl phosphatidylethanolamine molecular species of host fibroblasts and *Toxoplasma gondii*. Species shown in A and B are indicated by the total number of acyl carbons: the total number of double bonds. Species are indicated as mol % of total lipids in classes shown in Figure 1. Error bars are standard deviation ($n = 4$). (A) Diacyl phosphatidylethanolamine molecular species of host fibroblasts. (B) Diacyl phosphatidylethanolamine molecular species of *Toxoplasma gondii*. The species marked by an arrow, chosen because it is higher in *Toxoplasma* than in the host fibroblasts, was subjected to product ion analysis (Table 1).

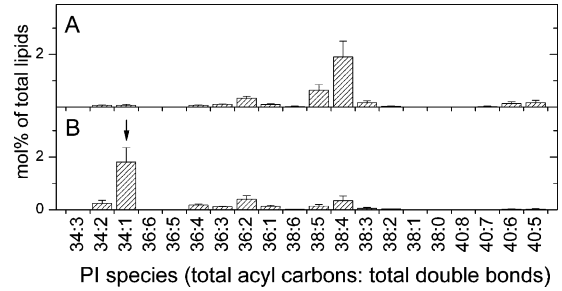


FIGURE 4: Diacyl phosphatidylinositol molecular species of host fibroblasts and *Toxoplasma gondii*. Species shown in A and B are indicated by the total number of acyl carbons: the total number of double bonds. Species are indicated as mol % of total lipids in classes shown in Figure 1. Error bars are standard deviation ($n = 4$). (A) Diacyl phosphatidylinositol molecular species of host fibroblasts. (B) Diacyl phosphatidylinositol molecular species of *Toxoplasma gondii*. The species marked by an arrow, chosen because it is higher in *Toxoplasma* than in the host fibroblasts, was subjected to product ion analysis (Table 1).

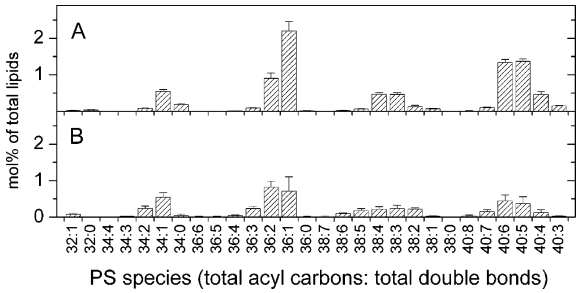


FIGURE 5: Diacyl phosphatidylserine molecular species of host fibroblasts and *Toxoplasma gondii*. Species are indicated by the total number of acyl carbons: the total number of double bonds. Species are indicated as mol % of total lipids in classes shown in Figure 1. Error bars are standard deviation ($n = 4$). (A) Diacyl phosphatidylserine molecular species of host fibroblasts. (B) Diacyl phosphatidylserine molecular species of *Toxoplasma gondii*.

ids, PE-cer, which is common in the parasite but is found at very low levels in host cells.

Phosphatidylcholines. Higher levels of PC were found in the parasite as compared with the host cells. Gupta et al. (*6*) noted the high PC levels in *T. gondii* and found that replacing PC with phosphatidyldimethylethanolamine drastically inhibited parasite growth. The difference in PC quantity between host and parasites is largely due to the presence of parasite PC species with relatively short acyl chains, i.e., containing only a combined 28 or 30 carbons in the two acyl species. The 28:0, 30:1, and 30:0 lipids are composed of 12-, 14-, and 16-carbon fatty acids. Shorter-chained PC species potentially could be derived by scavenging from the host or by either type I or type II fatty acid synthesis (FAS), since *T. gondii* is capable of acquiring lipids by all three routes (*24*−*26*). Shorter-chained fatty acids or shorter-chain PC species are more water-soluble than longer-chained species and so could be transferred from the host more easily than longer-chain molecular species. Recent studies on *Typanosoma brucei* indicate that this organism synthesizes 14-carbon fatty acid by an unexpected pathway, involving two of three modular elongases (*27*). The three elongases yield 10-, 14- and 18-carbon fatty acids sequentially. Trypanosomes regulate this pathway to produce varied length fatty acids under differing environmental conditions. It remains under speculation that *Toxoplasma* might also regulate the length of its fatty acyl chains under differing environmental conditions or in different stages of its life cycle.

In addition to the *T. gondii* PC species being shorter-chained than is typical for those of mammalian membranes, the PC species are also more saturated. PC 30:0, which was determined by product ion analysis to be 16:0/14:0 PC, makes up about 11% of *T. gondii* PC species but only about 1% of host PC species. While the relative intensity of the product ion spectral peaks suggests that 16:0 is in the predominant species in the 1-position of 16:0/14:0 PC, determination of position by peak intensity can provide ambiguous or incorrect positional assignments (*27*), and it is also possible that PC 30:0 may be a mixture of positional isomers. 1−16:0,2−14:0 PC has a gel-liquid crystalline phase transition temperature of 27.3 °C, and 1−14:0,2−16:0 has a transition temperature of 35.1 °C (*28*). It is speculated that this/these PC 30:0 species might contribute to the growth arrest caused by replacement of PC with phosphatidyldimethylethanolamine (*6*), since phosphatidyldimethylethanolamines have gel-to-liquid crystalline transition temperatures approximately 8 °C higher than PC species with the same acyl chains (*29*). Thus, if head group alteration occurred without significant changes in fatty acyl species in this group of lipids, phosphatidyldimethylethanolamine replacement for PC could potentially result in the formation of gel-phase lipid in the membranes of *T. gondii*. This might be related to the

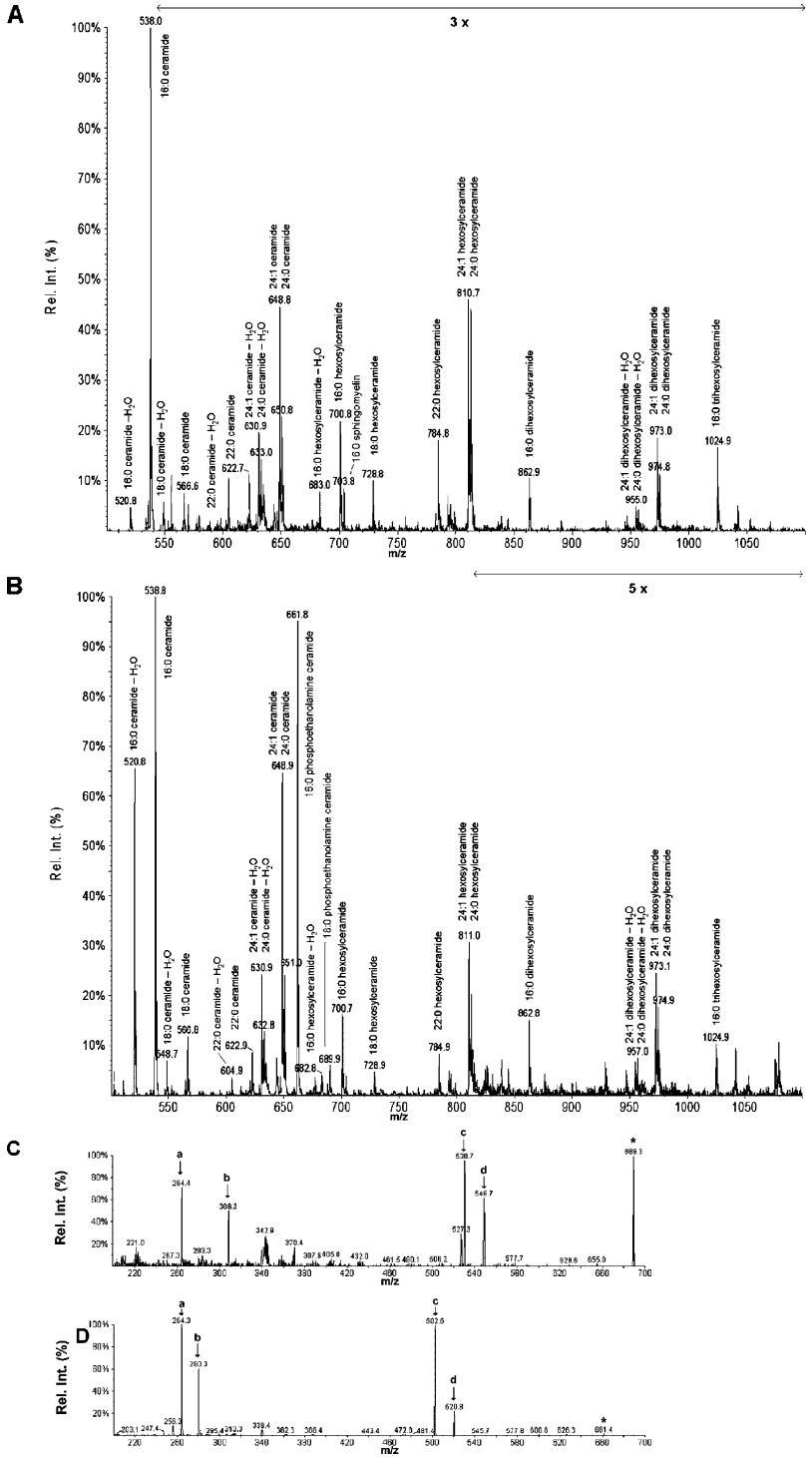


FIGURE 6: Sphingosine-containing molecular species of host fibroblasts and *Toxoplasma gondii as shown by ESI MS/MS in the positive mode*. (A and B) Precursors of *m*/*z* 264 (sphingosine) were identified as $[M + H]^+$ ions. Ceramides, hexosyl ceramides, di-hexosyl ceramides, and tri-hexosyl ceramides are identified in both host fibroblasts and *Toxoplasma gondii* as indicated with their amide-linked fatty acyl species. SM 16:0 is identified in host fibroblasts at *m*/*z* 703 but produced only a very small signal in *Toxoplasma*. It should be noted that SM produces *m*/*z* 264 only as a minor fragment, in contrast to other sphingolipids, which produce *m*/*z* 264 as a major fragment; thus, the signal for SM under-represents its amount in relation to the amounts of the other sphingolipids. (A) Sphingosine-containing molecular species of host fibroblasts. (B) Sphingosine-containing molecular species of *Toxoplasma gondii*. In the *Toxoplasma gondii* extract, PE-cer produced signals at *m*/*z* 689 for the 18:0 amide-linked species and at *m*/*z* 661 for the 16:0 amide-linked species. Product ion analysis of these species is shown in C and D. These species were absent from the precursors of *m*/*z* 264 scan of the host fibroblast extract (A). (C and D) Product ion analysis of the *Toxoplasma* phosphatidylethanolmine molecular species, "PE-cer 18:0" (*m*/*z* 689) (C) and "PE-cer 16:0" (*m*/*z* 661) (D). The species indicated by the arrow in B were subjected, as an $[M + H]^+$ ions (∗), to product ion analysis to confirm their identifications. Note that these product ion scans were performed on an unfractionated *Toxoplasma* extract, and so isobaric species, i.e., species with the same nominal mass as the molecular ion of interest may produce fragment ions in addition to those derived from the ion of interest. The *m*/*z* 264 ion, indicated as "a", is the characteristic ion for sphingosine (a dihydroxy 18-carbon sphingoid base). The ions indicated as "b", *m*/*z* 308 in A and *m*/*z* 280 in B, are characteristic of the fatty amide species, 18:0 and 16:0, respectively. Fragmentation of SM 16:0 produced the same *m*/*z* 280 ion, characteristic of the fatty amide (*22*). The ions labeled "c" and "d" are produced by a neutral loss of phosphoethanolamine (NL 141) ("d") and an additional water loss ("c").

BATCH: bi12b34 USER: pad29 DIV: @xyv04/data1/CLS_pj/GRP_bi/JOB_i49/DIV_bi7011993 DATE: October 25, 2007

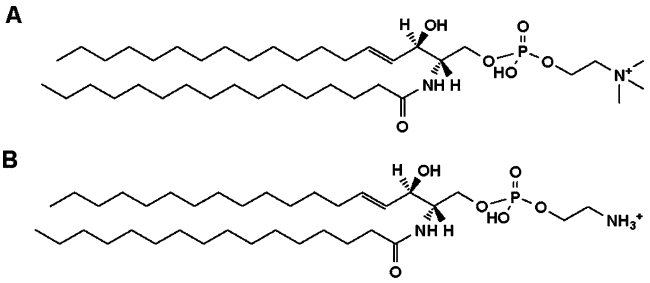


FIGURE 7: Structures of SM 16:0 and PE-cer 16:0 as $[M + H]^+$ ions. (A) SM 16:0, the predominant phosphosphingolipid of host fibroblasts. (B) PE-cer 16:0, the predominant phosphosphingolipid of *Toxoplasma gondii* tachyzoites.

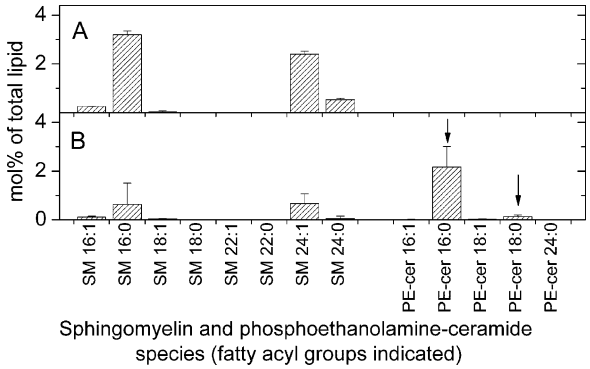


FIGURE 8: Quantification of sphingomyelin and phosphoethanolamine molecular species of host fibroblasts and *Toxoplasma gondii*. Species are indicated as mol % of total lipids in classes shown in Figure 1 and are indicated by the number of acyl carbons: the number of double bonds, assuming that the ceramide contains a dihydroxy18:1 base (sphingosine); this is demonstrated in Figure 6C and 6D for the species indicated. Error bars are standard deviation ($n = 5$). (A) Sphingomyelin and phosphoethanolamine molecular species of host fibroblasts. (B) Sphingomyelin and phosphoethanolamine molecular species of *Toxoplasma gondii*. The species marked by the arrows, chosen because they are higher in *Toxoplasma* than in the host fibroblasts, were subjected to product ion analysis.

observed intracellular accumulation of lipids and the negative effect of phosphatidyldimethylethanolamine on *T. gondii* multiplication (*6*). On the other hand, many organisms are able to alter fatty acid composition to compensate for altered phospholipid head group composition (e.g., (*30*)), but the partial dependence of *T. gondii* on host cell lipid biosynthesis may not permit the parasite to make compensatory changes in its lipid composition quickly.

Phosphosphingolipids. Gupta et al. (*6*) found that radiolabeled serine was incorporated into two unknown alkaline-stable materials and suggested that these unidentified materials might be sphingolipids. In the current work, a major phosphosphingolipid class was determined to be PE-cer. While the mol % of sphingomyelin in *T. gondii* is less than half that of the host fibroblasts, there is a large amount of PE-cer in *T. gondii* in comparison to host cells. PE-cer is generally found only in trace quantities in mammalian cells, but it has been previously detected in the rumen ciliate commensal *Entodinium caudatum* and oomycete plant pathogens (*31*, *32*). This might suggest that the production of PE-cer and the route to its biosynthesis is conserved or is an ancestral characteristic of the Chromoalveolates. PE-cer has also been reported in marine invertebrates (*33*), in insects (*34*, *35*), and in low amounts in mammalian cells (*36*, *37*). In the current studies the level of PE-cer in uninfected host fibroblasts was determined to be very low, about 0.01% of total polar lipids. Interestingly, the fatty amides associated with PE-cer included only 16- and 18-carbon species. Twenty four-carbon species, which are common (15−40%) in the other sphingolipid classes (Cer, Hex-cer, Dihex-cer, and SM), were not detectable in the PE-cer class.

PE-cer synthesis may occur through a transfer of a phosphoethanolamine group from PE to ceramide; this pathway was suggested to occur in rumen ciliate commensal *Entodinium caudatum* (*31*). This reaction might be catalyzed by a protozoan-encoded protein or could conceivably be due to an upregulation of the synthesis of PE-cer by the host as a result of the commensal interaction or parasite infection, as this lipid is known to occur at low levels in mammalian cells (*36*, *37*). Indeed, Apicomplexa genomes contain genes for putative sphingomyelin synthase (one candidate gene in *T. gondii*, i.e. 50.m03113 and two putative homologues in *P. falciparum*, i.e. the PFF1210w and PFF1215w contiguous genes), and we do not know if these enzymes might be capable of synthesizing ceramide phophoethanolamine as well or if a substantial amount of SM and ceramide phosphoethanolamine might be diverted from host cells.

Fouts and Boothroyd (*38*) and Kim et al. (*39*) recently analyzed the global transcriptomic responses of HFF cells after infection by *T. gondii*. A list of 46 "lipid biosynthesis" genes with expression induced or repressed by *T. gondii* infection was reported (*38*); of these, 10 are reported in the other study (*39*). Both analyses confirm a strong remodeling of host cell lipid metabolism upon infection.

In the study by Fouts and Boothroyd (*38*), a human gene encoding a phosphoserine aminotransferase 1 (AI015679) is shown to be repressed in tachyzoite infected HFF cells. Suppression of phosphoserine aminotransferase (if confirmed) would support the diversion of the phosphoserine metabolism toward serine production. Among different metabolic usages, serine can enter both glycerolipid and sphingolipid metabolism, since it is the substrate for both phosphatidylserine synthase (generating PS) and for serine palmitoyltransferase (entry point for the synthesis of sphinganine). In the study by Kim et al. (*39*), the phosphatidylserine synthase 1 (H28984) is consistently enhanced after infection by *T. gondii*.

In addition, Kim et al. (*39*) provide evidence for remodeling of host cell sphingolipid metabolism: in particular, expression of a sphingosine kinase (AI341901) is stimulated, supporting the synthesis of sphingosine 1-phosphate, which is the direct substrate for the sphinganine-1-phosphate aldolase that generates phosphoethanolamine. Three human genes encoding sphingomyelin synthases (transmembrane protein 23: AI261602, AA459293 and AA693488) are markedly repressed after infection. These proteins are bidirectional and capable of converting PC and ceramide to SM and diacylglycerol (DAG) and vice versa; direction is dependent on the relative concentrations of DAG and ceramide as phosphocholine acceptors. It is therefore difficult to deduce from the reduced expression of sphingomyelin synthase genes whether they are correlated to a decrease or an increase of HFF SM. It is also possible that some of these enzymes could be involved in ceramide phosphoethanolamine synthesis. If the enzyme involved in PE-cer synthesis belongs to the protozoan, its uncommon specificity for ceramides with 16C and 18C amides might suggest that the

BATCH: bi12b34 USER: pad29 DIV: @xyv04/data1/CLS_pj/GRP_bi/JOB_i49/DIV_bi7011993 DATE: October 25, 2007

enzyme has an unusual active site that might provide a parasite-specific target.

PE-cer and other ceramide derivatives have structural resemblance to lipopolysaccharide and represent alternative ligands for host toll receptors (*40*). If PE-cer does bind to toll receptors, PE-cer may be made by the parasite to modulate host cell function.

Hexosylceramides. Figure 6, a discovery scan for sphingolipids indicates that, besides the phosphosphingolipids, the major ceramide-containing species in the mass range between 500 and 1100 are ceramides, (mono)Hex-cers, and Dihex-cers. A peak at *m*/*z* 1024, consistent with trihexosyl ceramide 16:0, was also detected. The current data are consistent with the detection of mongalactosylceramide synthesis after metabolic labeling of *T. gondii* cells with radiolabled UDP-galactose (*41*). These data further confirm the synthesis of mono-, di-, and trihexosyl ceramides detected by Bisanz et al. (*13*) after acetate metabolic labeling.

Ceramide. The amount of free ceramide in *T. gondii* relative to the composition of the uninfected host cell is also of interest in that both ceramide and lipopolysaccharide bind to CD14 and CD36 which appear to coassociate with toll receptors 2 and 4 (*40*). These findings again are suggestive of a way in which the parasite lipids could modulate host cell functions.

Glycosyldiacylglycerols. The amounts of MHexDG and DHexDG in *T. gondii* tachyzoites are at or below the limit of detection. Maréchal et al. (*41*) could detect the synthesis of both MGDG and DGDG in *T. gondii* cells incubated with radiolabeled UDP-galactose and could detect a glycolipid reacting with an anti-DGDG antibody in *T. gondii* lipid extracts. Bisanz et al. (*13*) further detected a glycolipid comigrating with DGDG. Here, MHexDG and DHexDG with masses corresponding to diacyl galactolipids, similar to those found in plant chloroplasts, are, at most, very minor lipid species.

Significance of PE-cer and Distinctive PC Species. The work herein precisely characterizes lipid species in *T. gondii*, focusing initially on one clonal type and the tachyzoite life cycle stage. Bradyzoites have more lipid and more abundant lipid bodies than tachyzoites (*42*), and whether lipid species in tachyzoites and bradyzoites differ remains to be defined. It will also be of interest to compare lipid content in different isolates (clonal and atypical parasite types) and in *T. gondii* organelles (*43*). Mass spectrometry-based lipidomics is a robust methodology for comparing parasite and host cell lipid composition in detail. It identifies a novel sphingolipid, ceramide phosphoethanolamine, which is likely to play a role in the interaction between the parasite and the host. Ceramide phosphoethanolamine might also be an important component of *T. gondii* membrane rafts.

Occurrence of ceramide phosphoethanolamine suggests the existence of multiple, and possibly nonredundant, pathways for the synthesis of sphingolipids. SM can be generated either by conventional PC-ceramide phosphocholine transferases (one putative homologous gene in *T. gondii*, i.e. 50.m03113 and two putative homologous genes in *P. falciparum*, i.e. the PFF1210w and PFF1215w contiguous genes) or by a stepwise process involving PE-ceramide phosphoethanolamine transferases, generating ceramide phosphoethanolamine, and methyltransferases, generating SM. PE-ceramide phosphoethanolamine transferase activity might be harbored by PC-ceramide phosphocholine transferases with loose substrate specificity or by as yet unidentified enzymes. Subsequent methylation of the phosphoethanolamine polar head into phosphocholine might be catalyzed by a phosphoethanolamine methyltransferase (one gene characterized in *P. falciparum*, i.e. PfPMT or MAL13P1.214; no clear homologue in *T. gondii* genome). In *P. falciparum*, the PfPMT enzyme was shown to catalyze the *in vitro* conversion of phosphethanolamine into phosphocholine and is suspected to also catalyze the transmethylation of PE into PC *in vivo* (reviewed in ref *44*). Such an enzyme might therefore also catalyze the transmethylation of ceramide phosphoethanolamine into SM. PfPMT has attracted attention because it is inhibited by phosphocholine and synthetic analogues (miltefosine (*45*) and 1,12-bis-(*N*,*N*′-acetamidinyl)dodecane derivatives (*46*)), which represent some of the most promising future generations of antimalarial drugs. In *T. gondii*, the accumulation of ceramide phosphoethanolamine might be related to the apparent lack of a PfPMT homologue or a methyl transferase of different substrate affinity. In future studies, it would be of interest for comparisons of *T. gondii* and *P. falciparum* lipidomic profiles to focus on the ceramide phosphoethanolamine and SM contents, and on the enzymes that are involved in the transmethylations of phosphoethanolamine, ceramide phosphoethanolamine, and PE, in both *T. gondii* and *P. falciparum*.

The functional significance of the high-level of 12-, 14- and 16-carbon saturated *T. gondii* PCs and the effect of these lipids on the properties of the parasite's membranes remain to be determined. However, if their role is demonstrated to be essential, the enzymes involved in the synthesis of distinctive lipids may also provide unique molecular targets for chemotherapeutics (*7*, *47*, *48*).

ACKNOWLEDGMENT

We thank Levi Kinderknecht for technical assistance.

REFERENCES

1. Zuther, E., Johnson, J. J., Haselkorn, R., McLeod, R., and Gornicki, P. (1999) Growth of *Toxoplasma gondii* is inhibited by aryloxyphenoxypropionate herbicides targeting acetyl-CoA carboxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96*, 13387−13392.
2. McLeod, R., Muench, S. P., Rafferty, J. B., Kyle, D. E., Mui, E. J., Kirisits, M. J., Mack, D. G., Roberts, C. W., Samuel, B. U., Lyons, R. E., Dorris, M., Milhous, W. K., and Rice, D. W. (2001) Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of Apicomplexan Fab, *I. Int. J. Parasitol. 31*, 109−113.
3. Roberts, C. W., McLeod, R., Rice, D. W., Ginger, M., Chance, M. L., and Goad, L. J. (2003) Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatic parasitic protozoa, *Mol. Biochem. Parasitol. 126*, 129−142.
4. Samuel, B. J., Hearn, B., Mack, D. G., Wender, P., Rothbard, J., Kirisits, M., Mui, E., Roberts, C., Prigge, S., Rice, D., Muench, S. P., Law, A., and McLeod, R. (2003) Delivery of antimicrobials into parasites, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100*, 14281−14286.
5. Mazumdar, J. H., Wilson, E., Masek, K. A., Hunter, C., and Striepen, B. (2006) Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103*, 13192−13197.
6. Gupta, N., Zahn, M. M., Coppens, I., Joiner, K. A., and Voelker, D. R. (2005) Selective disruption of PC metabolism of the intracellular parasite, *Toxoplasma gondii* arrests its growth, *J. Biol. Chem. 280*, 16345−16353.
7. Sonda, S., Ting, L. M., Novak, S., Kim, K., Maher, J. J., Farese, R. V., Jr., and Ernst, J. D. (2001) Cholesterol esterification by host and parasite is essential for optimal proliferation of *Toxoplasma gondii*, *J. Biol. Chem. 275*, 34434−34440.

BATCH: bi12b34 USER: pad29 DIV: @xyv04/data1/CLS_pj/GRP_bi/JOB_i49/DIV_bi7011993 DATE: October 25, 2007

8. Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G. K., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S., and McFadden, G. I. (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95*, 12352−12357.
9. Waller, R. F., and McFadden, G. I. (2005) The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites, *Curr. Issues Mol. Biol. 7*, 57−79.
10. Gleeson, M. T. (2000) The plastid in Apicomplexa: what use is it? *Int. J. Parasitol. 30*, 1053−1070.
11. Maréchal, E., and Cesbron-Delauw, M. F. (2001) The apicoplast: a new member of the plastid family, *Trends Plant Sci. 6*, 200−205.
12. Zhu, G. (2004) Current progress in the fatty acid metabolism in *Cryptosporidium parvum*, *J. Eukaryotic Microbiol. 51*, 381−388.
13. Bisanz, C., Bastien, O., Grando, D., Jouhet, J., Maréchal, E., and Cesbron-Delauw, M. F. (2006) *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors, *Biochem. J. 394*, 197−205.
14. Charron, A. J., and Sibley, L. D. (2002) Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*, *J. Cell Sci. 115*, 3049−3059.
15. Mui, E. J., Jacobus, D., Milhous, W. K., Schiehser, G., Hsu, H., Roberts, C. W., Kirisits, M. J., and McLeod, R. (2005) Triazines inhibit *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro* and *in vivo*, *Antimicrob. Agents Chemother. 49*, 3463−3467.
16. Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H.-E., Rajashekar, C. B., Williams, T. D., and Wang, X. (2002) Profiling of membrane lipids in plant stress responses, *J. Biol. Chem. 277*, 31994−32002.
17. Wanjie, S. W., Welti, R., Moreau, R. A., and Chapman, K. D. (2005) Identification and quantification of glycerolipids in cotton fibers: Reconciliation with metabolic pathway predictions from DNA databases, *Lipids 40*, 773−785.
18. Brügger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F. T., and Lehmann, W. D. (1997) Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94*, 2339−2344.
19. Welti, R., Shah, J., LeVine, S., Esch, S. W., Williams, T. D., and Wang, X. (2005) High throughput lipid profiling to identify and characterize genes involved in lipid metabolism, signaling, and stress response, in *Functional Lipidomics* (Feng, L., and Prestwich, G. D., Eds.) pp 307−322, Marcel Dekker, New York.
20. Liebisch, G., Lieser, B., Rathenberg, J., Drobnik, W., and Schmitz, G. (2004) High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm, *Biochim. Biophys. Acta 1686*, 108−117. Erratum: (2005), *Biochim. Biophys. Acta 1734*, 86−89.
21. Murphy, R. C. (1993) Mass Spectrometry of Lipids, in *Handbook of Lipid Research* (Snyder, F., Ed.) Vol. 7, pp 223−226, Plenum Press, New York.
22. Hsu, F.-F., and Turk, J. (2000) Structural determination of sphingomyelin by tandem mass spectrometry with electrospray ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11*, 437−449.
23. Botté, C., Saïdani, N., Mondragon, R., Gonzales, S., Isaac, G., Mui, E., McLeod, R., Dubremetz, J.-F., Vial, H., Welti, R., Cesbron-Delauw, M.-F., Mercier, C., and Maréchal, E. (2007) Subcellular localization and dynamics of a digalactolipid-like lipid along the life cycle of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Submitted.
24. Coppens, I., Sinai, A. P., and Joiner, K. A. (2000) *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition, *J. Cell Biol. 149*, 167−180.
25. Coppens, I., and Vielemeyer, O. (2005) Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities, *Int. J. Parasitol. 35*, 597−615.
26. Coppens, I. (2006) Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis, *Cell Microbiol. 8*, 1−9.
27. Lee, S. H., Stephens, J. L., Paul, K. S., and Englund, P. T. (2006) Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes, *Cell 126*, 691−699.
28. Chen, S. C., and Sturtevant, J. M. (1981) Thermotropic behavior of bilayers formed from mixed-chain PCs, *Biochemistry 20*, 713−718.
29. Mulukutia, S., and Shipley, G. G. (1984) Structure and thermotropic properties of phosphatidylethanolamine and its N-methyl derivatives, *Biochemistry 23*, 2514−2519.
30. Schroeder, F., Holland, J. F., and Vagelos, P. R. (1976) Physical properties of membranes isolated from tissue culture cells with altered phospholipids composition, *J. Biol. Chem. 251*, 6747−6756.
31. Broad, T. E., and Dawson, R. M. C. (1973) Formation of ceramide phosphorylethanolamine from phosphatidylethanolamine in the rumen protozoan *Entodinium caudatum*, *Biochem. J. 134*, 659−662.
32. Moreau, R. A., Young, D. H., Danis, P. O., Powell, M. J., Quinn, C. J., Beshah, K., Slawecki, R. A., and Dilliplane, R. L. (1998) Identification of ceramide-phosphorylethanolamine in oomycete plant pathogens: *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, and *Phytophthora capsici*, *Lipids 33*, 307−317.
33. Hori, T., Sugita, M., and Arakawa, I. (1968) Structural elucidation of sphingoethanolamine and its distribution in aquatic animals, *Biochim. Biophys. Acta 152*, 211−213.
34. Hildenbradt, G. R., Abraham, T., and Bieber, L. L. (1971) Metabolism of ceramide phosphorylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylserine and phosphatidylglycerol by housefly larvae, *Lipids 6*, 508−516.
35. Dawson, R. M., and Kemp, P. (1968) Isolation of ceramide phosphorylethanolamine from the blowfly *Calliphora erythrocephala*, *Biochem. J. 106*, 319−320.
36. Muehlenberg, B. A., Sribney, M., and Duffe, M. K. (1972) Occurrence and biosynthesis of ceramide phosphorylethanolamine in chicken and rat liver, *Can. J. Biochem. 50*, 166−173.
37. Maurice, A., and Malgat, M. (1990) Evidence for the biosynthesis of ceramide-phosphoethanolamine in brain synaptic plasma membrane vesicles and in sciatic nerve microsomes from normal and Trembler mice, *Neurosci. Lett. 118*, 177−180.
38. Fouts, A. E., and Boothroyd, J. C. (2007) Infection with *Toxoplasma gondii* bradyzoites has a diminished impact on host transcript levels relative to tachyzoite infection, *Infect. Immun. 75*, 634−642.
39. Kim, S. K., Fouts, A. E., and Boothroyd, J. C. (2007) *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling, *J. Immunol. 178*, 5154−5165.
40. Fischer, H., Ellstrom, P., Ekstrom, K., Gustafsson, L., Gustafsson, M., and Svanborg, C. (2007) Ceramide as a TLR4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and TLR4, *Cell. Microbiol. 9*, 1239−1251.
41. Maréchal, E., Azzouz, N., de Macedo, C. S., Block, M. A., Feagin, J. E., Schwarz, R. T., and Joyard, J. (2002) Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites, *Eukaryot. Cell 1*, 653−656.
42. Dubey, J. P., Lindsay, D. S., and Speer, C. A. (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts, *Clin. Microbiol. Rev. 11*, 267−299.
43. Foussard, F., Leriche, M. A., and Dubremetz, J. F. (1991) Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries, *Parasitology 102*, 367−370.
44. Vial, H., and Ben Mamoun, C. (2005) Plasmodium lipids: metabolism and function, in *Molecular Approaches to Malaria* (Sherman, I. W., Ed.), pp 327−352, ASM Press, Washington, D.C.
45. Pessi, G., Kociubinski, G., and Ben Mamoun, C. (2004) A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101*, 6206−6211.
46. Ouattara, M., Wein, S., Calas, M., Hoang, Y. V., Vial, H., and Escale, R. (2007) Synthesis and antimalarial activity of new 1,-12-bis(N,N′-acetamidinyl)dodecane derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett. 17*, 593−596.
47. Ferguson, D. J. P., Henriquez, F. L., Kirisits, M. J., Muench, S. P., Prigge, S. T., Rice, D. W., Roberts, C. W., and McLeod, R. L. (2005) Maternal inheritance and stage specific variation of the apicoplast in *Toxoplasma gondii* during development in the intermediate and definitive host, *Eukaryotic Cell 4*, 814−826.
48. Muench, S., Prigge, S., Kirisits, M. J., McLeod, R., Rafferty, J. B., Kirisitis, M. J., Roberts, C. W., Mui, E. J., and Rice, D. (2007) Studies of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* enoyl acyl carrier protein reductase and implications for the development of antiparasitic agents, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr. 63*, 328−338.

BI7011993

Références

Ressources internet :

[CAZY], Carbohydrate Active Enzymes database : http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY

[KEGG], Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes : http://www.genome.jp/kegg

[Lipid Maps], Lipid Metabolites And Pathways Strategy : http://www.lipidmaps.org

[Malaria Parasite Metabolic Pathways]: http://sites.huji.ac.il/malaria

[MetaCyc], Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases : http://metacyc.org

[Plant Lipid Metabolic Pathways], The Arabidopsis Lipid Gene Database : http://www.plantbiology.msu.edu/lipids/genesurvey/index.htm

[The Lipid Library] : http://www.lipidlibrary.co.uk/index.html

[ToxoDB], Toxoplasma gondii genome resource : http://www.toxodb.org/toxo/home.jsp

Références bibliographiques :

A

Abbal M, Tkaczuk J, Praud C, Msayeh F, Ohayon E (1991) Computer-assisted kinetic assay for quantification of total complement activity. Complement Inflamm 8: 92-103

Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley PJ, Boothroyd JC (2005) Identification of the moving junction complex of Toxoplasma gondii: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathogen 1 e17

Allende D, Vidal A, McIntosh TJ (2004) Jumping to rafts: gatekeeper role of bilayer elasticity. Trends Biochem Sci 29: 325-330

Andersson MX, Larsson KE, Tjellstrom H, Liljenberg C, Sandelius AS (2005) Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. J Biol Chem 280: 27578-27586

Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C, Sandelius AS (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. FEBS Lett 537: 128-132

Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N (1998) The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. Trends Microbiol 6: 392-401

Archibald JM, Keeling PJ (2002) Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution. Trends Genet 18: 577-584

Awai K, Kakimoto T, Awai C, Kaneko T, Nakamura Y, Takamiya K, Wada H, Ohta H (2006) Comparative genomic analysis revealed a gene for monoglucosyldiacylglycerol synthase, an enzyme for photosynthetic membrane lipid synthesis in cyanobacteria. Plant Physiol 141: 1120-1127

Awai K, Marechal E, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Joyard J (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 10960-10965

Azzouz N, Rauscher B, Gerold P, Cesbron-Delauw MF, Dubremetz JF, Schwarz RT (2002) Evidence for de novo sphingolipid biosynthesis in Toxoplasma gondii. Int J Parasitol 32: 677-684

Azzouz N, Shams-Eldin H, Niehus S, Debierre-Grockiego F, Bieker U, Schmidt J, Mercier C, Delauw MF, Dubremetz JF, Smith TK, Schwarz RT (2006) Toxoplasma gondii grown in human cells uses GalNAc-containing glycosylphosphatidylinositol precursors to anchor surface antigens while the immunogenic Glc-GalNAc-containing precursors remain free at the parasite cell surface. Int J Biochem Cell Biol 38(11) : 1914-1925

B

Baldock C, Rafferty JB, Sedelnikova SE, Baker PJ, Stuitje AR, Slabas AR, Hawkes TR, Rice DW (1996) A mechanism of drug action revealed by structural studies of enoyl reductase. Science 274: 2107-2110

Bargmann BO, Munnik T (2006) The role of phospholipase D in plant stress responses. Curr Opin Plant Biol 9: 515-522

Ben-Shem A, Frolow F, Nelson N (2003) Crystal structure of plant photosystem I. Nature 426: 630-635

Benning C (2007) Questions remaining in sulfolipid biosynthesis: a historical perspective. Photosynth Res 92: 199-203

Benning C, Ohta H (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. J Biol Chem 280: 2397-2400

Benson AA, Wiser R, Ferrari RA, Miller JA (1958) Photosynthesis of galactolipids. Journal of American Chemistry Society 80: 4740

Berg S, Edman M, Li L, Wikstrom M, Wieslander A (2001) Sequence properties of the 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from Acholeplasma laidlawii membranes. Recognition of a large group of lipid glycosyltransferases in eubacteria and archaea. J Biol Chem 276: 22056-22063

Bisanz C, Bastien O, Grando D, Jouhet J, Marechal E, Cesbron-Delauw MF (2006) Toxoplasma gondii acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. Biochem J 394: 197-205

Bishop JR, Crawford BE, Esko JD (2005) Cell surface heparan sulfate promotes replication of Toxoplasma gondii. Infect Immun 73: 5395-5401

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37: 911-917

Blott EJ, Griffiths GM (2002) Secretory lysosomes. Nat Rev Mol Cell Biol 3: 122-131

Blumenschein TM, Friedrich N, Childs RA, Saouros S, Carpenter EP, Campanero-Rhodes MA, Simpson P, Chai W, Koutroukides T, Blackman MJ, Feizi T, Soldati-Favre D, Matthews S (2007) Atomic resolution insight into host cell recognition by Toxoplasma gondii. Embo J 26: 2808-2820

Bogdanov et Dowhan W (1999) Lipid-assisted protein folding. J. Biol. Chem. 274

Bogdanov M, Dowhan W (1999) Lipid-assisted protein folding. J Biol Chem 274: 36827-36830

Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Coller S, Coombs GH, Dunn JD, Ferguson DJ, Sanderson SJ, Wastling JM, Boothroyd JC (2005) Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in Toxoplasma gondii. J Biol Chem 280: 34245-34258

Brash AR (2001) Arachidonic acid as a bioactive molecule. J Clin Invest 107: 1339-1345

Breiteneder H, Mills C (2005) Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. Curr Opin Allergy Clin Immunol 5: 275-279

Bruce BD (1998) The role of lipids in plastid protein transport. Plant Mol Biol 38: 223-246

Buckland AG, Wilton DC (2000) Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. Biochim Biophys Acta 1483: 199-216

Buxton D, Innes EA (1995) A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. Parasitology 110 supplement: S11-S16

C

Carrasco S, Merida I (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. Trends Biochem Sci 32: 27-36

Carruthers V, Boothroyd JC (2007) Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. Curr Opin Microbiol 10: 83-89

Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD (1999) Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. Cell Microbiol 1: 225-235

Carruthers VB, Hakansson S, Giddings OK, Sibley LD (2000) Toxoplasma gondii uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. Infect Immun 68: 4005-4011

Carruthers VB, Sibley LD (1997) Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. Eur J Cell Biol 73: 114-123

Carruthers VB, Sibley LD (1999) Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in Toxoplasma gondii. Mol Microbiol 31: 421-428

Carter HE, McCluer RH, Silfer ED (1956) Lipids of wheat flour. I. Characterization of galactosylglycerol components. J Am Chem Soc 78

Caspi R, Foerster H, Fulcher CA, Kaipa P, Krummenacker M, Latendresse M, Paley S, Rhee SY, Zhang P, Karp PD (2007) The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. Nucleic Acids Res: 1-9

Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. Biol Rev Camb Philos Soc 73: 203-266

Cavalier-Smith T (2003) Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358: 109-133; discussion 133-104

Cavalier-Smith T (2004) Only six kingdoms of life. Proc Biol Sci 271: 1251-1262

Chandrakala B, Shandil RK, Mehra U, Ravishankar S, Kaur P, Usha V, Joe B, deSousa SM (2004) High-throughput screen for inhibitors of transglycosylase and/or transpeptidase activities of Escherichia coli penicillin binding protein 1b. Antimicrob Agents Chemother 48: 30-40

Chang G, Roth CB (2001) Structure of MsbA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. Science 293: 1793-1800

Charif H, Darcy F, Torpier G, Cesbron-Delauw MF, Capron A (1990) Toxoplasma gondii: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. Exp Parasitol 71: 114-124

Charron AJ, Sibley LD (2002) Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite Toxoplasma gondii. J Cell Sci 115: 3049-3059

Charron AJ, Sibley LD (2004) Molecular partitioning during host cell penetration by Toxoplasma gondii. Traffic 5: 855-867

Chaturvedi S, Qi H, Coleman D, Rodriguez A, Hanson PI, Striepen B, Roos DS, Joiner KA (1999) Constitutive calcium-independent release of Toxoplasma gondii dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. J Biol Chem 274: 2424-2431

Christie WW (2003) Lipid Analysis, Ed 3rd edition

Coppens I (2006) Contribution of host lipids to Toxoplasma pathogenesis. Cell Microbiol 8: 1-9

Coppens I (2007) Lipid synthesis and uptake. In D Soldati-Favre, JW Ajioka, eds, TOXOPLASMA Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press, Nortfolk, UK, pp 349-364

Coppens I, Andries M, Liu JL, Cesbron-Delauw MF (1999) Intracellular trafficking of dense granule proteins in Toxoplasma gondii and experimental evidences for a regulated exocytosis. Eur J Cell Biol 78: 463-472

Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, Joiner KA (2006) Toxoplasma gondii sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. Cell 125: 261-274

Coppens I, Joiner KA (2003) Host but not parasite cholesterol controls Toxoplasma cell entry by modulating organelle discharge. Mol Biol Cell 14: 3804-3820

Coppens I, Sinai AP, Joiner KA (2000) Toxoplasma gondii exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. J Cell Biol 149: 167-180

Coppens I, Vielemeyer O (2005) Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. Int J Parasitol 35: 597-615

Couper KN, Roberts CW, Brombacher F, Alexander J, Johnson LL (2005) Toxoplasma gondii-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. Infect Immun 73: 8060-8068

Coutinho P, Henrissat B (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated detabse approach. THe Royal Society of Chemistry, Cambridge

Cronan JE (2003) Bacterial membrane lipids: where do we stand? Annu Rev Microbiol 57: 203-224

Dantas-Leite L, Urbina JA, de Souza W, Vommaro RC (2004) Selective anti-Toxoplasma gondii activities of azasterols. Int J Antimicrob Agents 23: 620-626

D

Darcy F, Maes P, Gras-Masse H, Auriault C, Bossus M, Deslee D, Godard I, Cesbron MF, Tartar A, Capron A (1992) Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from Toxoplasma gondii P30 antigen. J Immunol 149: 3636-3641

de Kroon AI (2007) Metabolism of phosphatidylcholine and its implications for lipid acyl chain composition in Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta 1771: 343-352

de Melo EJ, de Souza W (1996) Pathway of C6-NBD-Ceramide on the host cell infected with Toxoplasma gondii. Cell Struct Funct 21: 47-52

Defilippi P, Olivo C, Venturino M, Dolce L, Silengo L, Tarone G (1999) Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. Microsc Res Tech 47: 67-78

Delbac F, Sanger A, Neuhaus EM, Stratmann R, Ajioka JW, Toursel C, Herm-Gotz A, Tomavo S, Soldati T, Soldati D (2001) Toxoplasma gondii myosins B/C: one gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. J Cell Biol 155: 613-623

Dembitsky VM, Rezanka T, Srebnik M (2003) Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae. Chem Phys Lipids 123: 117-155

Denzer, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ (2000) Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. J Cell Sci 19: 3365-3374

DeRocher A, Gilbert B, Feagin JE, Parsons M (2005) Dissection of brefeldin A-sensitive and -insensitive steps in apicoplast protein targeting. J Cell Sci 118: 565-574

DeRocher A, Hagen CB, Froehlich JE, Feagin JE, Parsons M (2000) Analysis of targeting sequences demonstrates that trafficking to the Toxoplasma gondii plastid branches off the secretory system. J Cell Sci 113 (Pt 22): 3969-3977

Derouin F, Chastang C (1988) Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on Toxoplasma gondii in tissue culture. Antimicrob Agents Chemother 32: 303-307

Desmonts G, Remington JS (1980) Direct agglutination test for diagnosis of Toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity. J Clin Microbiol 11: 562-568

Dickson RC, Lester RL (1999) Yeast sphingolipids. Biochim Biophys Acta 1426: 347-357

Doerrler WT, Reedy MC, Raetz CR (2001) An Escherichia coli mutant defective in lipid export. J Biol Chem 276: 11461-11464

Dormann P, Balbo I, Benning C (1999) Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. Science 284: 2181-2184

Dormann P, Benning C (2002) Galactolipids rule in seed plants. Trends Plant Sci 7: 112-118

Dormann P, Hoffmann-Benning S, Balbo I, Benning C (1995) Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. Plant Cell 7: 1801-1810

Douce R, Joyard J (1990) Biochemistry and function of the plastid envelope. Annu Rev Cell Biol 6: 173-216

Dowhan W, Bogdanov M (2002) Functional roles of lipids in membranes. In Biochemistry of LIpids, Lipoproteins and Membranes, Ed 4th edition, pp 1-35

Dowse T, Soldati D (2004) Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. Curr Opin Microbiol 7: 388-396

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA (1998) Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 11: 267-299

Dubremetz JF (2007) Rhoptries are major players in Toxoplasma gondii invasion and host cell interaction. Cell Microbiol 9: 841-848

E

Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F (2004) Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. Cell Mol Life Sci 61: 1401-1426

El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF (2007) ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of Toxoplasma gondii. PLoS Pathogen 3 e14

Ellis KE, Clough B, Saldanha JW, Wilson RJ (2001) Nifs and Sufs in malaria. Mol Microbiol 41: 973-981

Eyster KM (2007) The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. Advances in Physiologiy Education 31: 5-16

F

Fadul CE, Channon JY, Kasper LH (1995) Survival of immunoglobulin G-opsonized Toxoplasma gondii in nonadherent human monocytes. Infect Immun 63: 4290-4294

Fantini J, Garmy N, Mahfoud R, Yahi N (2002) Lipid raft: structure, function and role in hiv, alzheimers and prion diseases. Expert Reviews in Molecular Medicine: 1-22

Fichera ME, Roos DS (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. Nature 390: 407-409

Findling RL, Aman MG, Eerdekens M, Derivan A, Lyons B (2004) Long-term, open-label study of risperidone in children with severe disruptive behaviors and below-average IQ. Am J Psychiatry 161: 677-684

Finlay BB, Cossart P (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. Science 276: 718-725

Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D (2006) New insights into myosin evolution and classification. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 3681-3686

Foth BJ, Ralph SA, Tonkin CJ, Struck NS, Fraunholz M, Roos DS, Cowman AF, McFadden GI (2003) Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite Plasmodium falciparum. Science 299: 705-708

Foussard F, Leriche MA, Dubremetz JF (1991) Characterization of the lipid content of Toxoplasma gondii rhoptries. Parasitology 102 Pt 3: 367-370

Frentzen M, Neuburger M, Joyard J, Douce R (1990) Intraorganelle localization and substrate specificities of the mitochondrial acyl-CoA: sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase and acyl-CoA: 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate O-acyltransferase from potato tubers and pea leaves. Eur J Biochem 187: 395-402

Froehlich JE, Benning C, Dormann P (2001) The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. J Biol Chem 276: 31806-31812

Fujino Y, Miyazawa T (1979) Chemical structures of mono-, di-, tri-, and tetraglycosyl glycerides in rice bran. Biochim Biophys Acta 572: 442-451

G

Gad M, Awai K, Shimojima M, Yamaryo Y, Shimada H, Masuda T, Takamiya K, Ikai A, Ohta H (2001) Accumulation of plant galactolipid affects cell morphology of Escherichia coli. Biochem Biophys Res Commun 286: 114-118

Gaither TA, Alling DW, Frank MM (1974) A new one-step method for the functional assay of the fourth component (C4) of human and guinea pig complement. J Immunol 113: 574-583

Gallois Y, Foussard F, Girault A, Hodbert J, Tricaud A, Mauras G, Motta C (1988) Membrane fluidity of Toxoplasma gondii: a fluorescence polarization study. Biol Cell 62: 11-15

Gilbert LA, Ravindran S, Turetzky JM, Boothroyd JC, Bradley PJ (2007) Toxoplasma gondii targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. Eukaryot Cell 6: 73-83

Gilk SD, Raviv Y, Hu K, Murray JM, Beckers CJ, Ward GE (2006) Identification of PhIL1, a novel cytoskeletal protein of the Toxoplasma gondii pellicle, through photosensitized labeling with 5-[125I]iodonaphthalene-1-azide. Eukaryot Cell 5: 1622-1634

Gomez-Munoz A (1998) Modulation of cell signalling by ceramides. Biochim Biophys Acta 1391: 92-109

Goni FM, Alonso A (1999) Structure and functional properties of diacylglycerols in membranes. Prog Lipid Res 38: 1-48

Gounaris K, Barber J (1983) Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipids in nature. Trends Biochem Sci: 378-381

Graille M, Stura EA, Bossus M, Muller BH, Letourneur O, Battail-Poirot N, Sibai G, Gauthier M, Rolland D, Le Du MH, Ducancel F (2005) Crystal structure of the complex between the monomeric form of Toxoplasma gondii surface antigen 1 (SAG1) and a monoclonal antibody that mimics the human immune response. J Mol Biol 354: 447-458

Gray MW (1993) Origin and evolution of organelle genomes. Curr Opin Genet Dev 3: 884-890

Gray MW, Lang BF, Burger G (2004) Mitochondria of protists. Annu Rev Genet 38: 477-524

Gubbels MJ, Vaishnava S, Boot N, Dubremetz JF, Striepen B (2006) A MORN-repeat protein is a dynamic component of the Toxoplasma gondii cell division apparatus. J Cell Sci 119: 2236-2245

Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB (1994) The Lipid Handcook, Ed 2nd edition

Guo J, Zhang Z, Bi Y, Yang W, Xu Y, Zhang L (2005) Decreased stability of photosystem I in dgd1 mutant of Arabidopsis thaliana. FEBS Lett 579: 3619-3624

Gupta N, Zahn MM, Coppens I, Joiner KA, Voelker DR (2005) Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite Toxoplasma gondii arrests its growth. J Biol Chem 280: 16345-16353

Gurr MI, Harwood JL, Frayn K (2002) Lipid Biochemstry, Ed 5th edition

H

Hager KM, Striepen B, Tilney LG, Roos DS (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): 2631-2638

Haines TH, Dencher NA (2002) Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. FEBS Lett 528: 35-39

Hakansson S, Charron AJ, Sibley LD (2001) Toxoplasma evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. Embo J 20: 3132-3144

Hakansson S, Morisaki H, Heuser J, Sibley LD (1999) Time-lapse video microscopy of gliding motility in Toxoplasma gondii reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. Mol Biol Cell 10: 3539-3547

Harb OS, Chatterjee B, Fraunholz MJ, Crawford MJ, Nishi M, Roos DS (2004) Multiple functionally redundant signals mediate targeting to the apicoplast in the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. Eukaryot Cell 3: 663-674

Hartel H, Benning C (2000) Can digalactosyldiacylglycerol substitute for phosphatidylcholine upon phosphate deprivation in leaves and roots of Arabidopsis? Biochem Soc Trans 28: 729-732

Harwood JL (1987) Lung surfactant. Prog Lipid Res 26: 211-256

He CY, Shaw MK, Pletcher CH, Striepen B, Tilney LG, Roos DS (2001) A plastid segregation defect in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. Embo J 20: 330-339

Heacock AM, Agranoff BW (1997) CDP-diacylglycerol synthase from mammalian tissues. Biochim Biophys Acta 1348: 166-172

Heath RJ, White SW, Rock CO (2001) Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. Prog Lipid Res 40: 467-497

Heemskerk JW, Storz T, Schmidt RR, Heinz E (1990) Biosynthesis of Digalactosyldiacylglycerol in Plastids from 16:3 and 18:3 Plants. Plant Physiol 93: 1286-1294

Heinz E, Harwood JL (1977) Incorporation of carbon dioxide, acetate and sulphate into the glycerolipids of Vicia faba leaves. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 358: 897-908

Helenius J, Ng DT, Marolda CL, Walter P, Valvano MA, Aebi M (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. Nature 415: 447-450

Hendrickson L, Vlckova A, Selstam E, Huner N, Oquist G, Hurry V (2006) Cold acclimation of the Arabidopsis dgd1 mutant results in recovery from photosystem I-limited photosynthesis. FEBS Lett 580: 4959-4968

Hill D, Dubey JP (2002) Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect 8: 634-640

Hirabayashi Y, Hamaoka A, Matsumoto M, Nishimura K (1986) An improved method for the separation of molecular species of cerebrosides. Lipids 21: 710-714

Holthuis JC, Levine TP (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 209-220

Holzl G, Dormann P (2007) Structure and function of glycoglycerolipids in plants and bacteria. Prog Lipid Res 46: 225-243

Holzl G, Witt S, Kelly AA, Zahringer U, Warnecke D, Dormann P, Heinz E (2006) Functional differences between galactolipids and glucolipids revealed in photosynthesis of higher plants. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 7512-7517

Howe DK, Sibley LD (1995) Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis 172: 1561-1566

Howe DK, Summers BC, Sibley LD (1996) Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in Toxoplasma gondii. Infect Immun 64: 5193-5198

Hu K, Johnson J, Florens L, Fraunholz M, Suravajjala S, DiLullo C, Yates J, Roos DS, Murray JM (2006) Cytoskeletal components of an invasion machine --the apical complex of Toxoplasma gondii. PLoS Pathogen 2 e13

I

Ikonen E (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. Curr Opin Cell Biol 13: 470-477

Ishizuka I (1997) Chemistry and functional distribution of sulfoglycolipids. Prog Lipid Res 36: 245-319

Ivanov AG, Hendrickson L, Krol M, Selstam E, Oquist G, Hurry V, Huner NP (2006) Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in Arabidopsis thaliana due to photosystem I acceptor-side limitations. Plant Cell Physiol 47: 1146-1157

J

Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A (2006) Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. Prog Lipid Res 45: 237-249

Janeway CAJ, Travers P, Walport M, Shlochik MJ (2001) Immunobiology,

Jarvis P, Dormann P, Peto CA, Lutes J, Benning C, Chory J (2000) Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 8175-8179

Jelenska J, Sirikhachornkit A, Haselkorn R, Gornicki P (2002) The carboxyltransferase activity of the apicoplast acetyl-CoA carboxylase of Toxoplasma gondii is the target of aryloxyphenoxypropionate inhibitors. J Biol Chem 277: 23208-23215

Johnson TM, Rajfur Z, Jacobson K, Beckers CJ (2007) Immobilization of the type XIV myosin complex in Toxoplasma gondii. Mol Biol Cell 18: 3039-3046

Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I (1990) Toxoplasma gondii: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. Science 249: 641-646

Jonas A (2000) Lecithin cholesterol acyltransferase. Biochim Biophys Acta 1529: 245-256

Jones TC, Hirsch JG (1972) The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. J Exp Med 136: 1173-1194

Jorasch P, Warnecke DC, Lindner B, Zahringer U, Heinz E (2000) Novel processive and nonprocessive glycosyltransferases from Staphylococcus aureus and Arabidopsis thaliana synthesize glycoglycerolipids, glycophospholipids, glycosphingolipids and glycosylsterols. Eur J Biochem 267: 3770-3783

Jorasch P, Wolter FP, Zahringer U, Heinz E (1998) A UDP glucosyltransferase from Bacillus subtilis successively transfers up to four glucose residues to 1,2-diacylglycerol: expression of ypfP in Escherichia coli and structural analysis of its reaction products. Mol Microbiol 29: 419-430

Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 A resolution. Nature 411: 909-917

Jouhet J (2005) Etude des remaniements lipidiques des cellules vegetales en carence de phosphate. Université Joseph Fourier - Grenoble I, Grenoble

Jouhet J, Marechal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. J Cell Biol 167: 863-874

Jouhet J, Marechal E, Block MA (2007) Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. Prog Lipid Res 46: 37-55

Joyard J, Douce R (1982) The chloroplast envelope: structure and biochemical properties. Prog Clin Biol Res 102 Pt B: 77-89

Joyard J, Marechal E, Miege C, Block MA, Dorne AJ, Douce R (1998). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

Ju TK, Huang FL (2004) MSAP, the meichroacidin homolog of carp (Cyprinus carpio), differs from the rodent counterpart in germline expression and involves flagellar differentiation. Biol Reprod 71: 1419-1429

K

Kader JC (1996) Lipid-Transfer Proteins In Plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 627-654

Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Potapovich AI, Kini V, Amoscato AA, Fujii Y (2004) Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. Free Radic Biol Med 37: 1963-1985

Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. Nucleic Acids Res 34: D354-357

Kanfer JN (1983) Glycosphingolipids as receptors., Vol 3. Plenum Press, N.Y.

Karlsson KA (1970) Sphingolipid long chain bases. Lipids 5: 878-891

Karnataki A, Derocher AE, Coppens I, Feagin JE, Parsons M (2007) A Membrane Protease is Targeted to the Relict Plastid of Toxoplasma via an Internal Signal Sequence. Traffic 8: 1543-1553

Katayama K, Sakurai I, Wada H (2004) Identification of an Arabidopsis thaliana gene for cardiolipin synthase located in mitochondria. FEBS Lett 577: 193-198

Kelly AA, Dormann P (2002) DGD2, an arabidopsis gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. J Biol Chem 277: 1166-1173

Kelly AA, Dormann P (2004) Green light for galactolipid trafficking. Curr Opin Plant Biol 7: 262-269

Kelly AA, Froehlich JE, Dormann P (2003) Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes DGD1 and DGD2 in Arabidopsis reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. Plant Cell 15: 2694-2706

Kinney AJ (1993) Phospholipid head groups. In TS Moore, ed, Lipid metabolism in plants. CRC Press, BocaRaton, pp 259-284

Klaus D, Hartel H, Fitzpatrick LM, Froehlich JE, Hubert J, Benning C, Dormann P (2002) Digalactosyldiacylglycerol synthesis in chloroplasts of the Arabidopsis dgd1 mutant. Plant Physiol 128: 885-895

Klukas O, Schubert WD, Jordan P, Krau N, Fromme P, Witt HT, Saenger W (1999) Localization of two phylloquinones, QK and QK', in an improved electron density map of photosystem I at 4-A resolution. J Biol Chem 274: 7361-7367

Kobayashi K, Awai K, Takamiya K, Ohta H (2004) Arabidopsis type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. Plant Physiol 134: 640-648

Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, Nishimura M, Ohta H (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 17216-17221

Kohler S (2006) Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: II. the ovoid mitochondrial cytoplasmic (OMC) complex of Toxoplasma gondii tachyzoites. Parasitol Res 98: 355-369

Kohler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. Science 275: 1485-1489

Kojima M, Seki K, Ohnishi M, Ito S, Fujino Y (1990) Structure of novel glyceroglycolipids in Adzuki bean (Vigna angularis) seeds. Biochem Cell Biol 68: 59-64

Kolter T, Sandhoff K (2006) Sphingolipid metabolism diseases. Biochim Biophys Acta 1758: 2057-2079

Kroll D, Meierhoff K, Bechtold N, Kinoshita M, Westphal S, Vothknecht UC, Soll J, Westhoff P (2001) VIPP1, a nuclear gene of Arabidopsis thaliana essential for thylakoid membrane formation. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 4238-4242

Kusters R, Breukink E, Gallusser A, Kuhn A, de Kruijff B (1994) A dual role for phosphatidylglycerol in protein translocation across the Escherichia coli inner membrane. J Biol Chem 269: 1560-1563

L

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Lebrun M, Carruthers VB, Cesbron-Delauw MF (2007) Toxoplasma secretory proteins and their roles in cell invasion and intracellular survival. In L Weiss, K Kim, eds, Toxoplasma gondii: the model Apicomplexan: perspectives and methods., pp 265-307

Lebrun M, Michelin A, El Hajj H, Poncet J, Bradley PJ, Vial H, Dubremetz JF (2005) The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during Toxoplasma gondii invasion. Cell Microbiol 7: 1823-1833

Ledoux M, Laloux L, Wolff RL (2000) Analytical methods for determination of trans-C18 fatty acid isomers in milk fat. A review. Analusis. 28: 402-412

Lee SH, Stephens JL, Englund PT (2007) A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. Nat Rev Microbiol 5: 287-297

Lefebvre B, Batoko H, Duby G, Boutry M (2004) Targeting of a Nicotiana plumbaginifolia H+ -ATPase to the plasma membrane is not by default and requires cytosolic structural determinants. Plant Cell 16: 1772-1789

Lei Y, Birch D, Davey M, Ellis JT (2005) Subcellular fractionation and molecular characterization of the pellicle and plasmalemma of Neospora caninum. Parasitology 131: 467-475

Lentz BR (2003) Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. Prog Lipid Res 42: 423-438

Levery SB (2005) Glycosphingolipid structural analysis and glycosphingolipidomics. Methods Enzymol 405: 300-369

Li M, Welti R, Wang X (2006) Quantitative profiling of Arabidopsis polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D zeta1 and D zeta2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. Plant Physiol 142: 750-761

Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 A resolution. Nature 428: 287-292

Livore VI, Tripodi KE, Uttaro AD (2007) Elongation of polyunsaturated fatty acids in trypanosomatids. Febs J 274: 264-274

Loll B, Kern J, Saenger W, Zouni A, Biesiadka J (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 A resolution structure of photosystem II. Nature 438: 1040-1044

Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS (1984) Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. Jama 252: 913-917

M

Ma H, Xu SP, Luo D, Xu ZH, Xue HW (2004) OsPIPK 1, a rice phosphatidylinositol monophosphate kinase, regulates rice heading by modifying the expression of floral induction genes. Plant Mol Biol 54: 295-310

Maeda Y, Tashima Y, Houjou T, Fujita M, Yoko-o T, Jigami Y, Taguchi R, Kinoshita T (2007) Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. Mol Biol Cell 18: 1497-1506

Magno RC, Straker LC, de Souza W, Attias M (2005) Interrelations between the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii and host cell organelles. Microsc Microanal 11: 166-174

Makioka A, Ohtomo H (1995) An increased DNA polymerase activity associated with virulence of Toxoplasma gondii. J Parasitol 81: 1021-1022

Mann T, Beckers C (2001) Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite Toxoplasma gondii. Mol Biochem Parasitol 115: 257-268

Marechal E, Awai K, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H, Joyard J (2000) The multigenic family of monogalactosyl diacylglycerol synthases. Biochem Soc Trans 28: 732-738

Marechal E, Azzouz N, de Macedo CS, Block MA, Feagin JE, Schwarz RT, Joyard J (2002) Synthesis of chloroplast galactolipids in apicomplexan parasites. Eukaryot Cell 1: 653-656

Marechal E, Block MA, Joyard J, Douce R (1994) Comparison of the kinetic properties of MGDG synthase in mixed micelles and in envelope membranes from spinach chloroplast. FEBS Lett 352: 307-310

Marechal E, Block MA, Joyard J, Douce R (1994) Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. J Biol Chem 269: 5788-5798

Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. J Biol Chem 281: 22684-22694

Martin AM, Liu T, Lynn BC, Sinai AP (2007) The Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. J Eukaryot Microbiol 54: 25-28

Martin SW, Glover BJ, Davies JM (2005) Lipid microdomains--plant membranes get organized. Trends Plant Sci 10: 263-265

Mazumdar J, E HW, Masek K, C AH, Striepen B (2006) Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in Toxoplasma gondii. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 13192-13197

McFadden DC, Seeber F, Boothroyd JC (1997) Use of Toxoplasma gondii expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro. Antimicrob Agents Chemother 41: 1849-1853

McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N (1996) Plastid in human parasites. Nature 381: 482

Melo EJ, Carvalho TM, De Souza W (2001) Behaviour of microtubules in cells infected with Toxoplasma gondii. Biocell 25: 53-59

Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Ferguson DJ (2007) Dense granules of the infectious stages of Toxoplasma gondii: their central role in the host/parasite relationship. In D Soldati-Favre, JW Ajioka, eds, Toxoplasma: Molecular and Cellular Biology,

Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Ferguson DJP (2007) Dense granules of the infectious stages of Toxoplasma gondii: Their central role in the host/parasite relationship. In D Soldati-Favre, JW Ajioka, eds, Toxoplasma: Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press

Miege C, Marechal E (1999) 1,2-sn-Diacylglycerol in plant cells: Product, substrate and regulator. Plant Physiol Biochem 37: 795-808

Miege C, Marechal E, Shimojima M, Awai K, Block MA, Ohta H, Takamiya K, Douce R, Joyard J (1999) Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. Eur J Biochem 265: 990-1001

Mineo JR, Kasper LH (1994) Attachment of Toxoplasma gondii to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). Exp Parasitol 79: 11-20

Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH (1993) Antibodies to Toxoplasma gondii major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. J Immunol 150: 3951-3964

Miras S, Salvi D, Piette L, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Reinbothe C, Joyard J, Reinbothe S, Rolland N (2007) Toc159- and Toc75-independent import of a transit sequence-less precursor into the inner envelope of chloroplasts. J Biol Chem 282: 29482-29492

Mondragon R, Frixione E (1996) Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in Toxoplasma gondii tachyzoites. J Eukaryot Microbiol 43: 120-127

Monteiro VG, de Melo EJ, Attias M, de Souza W (2001) Morphological changes during conoid extrusion in Toxoplasma gondii tachyzoites treated with calcium ionophore. J Struct Biol 136: 181-189

Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C (1998) Lipid trafficking in plant cells. Prog Lipid Res 37: 371-391

Moreno SN, Zhong L (1996) Acidocalcisomes in Toxoplasma gondii tachyzoites. Biochem J 313 (Pt 2): 655-659

Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD (1995) Invasion of Toxoplasma gondii occurs by active penetration of the host cell. J Cell Sci 108 (Pt 6): 2457-2464

Morrissette NS, Murray JM, Roos DS (1997) Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. J Cell Sci 110 (Pt 1): 35-42

Morrissette NS, Sibley LD (2002) Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in Toxoplasma gondii. J Cell Sci 115: 1017-1025

Mullin KA, Lim L, Ralph SA, Spurck TP, Handman E, McFadden GI (2006) Membrane transporters in the relict plastid of malaria parasites. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 9572-9577

N

Ngo HM, Yang M, Joiner KA (2004) Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? Mol Microbiol 52: 1531-1541

Ngo HM, Yang M, Paprotka K, Pypaert M, Hoppe H, Joiner KA (2003) AP-1 in Toxoplasma gondii mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment. J Biol Chem 278: 5343-5352

Nichols BA, Chiappino ML, Pavesio CE (1994) Endocytosis at the micropore of Toxoplasma gondii. Parasitol Res 80: 91-98

Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn M, Yang M, Pypaert M, Joiner KA, Coppens I (2005) Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular Toxoplasma. Cell Microbiol 7: 849-867

Nowicki M, Muller F, Frentzen M (2005) Cardiolipin synthase of Arabidopsis thaliana. FEBS Lett 579: 2161-2165

O

O'Brien IE, Reutelingsperger CP, Holdaway KM (1997) Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. Cytometry 29: 28-33

Ohvo-Rekila H, Ramstedt B, Leppimaki P, Slotte JP (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. Prog Lipid Res 41: 66-97

Oishi H, Noto T, Sasaki H, Suzuki K, Hayashi T, Okazaki H, Ando K, Sawada M (1982) Thiolactomycin, a new antibiotic. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and biological properties. J Antibiot (Tokyo) 35: 391-395

P

Palmer JD The symbiotic birth and spread of plastid:how many times and who dunuit? J. Phycol. 39: 4-11

Palmer JD (1992) Green ancestry of malarial parasites? Curr Biol 2: 318-320

Parsons M, Karnataki A, Feagin JE, DeRocher A (2007) Protein trafficking to the apicoplast: deciphering the apicomplexan solution to secondary endosymbiosis. Eukaryot Cell 6: 1081-1088

Payrastre B (2004) Phosphoinositides. In Bioactive Lipids., pp 63-84

Pelletier L, Stern CA, Pypaert M, Sheff D, Ngo HM, Roper N, He CY, Hu K, Toomre D, Coppens I, Roos DS, Joiner KA, Warren G (2002) Golgi biogenesis in Toxoplasma gondii. Nature 418: 548-552

Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC (1977) Specific labeling of intracellular Toxoplasma gondii with uracil. J Protozool 24: 449-453

Pomorski T, Holthuis JC, Herrmann A, van Meer G (2004) Tracking down lipid flippases and their biological functions. J Cell Sci 117: 805-813

Q

Quevillon E, Spielmann T, Brahimi K, Chattopadhyay D, Yeramian E, Langsley G (2003) The Plasmodium falciparum family of Rab GTPases. Gene 306: 13-25

Quittnat F, Nishikawa Y, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn MM, Murphy RC, Barkley RM, Pypaert M, Joiner KA, Coppens I (2004) On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a Toxoplasma DGAT1-related enzyme. Mol Biochem Parasitol 138: 107-122

R

Rabjeau A, Foussard F, Mauras G, Dubremetz JF (1997) Enrichment and biochemical characterization of Toxoplasma gondii tachyzoite plasmalemma. Parasitology 114 (Pt 5): 421-426

Raggers RJ, Pomorski T, Holthuis JC, Kalin N, van Meer G (2000) Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. Traffic 1: 226-234

Ralph SA, D'Ombrain MC, McFadden GI (2001) The apicoplast as an antimalarial drug target. Drug Resist Updat 4: 145-151

Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI (2004) Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast. Nat Rev Microbiol 2: 203-216

Raposo G, Marks MS (2002) The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. Traffic 3: 237-248

Riethmuller J, Riehle A, Grassme H, Gulbins E (2006) Membrane rafts in host-pathogen interactions. Biochim Biophys Acta 1758: 2139-2147

Robibaro B, Stedman TT, Coppens I, Ngo HM, Pypaert M, Bivona T, Nam HW, Joiner KA (2002) Toxoplasma gondii Rab5 enhances cholesterol acquisition from host cells. Cell Microbiol 4: 139-152

Rodriguez C, Afchain D, Capron A, Dissous C, Santoro F (1985) Major surface protein of Toxoplasma gondii (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. Eur J Immunol 15: 747-749

Rontein D, Wu WI, Voelker DR, Hanson AD (2003) Mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase from higher plants. Functional complementation in yeast, localization in plants, and overexpression in Arabidopsis. Plant Physiol 132: 1678-1687

S

Saeij JP, Coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC (2007) Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. Nature 445: 324-327

Sanchez-Fernandez R, Davies TG, Coleman JO, Rea PA (2001) The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory. J Biol Chem 276: 30231-30244

Sato N, Murata N (1982) Lipids biosyntesis in the blue-green alga, Anabaena variabilis I. Lipid classes. Biochim Biophys Acta 710: 271-278

Satouh Y, Padma P, Toda T, Satoh N, Ide H, Inaba K (2005) Molecular characterization of radial spoke subcomplex containing radial spoke protein 3 and heat shock protein 40 in sperm flagella of the ascidian Ciona intestinalis. Mol Biol Cell 16: 626-636

Schlame M, Rua D, Greenberg ML (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. Prog Lipid Res 39: 257-288

Schrick K, Nguyen D, Karlowski WM, Mayer KF (2004) START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. Genome Biol 5: R41

Seeber F (2002) Biogenesis of iron-sulphur clusters in amitochondriate and apicomplexan protists. Int J Parasitol 32: 1207-1217

Seeber F (2003) Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 3: 99-109

Seeber F, Aliverti A, Zanetti G (2005) The plant-type ferredoxin-NADP+ reductase/ferredoxin redox system as a possible drug target against apicomplexan human parasites. Curr Pharm Des 11: 3159-3172

Sengupta K, Hernandez-Ramirez VI, Rios A, Mondragon R, Talamas-Rohana P (2001) Entamoeba histolytica: monoclonal antibody against the beta1 integrin-like molecule (140 kDa) inhibits cell adhesion to extracellular matrix components. Exp Parasitol 98: 83-89

Shanklin J, Cahoon EB (1998) Desaturation And Related Modifications Of Fatty Acids1. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 611-641

Shimojima M, Ohta H, Iwamatsu A, Masuda T, Shioi Y, Takamiya K (1997) Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 333-337

Sibley LD (2003) Toxoplasma gondii: perfecting an intracellular life style. Traffic 4: 581-586

Sibley LD, Andrews NW (2000) Cell invasion by un-palatable parasites. Traffic 1: 100-106

Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL (1985) Phagosome acidification blocked by intracellular Toxoplasma gondii. Nature 315: 416-419

Siddall ME (1992) Hohlzylinders. Parasitol Today 8: 90-91

Siegenthaler PA (1998) Molecular organization of acyl lipids in photosynthetic membranes of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Simpson AG, Roger AJ (2004) The real kingdoms of eukaryotes. current Biology 14: 693-696

Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720-731

Slomiany BL, Murty VL, Liau YH, Slomiany A (1987) Animal glycoglycerolipids. Prog Lipid Res 26: 29-51

Smith CR (1971) Occurence of unusual fatty acids in plants. Progress in Chemistry of Fats other Lipids 11: 137-177

Soldati D, Lassen A, Dubremetz JF, Boothroyd JC (1998) Processing of Toxoplasma ROP1 protein in nascent rhoptries. Mol Biochem Parasitol 96: 37-48

Sommer MS, Gould SB, Lehmann P, Gruber A, Przyborski JM, Maier UG (2007) Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates? Mol Biol Evol 24: 918-928

Sonda S, Sala G, Ghidoni R, Hemphill A, Pieters J (2005) Inhibitory effect of aureobasidin A on Toxoplasma gondii. Antimicrob Agents Chemother 49: 1794-1801

Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A (2007) Gangliosides as components of lipid membrane domains. Glycobiology 17: 1R-13R

Sperling P, Heinz E (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. Biochim Biophys Acta 1632: 1-15

Sperling P, Warnecke D, Heinz E (2004) Plant sphingolipids. Springer-Verlag, Heidelberg

Staehelin LA (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. Plant J 11: 1151-1165

Standfuss J, Terwisscha van Scheltinga AC, Lamborghini M, Kuhlbrandt W (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 A resolution. Embo J 24: 919-928

Stedman TT, Sussmann AR, Joiner KA (2003) Toxoplasma gondii Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. J Biol Chem 278: 5433-5443

Steffen R, Kelly AA, Huyer J, Dormann P, Renger G (2005) Investigations on the reaction pattern of photosystem II in leaves from Arabidopsis thaliana wild type plants and mutants with genetically modified lipid content. Biochemistry 44: 3134-3142

Stillwell W, Wassall SR (2003) Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. Chem Phys Lipids 126: 1-27

Stokkermans TJ, Schwartzman JD, Keenan K, Morrissette NS, Tilney LG, Roos DS (1996) Inhibition of Toxoplasma gondii replication by dinitroaniline herbicides. Exp Parasitol 84: 355-370

Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol 185: 60-89

Suh BC, Hille B (2005) Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Curr Opin Neurobiol 15: 370-378

T

Tenant-Flowers M, Boyle MJ, Carey D, Marriott DJ, Harkness JL, Penny R, Cooper DA (1991) Sulphadiazine desensitization in patients with AIDS and cerebral toxoplasmosis. Aids 5: 311-315

Tomavo S, Schwarz RT, Dubremetz JF (1989) Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of Toxoplasma gondii major surface antigens. Mol Cell Biol 9: 4576-4580

Tonkin CJ, Struck NS, Mullin KA, Stimmler LM, McFadden GI (2006) Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. Mol Microbiol 61: 614-630

V

van Besouw A, Wintermans JF (1978) Galactolipid formation in chloroplast envelopes. I. Evidence for two mechanisms in galactosylation. Biochim Biophys Acta 529: 44-53

van Meer G, Lisman Q (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. J Biol Chem 277: 25855-25858

Vance JE, Steenbergen R (2005) Metabolism and functions of phosphatidylserine. Prog Lipid Res 44: 207-234

Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. Annu Rev Biochem 70: 535-602

Velge-Roussel F, Dimier-Poisson I, Buzoni-Gatel D, Bout D (2001) Anti-SAG1 peptide antibodies inhibit the penetration of Toxoplasma gondii tachyzoites into enterocyte cell lines. Parasitology 123: 225-233

Vial HJ, Wein S, Farenc C, Kocken C, Nicolas O, Ancelin ML, Bressolle F, Thomas A, Calas M (2004) Prodrugs of bisthiazolium salts are orally potent antimalarials. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 15458-15463

Vikstrom S, Li L, Wieslander A (2000) The nonbilayer/bilayer lipid balance in membranes. Regulatory enzyme in Acholeplasma laidlawii is stimulated by metabolic phosphates, activator phospholipids, and double-stranded DNA. J Biol Chem 275: 9296-9302

Vincent P, Maneta-Peyret L, Sturbois-Balcerzak B, Duvert M, Cassagne C, Moreau P (1999) One of the origins of plasma membrane phosphatidylserine in plant cells is a local synthesis by a serine exchange activity. FEBS Lett 464: 80-84

Vivier E, Petitprez A (1969) The outer membrane complex and its development at the time of the formation of daughter cells in Toxoplasma gondii. J Cell Biol 43

W

Wakelam MJ (1998) Diacylglycerol--when is it an intracellular messenger? Biochim Biophys Acta 1436: 117-126

Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, Cowman AF, Besra GS, Roos DS, McFadden GI (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 12352-12357

Waller RF, McFadden GI (2005) The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. Curr Issues Mol Biol 7: 57-79

Wang H, Lei C, Li J, Wu Z, Shen G, Yu R (2004) A piezoelectric immunoagglutination assay for Toxoplasma gondii antibodies using gold nanoparticles. Biosens Bioelectron 19: 701-709

Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. Prog Lipid Res 45: 250-278

Weiss LM, Kim K (2000) The development and biology of bradyzoites of Toxoplasma gondii. Front Biosci 5: D391-405

Wichroski MJ, Melton JA, Donahue CG, Tweten RK, Ward GE (2002) Clostridium septicum alpha-toxin is active against the parasitic protozoan Toxoplasma gondii and targets members of the SAG family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface proteins. Infect Immun 70: 4353-4361

Wilson RJ, Gardner MJ, Feagin JE, Williamson DH (1991) Have malaria parasites three genomes? Parasitol Today 7: 134-136

Wintermans JF, Van Besouw A, Bogemann G (1981) Galactolipid formation in chloroplast envelopes. II. Isolation-induced changes in galactolipid composition. Biochim Biophys Acta 663: 99-107

X

Xu C, Fan J, Froehlich JE, Awai K, Benning C (2005) Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in Arabidopsis. Plant Cell 17: 3094-3110

Xu C, Fan J, Riekhof W, Froehlich JE, Benning C (2003) A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in Arabidopsis. Embo J 22: 2370-2379

Xu Y (2002) Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction. Biochim Biophys Acta 1582: 81-88

Xu Y, Siegenthaler PA (1996) Phosphatidylglycerol molecular species of photosynthetic membranes analyzed by high-performance liquid chromatography: theoretical considerations. Lipids 31: 223-229

Y

Yachida Y, Kashiwagi M, Mikami T, Tsuchihashi K, Daino T, Akino T, Gasa S (1998) Stereochemical structures of synthesized and natural plasmalogalactosylceramides from equine brain. J Lipid Res 39: 1039-1045

Yamaryo Y, Kanai D, Awai K, Shimojima M, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H (2003) Light and cytokinin play a co-operative role in MGDG synthesis in greening cucumber cotyledons. Plant Cell Physiol 44: 844-855

Yamaryo Y, Motohashi K, Takamiya K, Hisabori T, Ohta H (2006) In vitro reconstitution of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) synthase regulation by thioredoxin. FEBS Lett 580: 4086-4090

Yang M, Coppens I, Wormsley S, Baevova P, Hoppe HC, Joiner KA (2004) The Plasmodium falciparum Vps4 homolog mediates multivesicular body formation. J Cell Sci 117: 3831-3838

Yu B, Wakao S, Fan J, Benning C (2004) Loss of plastidic lysophosphatidic acid acyltransferase causes embryo-lethality in Arabidopsis. Plant Cell Physiol 45: 503-510

Z

Zeyda M, Stulnig TM (2006) Lipid Rafts & Co.: an integrated model of membrane organization in T cell activation. Prog Lipid Res 45: 187-202

Zhang Y, Hayashi Y, Cheng X, Watanabe T, Wang X, Taniguchi N, Honke K (2005) Testis-specific sulfoglycolipid, seminolipid, is essential for germ cell function in spermatogenesis. Glycobiology 15: 649-654

Zhang Z, Green BR, Cavalier-Smith T (2000) Phylogeny of ultra-rapidly evolving dinoflagellate chloroplast genes: a possible common origin for sporozoan and dinoflagellate plastids. J Mol Evol 51: 26-40

Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelly S, Allegood JC, Liu Y, Peng Q, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M, Merrill AH, Jr. (2006) Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. Biochim Biophys Acta 1758: 1864-1884

Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ (1997) Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. J Biol Chem 272: 18240-18244

Zhou XW, Kafsack BF, Cole RN, Beckett P, Shen RF, Carruthers VB (2005) The opportunistic pathogen Toxoplasma gondii deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. J Biol Chem 280: 34233-34244

Zhu G (2004) Current progress in the fatty acid metabolism in Cryptosporidium parvum. J Eukaryot Microbiol 51: 381-388

Zuther E, Johnson JJ, Haselkorn R, McLeod R, Gornicki P (1999) Growth of Toxoplasma gondii is inhibited by aryloxyphenoxypropionate herbicides targeting acetyl-CoA carboxylase. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 13387-13392

ETUDES STRUCTURALES, CELLULAIRES ET PHARMACOLOGIQUES DE LA SYNTHESE DES GALACTOLIPIDES CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA* ET *TOXOPLASMA GONDII*

Les galactoglycérolipides (*i.e.* monogalactosyldiacylglycérol, MGDG et digalactosyldiacylglycérol, DGDG) sont les lipides majeurs des membranes des chloroplastes, représentant jusqu'à 80% de la composition membranaire plastidiale. La synthèse de ces galactolipides est catalysée par deux types de galactosyltransférases, les MGDG synthases (ou MGD) et les DGDG synthases (ou DGD). Lors de cette synthèse, un groupement β-galactosyl provenant d'un UDP-αGal, est transféré sur la position *sn-3* d'un diacylglycérol (DAG). Les DGD utilisent le MGDG produit par les MGD comme substrat pour la synthèse du DGDG. La synthèse du MGDG est donc essentielle pour la biogenèse du chloroplaste et par conséquent pour la survie de la cellule végétale. Les Apicomplexes sont des parasites intracellulaires obligatoires d'importance médicale et vétérinaire. Ils possèdent un plaste vestigial non-photosynthétique, nommé apicoplaste, acquis par endosymbiose secondaire d'une algue rouge. L'apicoplaste est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques de type végétal. De plus, il est essentiel à la survie du parasite. La synthèse de galactolipides aux propriétés chromatographiques indiscernables de celles du MGDG et du DGDG a été mesurée chez *Toxoplasma gondii*, le parasite Apicomplexe responsable de la toxoplasmose. Nous avons entrepris une étude comparative du métabolisme et de la dynamique des galactolipides chez les plantes et des lipides structurellement apparenté chez les parasites Apicomplexes, par des analyses de biochimie, biologie structurale, moléculaire et cellulaire chez *A. thaliana* et *T. gondii*.

Nous avons tout d'abord établi un modèle structural de la MGDG synthase chloroplastique basée sur son homologie avec la glycosyltransférase bactérienne MURG. Ce modèle structural a été validé par mutations ponctuelles rationalisées. Ce modèle indique les résidus impliqués dans la liaison de l'UDP-Gal et permet d'avancer dans notre compréhension du mécanisme catalytique. Il permet de proposer certaines régions comme participant à la fixation du DAG et à l'association à la membrane du chloroplaste. La structure présentée dans ce manuscrit constitue un outil pour l'étude d'inhibiteurs de la MGDG synthase et la compréhension de l'évolution complexe des enzymes de galactosylation.

Nous avons montré que des inhibiteurs des MGDG synthases de plantes, identifiés par criblage pharmacologique d'une chimiothèque de 23360 composés, avaient des propriétés herbicides, algicides et anti-parasitaire sur *A. thaliana*, *C. reinhartdii* et *T. gondii* respectivement. Nous avons par la suite engagé un programme d'optimisation par synthèse chimique et mesuré les effets de plus de 200 dérivés des molécules initiales. Cette stratégie nous a permis d'optimiser certaines de ces molécules dans l'objectif de développer des candidats herbicides/médicaments.

Grâce à l'utilisation de serums de lapin et de rat obtenus après immunisation avec du DGDG, nous avons détecté chez *T. gondii* un lipide, désigné DGLE (digalactolipid-like epitope), structuralement apparenté au digalactolipide. Ce lipide est localisé au niveau des membranes de la pellicule du parasite. De plus, la localisation du DGLE dépend du stade de vie du parasite, redistribué lors de l'invasion dans une cellule hôte. Le DGLE semble lié aux protéines associées au cytosquelette d'actine et/ou à des domaines membranaires. La détermination du lipidome de la pellicule par spectrométrie de masse montre que des dihexosyl-lipides mineurs dérivés de diacylglycérol, alkyl-acyl ou de céramide ont une masse compatible avec le DGLE. La question de la structure du DGLE, pour sa partie hydrophobe, reste donc irrésolue. Ce lipide a été détecté chez d'autres Apicomplexes tels que *Plasmodium falciparum* (agent de la malaria) et *Cryptosporidium parvum* (agent de la cryptosporidiose).

Le fait d'avoir pu induire une réponse immunitaire par injection du DGDG chez le lapin et le rat conduisant à la détection d'un épitope à la surface de *T. gondii*, nous a amené à étudier l'antigène digalactolipidique et ses applications éventuelles dans des visées diagnostiques et / ou thérapeutiques. Nous avons montré que le serum provoquait l'agglutination du parasite et empêchait son invasion dans la cellule hôte *in vitro*. Le marquage de la surface du parasite par le serum (*i.e.* l'opsonisation) active la réponse immunitaire inné *in vitro*. La phagocytose par les macrophages et l'activation du complément est accrue par rapport au contrôle. Ces résultats préliminaires suggèrent que des outils diagnostics et/ou des stratégies vaccinales nouveaux, basés sur la reconnaissance de l'antigène digalactolipidique de surface des parasites Apicomplexes, pourraient être envisagés.

Les perspectives de ces travaux incluent une poursuite du développement des inhibiteurs des MGDG synthases pour d'une part des recherches fondamentales par des approches de génétique chimique (invalidation chimique, utilisation de dérivés couplés à la biotine), et d'autre part des applications éventuelles en tant que candidat herbicides et / ou antiparasitaires. L'étude du rôle et de la synthèse des galactolipides chez *T. gondii* nécessitera la résolution de la structure du DGLE et la recherche des enzymes impliquées dans sa synthèse. Les effets remarquables du serum anti-DGDG mesuré *in vitro* devront être approfondis sur modèle animal.

MOTS CLES : galactolipides, MGDG synthase, herbicide, anti-parasitaire, Apicomplexe, *Arabidopsis*, *Toxoplasma*

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale
UMR 5168 CNRS-CEA-INRA-Université Joseph Fourier
Département Réponse et Dynamique Cellulaire;
CEA-Grenoble; 17, rue des Martyrs,
38054 Grenoble cedex 9

Laboratoire d'Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes
UMR 5163 CNRS-Université Joseph Fourier
Institut Jean Roget ; Domaine de la Merci
38700 La Tronche