



HAL
open science

La sortiline et les voies endosomales apparentées sont les éléments clefs pour la biogenèse des organites apicaux et la virulence chez *Toxoplasma gondii*

Pierre-Julien Sloves

► To cite this version:

Pierre-Julien Sloves. La sortiline et les voies endosomales apparentées sont les éléments clefs pour la biogenèse des organites apicaux et la virulence chez *Toxoplasma gondii*. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S020 . tel-01128835

HAL Id: tel-01128835

<https://theses.hal.science/tel-01128835>

Submitted on 10 Mar 2015

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

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

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE DE LILLE

THESE

Pour l'Obtention du grade de :

DOCTEUR en Biologie et Santé de l'Université de Lille Nord de France

Spécialité : Parasitologie

Présentée par

SLOVES Pierre-Julien

Sous la tutelle du **Docteur TOMAVO Stanislas**

La sortiline et les voies endosomales apparentées sont les éléments clefs pour la biogenèse des organites apicaux et la virulence chez *Toxoplasma gondii*

Soutenue le 29 Octobre 2012

Composition du jury :

Monsieur le Docteur SIMONET MICHEL	Président
Monsieur le Docteur LANGSLEY Gordon	Rapporteur
Monsieur le Docteur JOHANNES Ludger	Rapporteur
Monsieur le Docteur ANTONNY Bruno	Examineur
Madame le Docteur HAMDANE Malika	Examineur
Monsieur le Docteur TOMAVO Stanislas	Directeur de thèse

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Toxoplasme, équipe 1 du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille CNRS UMR 8204 –INSERM U1019, Institut Pasteur de Lille

RESUME

Toxoplasma gondii, l'agent de la toxoplasmose, appartient aux parasites Apicomplexa, un phylum dans lequel on retrouve de nombreux agents infectieux dangereux y compris *Plasmodium falciparum*, l'agent causal du paludisme. Ces parasites possèdent des organites apicaux spécifiques qui sont spécialisés dans la sécrétion des facteurs cruciaux pour l'infection de l'hôte. Ces organites sécrétoires appelés rhoptries et micronèmes contiennent des protéines qui semblent être acheminées *via* une voie endolysosomale apparentée. Toutefois, les récepteurs qui jouent un rôle clé dans le tri de ces protéines et la biogenèse des organites apicaux ne sont pas connus. Nous avons caractérisé un homologue parasite de la sortiline, un récepteur transmembranaire de type I connu chez l'Homme pour le tri et le transport des protéines. TgSORTLR pour «*Toxoplasma gondii* Sortiline-Like Receptor» est localisé au niveau de l'appareil de Golgi et du réseau post-Golgien. TgSORTLR se lie spécifiquement aux protéines de rhoptries et de micronèmes à l'aide du domaine N-terminus. De plus, l'extrémité N-terminus de TgSORTLR allant de l'acide aminé 39 à 202 est également nécessaire pour la localisation subcellulaire golgienne/post-golgienne et ses fonctions de récepteur intracellulaire. Nous avons montré que le domaine C-terminus de 154 acides aminés est déterminant pour la localisation de TgSORTLR et qu'il se lie aux protéines cytosoliques telles que μ 1-adaptine, Sec23, Vps9, Vps26 et Vps35. Nous avons démontré que ces partenaires cytosoliques co-localisent et se fixent spécifiquement à TgSORTLR. Ces résultats suggèrent que le domaine C-terminus de TgSORTLR assure des fonctions importantes dans le transport antérograde ou rétrograde des vésicules du trafic intracellulaire. Un mutant de *T. gondii* conditionnel dépourvu de TgSORTLR entraîne une délocalisation des protéines de rhoptries et de micronèmes et une disparition des organites apicaux, ce qui conduit à la forte atténuation de la virulence parasitaire chez la souris. En conclusion, le récepteur TgSORTLR se comporte d'une manière similaire aux sortilines des cellules de mammifère et l'étude de ses fonctions nous permettra de récapituler en partie le système endolysosomal et son rôle dans le transport et la biogenèse des organites vitaux de *T. gondii*.

MOTS CLEFS : parasitologie, *Toxoplasma gondii*, biologie cellulaire et moléculaire, trafic intracellulaire, virulence, sortiline

A Sortilin-like receptor and endolysosomal related pathways are essential for intracellular trafficking, apical organelle biogenesis and virulence in *Toxoplasma gondii*

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, the causative agent of toxoplasmosis belongs to the phylum named Apicomplexa that also contains *Plasmodium falciparum*, the causative agent of malaria and others parasites such as *Cryptosporidium* or *Eimeria*. Apicomplexan parasites are uniquely characterized by specific organelles, rhoptries and micronemes, which are located at the apical end of the parasite. These organelles are involved in the control of host-pathogen interactions. The proteins in these secretory organelles are trafficked through the endolysosomal system. However, the receptors that play key roles in protein sorting and biogenesis of these apical organelles remain to be identified. Here, we report that the homologue of sortilin in *T. gondii* designated TgSORTLR for “*Toxoplasma gondii* SORTilin-Like Receptor” is localized to Golgi and post-Golgi compartments and transports proteins into rhoptries and micronemes *via* their specific interactions with TgSORTLR luminal domain. We demonstrate that the C-terminus of TgSORTLR is also important for its subcellular localization through binding to cytosolic components of vesicular trafficking proteins known to be involved in anterograde and retrograde transports. The depletion of TgSORTLR using conditional knock-out strategy causes a complete mis-localization of proteins of both rhoptries and micronemes, leading to the loss of these apical organelles. These mutants display a strong attenuation of the parasite virulence in mice with the absence of acute toxoplasmosis symptoms. Complementation of the strain lacking TgSORTLR showed that N-terminal region between 39-202 amino acids indicated that the N-terminus, similarly to the C-terminus is essential for its correct localization. We conclude that the full-length TgSORTLR protein is required for its biological functions as intracellular sorting receptor in *T. gondii*.

KEY WORDS: parasitology, *Toxoplasma gondii*, cellular and molecular biology, intracellular trafficking, virulence, sortilin

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les personnes qui m'ont permis de réaliser mes travaux de thèse au sein du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Toxoplasme dirigé par Monsieur le Docteur Stanislas Tomavo dans l'équipe 1 du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CNRS UMR 8204 – INSERM U1019) dirigé par Monsieur le Docteur Camille LOCHT, à l'Institut Pasteur de Lille.

Je voudrais remercier le Docteur Stanislas TOMAVO pour m'avoir formé, pour m'avoir enseigné énormément de choses « à la paillasse » et en dehors et pour son encadrement au cours de ces années de thèses.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Michel Simonet d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, Monsieur le Docteur Gordon Langsley et Monsieur le Docteur Lugder Johannes pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs et un grand merci également à Madame le Docteur Malika Hamdane et Monsieur le Docteur Bruno Antonny d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Au cours de ma thèse j'ai croisé de nombreuses personnes du CIIL, de l'Institut Pasteur qui m'ont aidé dans mon travail que ce soit pour me montrer le fonctionnement d'appareils, nous dépanner en réactifs, etc...Je ne peux pas toutes les citer ici donc j'espère qu'elles se reconnaîtront et ne m'en voudront pas. Un Merci particulier à nos « voisins d'étage » qui figurent au premier rang des personnes évoquées ci-dessus.

Merci à tous les collaborateurs qui ont contribué aux travaux sur la « sortiline » et sans qui un tel travail n'aurait pas été possible : Merci beaucoup à Elisabeth Werkmeister pour m'avoir formé à la microscopie confocale et pour nous avoir aidé pour la réalisation de beaucoup d'expériences avec beaucoup de sympathie. Un immense Merci à tous les membres du laboratoire de spectrométrie de masse de l'IPHC de Strasbourg pour leurs analyses protéomiques et pour avoir collaborer avec nous pour tous ces travaux. Merci à Isabelle Callebaut pour les analyses bio-informatiques qui nous ont été et nous seront plus qu'utiles. Merci au Docteur Christian Slomianny pour son expertise en microscopie électronique et son aide très précieuse tout au long de ces travaux.

Merci à toutes les personnes qui nous ont généreusement donné des souches parasitaires, des anticorps, et autres réactifs sans qui ce travail était impensable.

Ces quatre années au sein de l'équipe toxo ont été riches en rencontre. Je voudrais remercier (dans l'ordre d'arrivée) Stéphane Delhay et Sylvain Fauquenoy pour m'avoir appris toutes vos astuces techniques mais surtout pour votre amitié. Un grand merci à Thomas Mouvaux avec qui nous avons partagé entièrement ces quatre années, pour son amitié et son humour sans qui certaines périodes auraient été plus sombres. Merci à Matthieu Gissot pour ses nombreux conseils et avec qui on a pu partager l'arrivée quasi-simultanée de nos petits bouts. Merci à Jöelle pour son aide et sa bonne humeur, à Robert pour sa sympathie et qui m'a permis de progresser en anglais. Merci à toutes les personnes qui ont travaillé à un moment ou à un autre dans le laboratoire : Sébastien, Lucile, Omar, Sarah, Justine, Adelma, Valérie, Gaëtan, Charles, ...

Pardon à tous ceux que je n'aurais pas cité...

Pour finir je voudrais remercier toutes les personnes qui me sont chères : mes Amis (dont des collègues) et ma Famille qui m'ont soutenu au cours de ces longues études et au cours des années de thèse. Merci à tous sans qui ces 8 années auraient été encore plus dures. Je voudrais évidemment remercier mes parents qui depuis toujours m'ont permis et poussé à faire des études et à qui je dois mon parcours.

Enfin, je veux remercier Lauriane qui a supporté les contraintes de mes études d'être à mes côtés depuis mon entrée à l'Université ; pour ce qu'elle a fait pour me permettre de réaliser mon parcours et surtout pour m'accompagner chaque jour. Pour terminer, ce n'est pas un merci mais plutôt une pensée pour Gabriel qui a rempli de bonheur les derniers mois de ma thèse.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ET BREVET

COMMUNICATIONS ORALES

- Présentation orale au “11th International congress on toxoplasmosis”, Ottawa, Canada du 25 au 29 Juin 2011
“A sortilin-like receptor of *Toxoplasma* plays a crucial role in biogenesis of secretory organelles and host cell invasion”
- Présentation orale à la réunion du Club Toxo à l’Institut Cochin de Paris en Juin 2010
« Etude de la sortiline, un candidat récepteur impliqué dans le trafic cellulaire de protéines chez *Toxoplasma gondii* »
- Présentation orale à la Journée André-Verbert à Lille en septembre 2011
« Un récepteur de type sortiline joue un rôle essentiel dans la biogenèse des organites de sécrétion et dans la virulence de *Toxoplasma gondii* »

BREVET

- « Conditional knockout mutants of sortilin-like receptor in Apicomplexa parasites and uses thereof » Découvreurs: **Sloves Pierre Julien**, Mouveaux Thomas, Tomavo S (2011) Brevet Français déposé par le FIST-CNRS et Université de Lille 2. Ref: DI-04612-01 et extensions internationales USA 61/500 790.

ARTICLES

- Fauquenoy, S., Hovasse, A., **Sloves, P.-J.**, Morelle, W., Dilezitoko Alayi, T., Dilezitoko Ayali, T., Slomianny, C., Werkmeister, E., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., et al. (2011). Unusual N-glycan structures required for trafficking *Toxoplasma gondii* GAP50 to the inner membrane complex regulate host cell entry through parasite motility. *Mol. Cell Proteomics* 10, M111.008953.
- **Sloves, P.-J.**, Delhaye, S., Mouveaux, T., Werkmeister, E., Slomianny, C., Hovasse, A., Dilezitoko Alayi, T., Callebaut, I., Gaji, R.Y., Schaeffer-Reiss, C., et al. (2012). *Toxoplasma* sortilin-like receptor regulates protein transport and is essential for apical secretory organelle biogenesis and host infection. *Cell Host Microbe* 11, 515–527.

TABLES DES MATIERES

RESUME	2
ABSTRACT	3
ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	14
GENERALITES	16
I. <i>Toxoplasma gondii</i>, le parasite Apicomplexe responsable de la toxoplasmose	16
1. Historique et classification.....	16
2. <i>Toxoplasma gondii</i> , un paradigme des parasites Apicomplexes	17
3. Le cycle de vie et les différents stades parasitaires de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
4. La toxoplasmose	23
II. Ultrastructure de <i>T. gondii</i> : une cellule eucaryote parasitaire polarisée	30
1. Les organites classiques des cellules eucaryotes.....	31
2. Les organites typiques des parasites Apicomplexa.....	32
III. Le parasitisme par <i>T. gondii</i> : les rôles majeurs des micronèmes et des rhoptries	44
1. La sécrétion des micronèmes et des rhoptries	45
2. Le trafic post-sécrétoire des protéines de micronèmes et de rhoptries.....	47
3. La motilité parasitaire : les micronèmes et le «glideosome»	49
4. Implications des MIC et des RON dans la formation de la jonction serrée ou mobile.....	51
5. Les rhoptries et la formation de la vacuole parasitophore	52
6. Rôles biologiques des protéines de rhoptries et de micronèmes.....	53
IV. La biogenèse des organites et le trafic intracellulaire chez <i>Toxoplasma gondii</i>	55
1. La biogenèse des organites apicaux lors de la réplication du parasite	56
2. L'analyse succincte du trafic intracellulaire chez les autres eucaryotes.....	58

3. Le trafic intracellulaire et l'adressage chez <i>T. gondii</i>	66
V. La sortiline : un récepteur cargo à domaine vps10 aux multiples fonctions.....	79
1. La famille des récepteurs à domaine VPS10p.....	79
2. Structure de la sortiline	82
3. Trafic intracellulaire de la sortiline et du MPR.....	84
4. La sortiline, un récepteur aux multiples fonctions	91
PROBLEMATIQUE	95
RESULTATS	97
I. TgSORTLR est essentielle pour le transport protéique et la biogenèse des organites de sécrétion	97
ARTICLE.....	98
II. La déplétion du récepteur TgSORTLR entraîne l'absence d'une réponse immunitaire protectrice chez les animaux infectés.....	102
III. L'absence de TgSORTLR entraîne une aberration de la migration électrophorétique des protéines de rhoptries et de micronèmes	105
IV. L'extrémité N-terminale de TgSORTLR est requise pour la localisation et l'activité fonctionnelle du récepteur.....	108
V. TgSORTLR co-localise et interagit spécifiquement avec des partenaires de la machinerie de transport vésiculaire.....	123
1. TgSORTLR est localisée dans les compartiments où se situent des protéines cargo qui régule le transport antérograde et rétrograde.....	123
2. TgSORTLR interagit spécifiquement et réciproquement avec les homologues de Sec23, μ 1-adaptine, Vps26, Vps35, Vps9 et avec HP20.....	132
3. L'expression ectopique d'une version tronquée de TgSORTLR dépourvue du domaine C-terminal entraîne la délocalisation de ses partenaires cytosoliques.....	133
DISCUSSION ET CONCLUSIONS	138
PERSPECTIVES	151

MATERIELS ET METHODES	157
I. Culture cellulaire	162
1. Culture des fibroblastes humains	162
2. Entretien des parasites	162
3. Purification des parasites	162
II. Biologie moléculaire	163
1. Extraction des ARNm	163
2. Synthèse des ADNc par rétro-transcription (RT)	163
3. Extraction de l'ADN génomique des tachyzoïtes	164
4. Construction des plasmides	164
III. Biologie cellulaire	171
1. Transfection transitoire des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i>	171
2. Obtention de lignées stables de parasites mutants	172
3. Préparation des parasites pour des observations ultrastructurales en microscopie électronique	174
4. Immunofluorescence indirecte avec les parasites intracellulaires	174
5. Tests phénotypiques <i>in vitro</i>	175
6. Etudes <i>in vivo</i> d'infection dans un modèle de toxoplasmose murin	176
IV. Biochimie	177
1. Électrophorèse en gel d'acrylamide	177
2. Immuno-empreinte ou « Western-blot »	177
3. Production de la protéine recombinante rSORT ₃₇₋₇₁₄	178
4. Purification de la protéine recombinante rSORT ₃₇₋₇₁₄ par électro-élution	179
5. Production d'anticorps polyclonaux anti-TgSORTLR	179
6. Purification des IgG spécifiques anti-TgSORTLR	179

7. Production des protéines recombinantes portant les différentes versions tronquées de TgSORTLR.....	180
8. Identification des partenaires de la sortiline par chromatographie d'affinité.....	180
9. Purification des partenaires du domaine C-terminal de TgSORTLR par chromatographie d'affinité.....	182
10. Chromatographie d'affinité sur colonne anti-HA.....	183
11. Tests d'interactions entre le domaine N-terminal de TgSORTLR et les protéines de rhoptries et de micronèmes	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187

ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNg : Acide Désoxyribonucléique génomique
AMA : Apical Membrane Antigen
AP : Adaptin-Potein
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ARF : ADP Ribosylation Factor
BET : Bromure d’Ethidium
BiP : Binding Protein
CAM : Calcium binding proteins
CDPK : Calcium Dependant Protein Kinase
CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CMI : Complexe Membranaire Interne
COP : COatomer Protein
GD : Granule Dense
DHFR : Dihydrofolate reductase
DMEM : Dulbecco Minimum Essential Medium
DMSO : Dimethylsulfoxyde
DPBS : Dulbecco Phosphate Buffered Saline
Drp : Dynamin-related protein
DTT: Dithiothreitol
EDTA : Ethylene Diamine Tetra-Acetate
EGF : Epidermal Growth Factor
RE : Reticulum Endoplasmique
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
GRAs : protéines de granules denses
GRASP : Golgi Reassembly Stacking Protein
GTP : Guanidine TriPhosphate

HA : Hemagglutinine
HDEL : Histidine-acide Aspartique-acide Glutamique-Leucine
HFF : Human Foreskin Fibroblast
HOSTs : Host Organelle Sequestering Tubulo structures
ICAM : Inter-Cellular Adhesion Molecule
IFN : Interféron
Ig : immunoglobuline
IL : Interleukine
IMPs : Inner Membrane Particules
ISPs : Inner membrane complex Sub-compartments Proteins
Kb : Kilobase
kDa : KiloDalton
MICs : micronemes proteins
MLC : Myosin Light Chain
MORN : Membrane Occupation and Recognition Nexus
MPP : Microneme Protein Protease
MT : Microtubule
MTIP : Myosin-Tail Interacting Protein
MVP : Membrane de la Vacuole Parasitophore
NK : Natural Killer
NSF : N-ethyl-maleimide sensitive factor
ORF : Open Reading Frame
PAF : Paraformaldéhyde
Pb : paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PIP : phosphoinositides phosphatés
PMSF : Paraméthylsulfoxyde
PS : peptide signal
RE : Reticulum Endoplasmique
RNG : Ring protein

ROMs : Rhomboid proteins
RONs : Rhopty Neck proteins
ROPs : Rhopty proteins
RT-PCR : reverse transcriptase-PCR
SAG : Surface AntiGene
SAR : Secretion-associated and Ras-related
SDS-PAGE : Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SNAP : soluble NSF attachment proteins
SNARE : SNAP receptors
SNX : Sorting nexin protein
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
STX : Syntaxine
SUB : Subtilisine
SVF : Serum de Veau Foetal
TAE : Tris Acetate EDTA
TEMED : Tetramethylethylenediamine
TLR : Toll Like Receptor
TM : transmembranaire
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNT : Tris NaCl Tween 20
TRAP : Thrombospondin-Related Anonymous Protein
TRIS : Tri(hydroxymethyl)aminométhane
VP : Vacuole Parasitophore

INTRODUCTION

Le parasite intracellulaire *Toxoplasma gondii* est l'agent pathogène responsable de la toxoplasmose. Ce parasite est l'un des plus ubiquitaires sur la planète et touche près d'un tiers de la population mondiale. La toxoplasmose est souvent bénigne mais peut s'avérer grave voire mortelle, c'est pourquoi la toxoplasmose demeure un enjeu en santé humaine chez la femme enceinte et le fœtus ou encore chez les personnes immunodéprimées (suite à une maladie comme le SIDA ou à un traitement médicamenteux immunosuppresseur). Outre le fait d'être l'agent d'une anthroponose potentiellement mortelle, cet organisme constitue un modèle pour les parasites appartenant au phylum des parasites Apicomplexa. Parmi le phylum Apicomplexa, on retrouve notamment *Plasmodium falciparum*, l'agent responsable du paludisme qui tue près d'un million de personnes chaque année, et d'autres agents dangereux pour les animaux et/ou l'Homme. Certains apicomplexes sont également classés comme des agents du bioterrorisme. De plus, la découverte récente de souches atypiques de *T. gondii* hautement virulentes ainsi que l'émergence ou réémergence de parasites résistants aux traitements actuels imposent un accroissement des connaissances fondamentales et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'organisation ultrastructurale commune aux cellules eucaryotes et spécifique des apicomplexes fait de *T. gondii* un excellent modèle de biologie cellulaire, en particulier pour l'étude de la biogenèse des organites et le trafic intracellulaire des protéines (Pelletier et al., 2002). *T. gondii* est une cellule hautement différenciée et polarisée. En effet, en plus des organites « classiques » retrouvés chez les autres eucaryotes, le parasite possède au niveau de son apex des organites de sécrétion spécialisés (micronèmes et rhoptries) qui caractérisent les parasites Apicomplexa et qui constituent les deux principaux acteurs responsables de la virulence.

A la suite d'un contact avec une cellule hôte, le toxoplasme va se ré-orienter, pénétrer activement à l'intérieur de la cellule hôte grâce à une « jonction mobile » formée par les protéines sécrétées par les micronèmes et les rhoptries. Lors de la pénétration, le parasite va s'entourer d'une membrane formant la vacuole parasitophore qui va constituer la niche dans laquelle les parasites vont se répliquer. Ce sont essentiellement les protéines des rhoptries qui sont responsables de la formation de la vacuole parasitophore et qui vont moduler les réponses immunes ainsi que les activités transcriptionnelles et

métaboliques de l'hôte. Le trafic intracellulaire et la biogenèse de ces organites qui contiennent des protéines de rhoptries capables d'activer et/ou d'inhiber des facteurs de l'immunité jouent un rôle capital dans la virulence et donc la pathogénie (Saeij et al., 2006 ; Taylor et al., 2006). En dépit de l'accumulation d'un nombre significatif de données expérimentales concernant la biosynthèse et maturation de ces protéines de rhoptries et de micronèmes, la biogenèse des organites apicaux ainsi que les récepteurs responsables du tri spécifique de ces protéines dans les organites restent des champs d'investigation à explorer. Au cours de ma thèse de doctorat, nous avons élucidé les fonctions biologiques d'une protéine de type sortiline identifiée par chromatographie d'affinité avec la lectine Concanavaleine A lors des précédents travaux du laboratoire (Fauquenoy et al., 2008). En effet, les protéines de type sortiline sont connues chez différents organismes modèles pour leurs rôles cruciaux dans le trafic de protéines. De plus, les sortilines humaines sont également impliquées dans des maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer) ou métaboliques (diabète, maladies lysosomales) chez l'Homme, Nous avons alors décidé d'approfondir ses fonctions biologiques chez *T. gondii*. Mes travaux de thèse visent donc à établir l'importance de cette protéine homologue à la sortiline appelée *TgSORTLR* pour «*Toxoplasma gondii SORTilin Like Receptor*» dans le tri et le transport des protéines chez le parasite. La compréhension des fonctions biologiques du récepteur *TgSORTLR* pourrait permettre d'élucider les différents mécanismes intervenant dans le trafic intracellulaire et la biogenèse des organites responsables de la pathogénie.

Généralités

I. ***Toxoplasma gondii*, le parasite Apicomplexe responsable de la toxoplasmose**

T. gondii est un protozoaire, parasite unicellulaire, appartenant au phylum des parasites Apicomplexa dans lequel on retrouve d'autres parasites responsables de maladies graves : *Plasmodium* (malaria), *Eimeria* (coccidiose), *Cryptosporidium* (cryptosporidiose).

1. **Historique et classification**

Cet agent pathogène fut découvert parallèlement par Splendore chez des lapins au Brésil en 1908 et par Nicolle et Manceaux à l'Institut Pasteur de Tunis. Ce sont ces derniers qui, après une épidémie de laboratoire touchant des rongeurs *Ctenodactylus gondii*, vont identifier et nommer le parasite *T. gondii*. Le nom de ce parasite a été proposé par Nicolle et Manceaux en 1909. Il doit son nom d'une part à sa forme arquée, *Toxoplasma*, du grec toxon - arc - et plasma - chose façonnée/vie -, et d'autre part au petit rongeur, *gondii*. *T. gondii* fut découvert chez l'homme par Darling la même année et retrouvé en 1923 par Janku dans des kystes rétinien d'un enfant hydrocéphale. En 1937, Wolf et Gowen rapportent le premier cas de toxoplasmose congénitale humaine (encéphalomyélite chez un nouveau-né) et Sabin et Olitsky décrivent la symptomatologie de la toxoplasmose humaine. Ils émettent en outre des hypothèses quant aux différences observées au niveau de la virulence de diverses souches et un mode de contamination probable par ingestion de viande contaminée. Entre 1940 et 1942, les premiers cas mortels chez un homme adulte sont référencés (Pinkerton et Weinman 1940 ; Sabin 1942). Il faut attendre le début des années 50 pour qu'un lien soit établi entre *Toxoplasma gondii* et des maladies inflammatoires ophtalmiques (Wilder, 1952). Le cycle biologique du toxoplasme n'est établi que vers la fin des années 60 par Hutchison et Work d'une part en 1965, et par Frenkel et Dubey en 1969.

La classification de *T. gondii* est établit comme suit :

Phylum : Apicomplexa ; Levine 1970

Classe : Sporozoea ; Leukart, 1879

Sous-classe : Coccidia ; Leukart, 1879

Ordre : Eucoccidia ; Leger et Dubosc, 1910

Sous-ordre : Eimeriina ; Leger, 1911

Famille : Sarcocystidae

Genre : Toxoplasma ; Nicolle et Manceaux, 1909

Especes : gondii ; Nicolle et Manceaux, 1908

Toxoplasma gondii est le seul représentant actuel du genre *Toxoplasma*

Il existe trois génotypes prédominants dénommés souches de type I, II et III de *T. gondii*. Ce classement a été instauré pour la virulence des parasites *in vivo* et corroborer plus tard par le séquençage des génomes (Sibley et al, 1991). Des études épidémiologiques ont permis de déterminer que les différents génotypes du *T. gondii* sont à l'origine des différentes conséquences pathologiques. Chez la souris, un seul parasite de type I est suffisant pour entraîner la mort de l'animal, tandis que pour les souches de type II et III, la dose létale est bien plus élevée (Boothroyd et Grigg, 2002) et celles-ci sont capables d'entraîner une infection chronique en s'enkystant dans le cerveau et les muscles du sujet ou l'animal infecté. La souche RH est une souche de type I hautement virulente isolée à partir d'un cas d'encéphalite humaine aiguë (Sabin, 1941). En Europe et en Amérique du Nord 81% des souches isolées à partir de patients sont de type II. En effet, la culture, la manipulation génétique relativement aisée et l'existence de bons modèles animaux font de *T. gondii*, un modèle de choix pour l'étude de la biologie, la biochimie et la génétique des parasites Apicomplexa.

2. *Toxoplasma gondii*, un paradigme des parasites Apicomplexes

Tous les parasites Apicomplexa sont relativement proches d'un point de vue génétique ou dans le mode de vie et l'organisation intracellulaire (Figure 1). Au sein du domaine eucaryote, les Apicomplexa, les Dinoflagellés et les ciliés partagent un ancêtre commun (il y a 900 millions d'années) et forment ensemble les Alveolata (Figure 1) qui possèdent entre autre la même architecture pelliculaire constituée de trois membranes sous-tendues par des microtubules (Patterson, 1999 ; Fast et al., 2002, Vaidya et Mather, 2009).

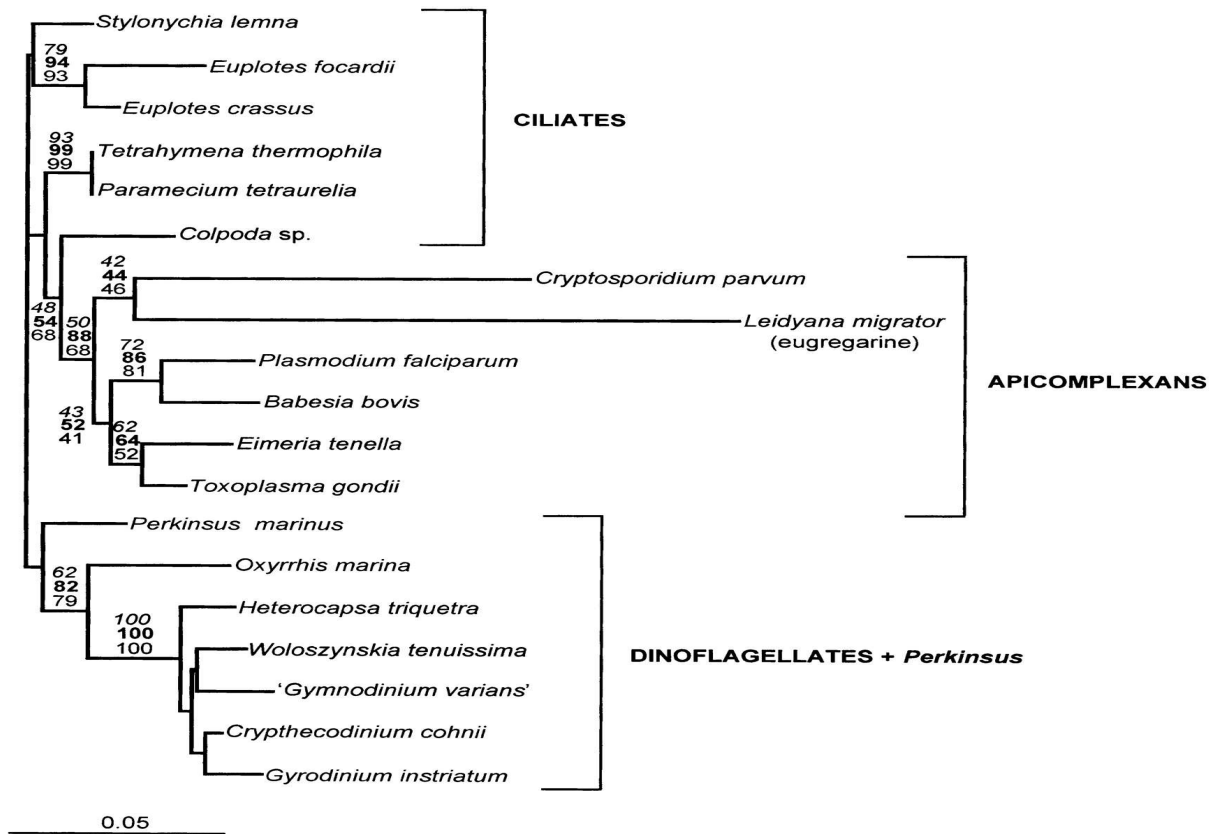


Figure 1. Arbre phylogénétique basé sur les séquences de β -tubuline (neighbour-joining pondéré) montrant certains parasites Apicomplexa. (D'après Leander et al., 2003).

Les Apicomplexa possèdent un complexe apical fermé et ont perdus leur flagelle sauf certaines formes de microgamètes. Ces parasites sont ensuite répartis en sous-classes notamment en fonction de la présence d'ADN mitochondrial. On retrouve les Gregarines, les Coccidies, les haemosporidiens et les piroplasmes (Hoppenrath et Leander, 2009).

Les études récentes suggèrent que les eugregarines et les cryptosporidium constituent deux embranchements très proches et divergent davantage par rapport aux coccidies (*Eimeria*, *Toxoplasma*), aux haemosporidiens (*Plasmodium*) et aux piroplasmes (*Babesia*) qui présentent de fortes homologues (Hoppenrath et Leander, 2009 ; Vaidya et Mather, 2009).

Dans ce phylum, on retrouve des parasites responsables de maladies humaines et/ou vétérinaires parmi lesquelles :

_ Les Babesioses ou piroplasmoses qui sont des maladies dues à l'inoculation et à la multiplication de parasites du genre *Babesia*, transmis par l'intermédiaire de tiques ixodidés. Elles se caractérisent par un syndrome pyrétique et hémolytique pouvant parfois entraîner de graves séquelles sur le foie et les

reins voire le décès de l'hôte. Cette maladie est d'une forte importance vétérinaire (notamment chez le chien) et agricole (notamment chez les bovidés). Pour l'Homme, quelques espèces peuvent être pathogènes avec des impacts différents aux USA (*Babesia microti*) et en Europe (*Babesia divergens*). Cette maladie est en effet plus fréquente aux USA avec un taux mortalité estimée à 5%. En Europe, ce sont principalement les patients splénectomisés qui sont touchés avec un taux de mortalité de 40%.

_ Les cryptosporidioses sont responsables d'environ 5 % des diarrhées chez les sujets immunocompétents dans les pays en voie de développement (1 à 2 % dans les régions tempérées). Ces maladies touchent un nombre croissant de personnes immunodéficientes chez lesquelles elles causent 20% des diarrhées en France. Ainsi, les *cryptosporidium* peuvent dans certains cas conduire à de graves syndromes hémorragiques et à une déshydratation avancée. Ces parasites sont par ailleurs responsables d'atteintes digestives chez les animaux jeunes et ce notamment dans les élevages avec une perte économique importante.

_Les coccidioses causées par les parasites du genre *Eimeria* représentent un enjeu économique important dans les élevages notamment aviaires dans le monde. Ce parasite va coloniser les cellules intestinales des oiseaux, des chèvres des lapins,...et va causer des hémorragies (perte de poids, décès).

_Le paludisme causé par le genre *Plasmodium*. Le parasite du paludisme est transmis à l'Homme par l'intermédiaire de la piqûre de la femelle anophèle. L'Homme représente l'hôte intermédiaire dans le cycle de vie du parasite où la phase sexuée se déroule chez le moustique. Chez l'Homme, le parasite infecte les cellules du foie, puis les hématies. Il existe de multiples espèces de *Plasmodium* pouvant infecter différents animaux. Quatre espèces peuvent infecter l'Homme : *Plasmodium vivax*, *malariae*, *ovale* et *falciparum*. Ce dernier est la cause la plus courante des infections paludéennes (80%) et le plus mortel (90% des décès). Le paludisme touche près de 30 à 40% de la population mondiale (surtout en Afrique subsaharienne mais aussi Asie, Amérique latine, Moyen-Orient, Europe). Il infecte entre 250 et 500 millions de personnes par an et en tue selon les chiffres de l'OMS près de 655000 (nombre de cas déclarés et confirmés en 2011). Cependant, certains experts évoquent le chiffre d'un à deux millions de morts chaque année. Le paludisme demeure la parasitose la plus importante et des résistances de *Plasmodium falciparum* aux artémisines ont été confirmées en Asie (Cambodge,

Thaïlande, Viet Nam) en 2009. De plus, le problème de la résistance du moustique aux insecticides semble également s'aggraver.

3. **Le cycle de vie et les différents stades parasitaires de *Toxoplasma gondii***

On retrouve chez l'Homme le tachyzoïte qui est la forme végétative du parasite et capable d'infecter n'importe quel type de cellules nucléées et le bradyzoïte est la forme latente du parasite que l'on retrouve dans des kystes présents dans le cerveau et les muscles. Il existe deux types de cycles de vie du parasite : monoxène (court), sans hôte intermédiaire, ou hétéroxène (long) via un ou plusieurs hôtes intermédiaires. La phase asexuée se déroule au sein d'un vertébré homéotherme (hôte intermédiaire).

a. **La phase sexuée du cycle**

La phase sexuée du cycle de vie ou gamogonie se réalise uniquement chez un félin (hôte définitif) au niveau des cellules de l'épithélium intestinal après ingestion de kystes toxoplasmiques. Les enzymes digestives vont en effet dégrader la paroi kystique protégeant les bradyzoïtes qui vont donc être libérés, puis vont pénétrer les entérocytes. Il va alors y avoir une série de divisions asexuées (la schizogonie) résultant en la production de schizontes qui vont s'individualiser en mérozoïtes suite à la fragmentation des cytoplasmes. Ces mérozoïtes se différencient ensuite en gamètes : microgamétocytes mâles et macrogamétocytes femelles. Après fécondation, les zygotes deviennent des oocystes. C'est sous cette dernière forme, très résistante, que les parasites sont relargués par l'hôte dans les fèces. Les parasites peuvent alors demeurer très longtemps dans l'environnement. La sporulation d'un oocyste conduira ensuite à la formation de huit sporozoïtes haploïdes infectants (Figure 2).

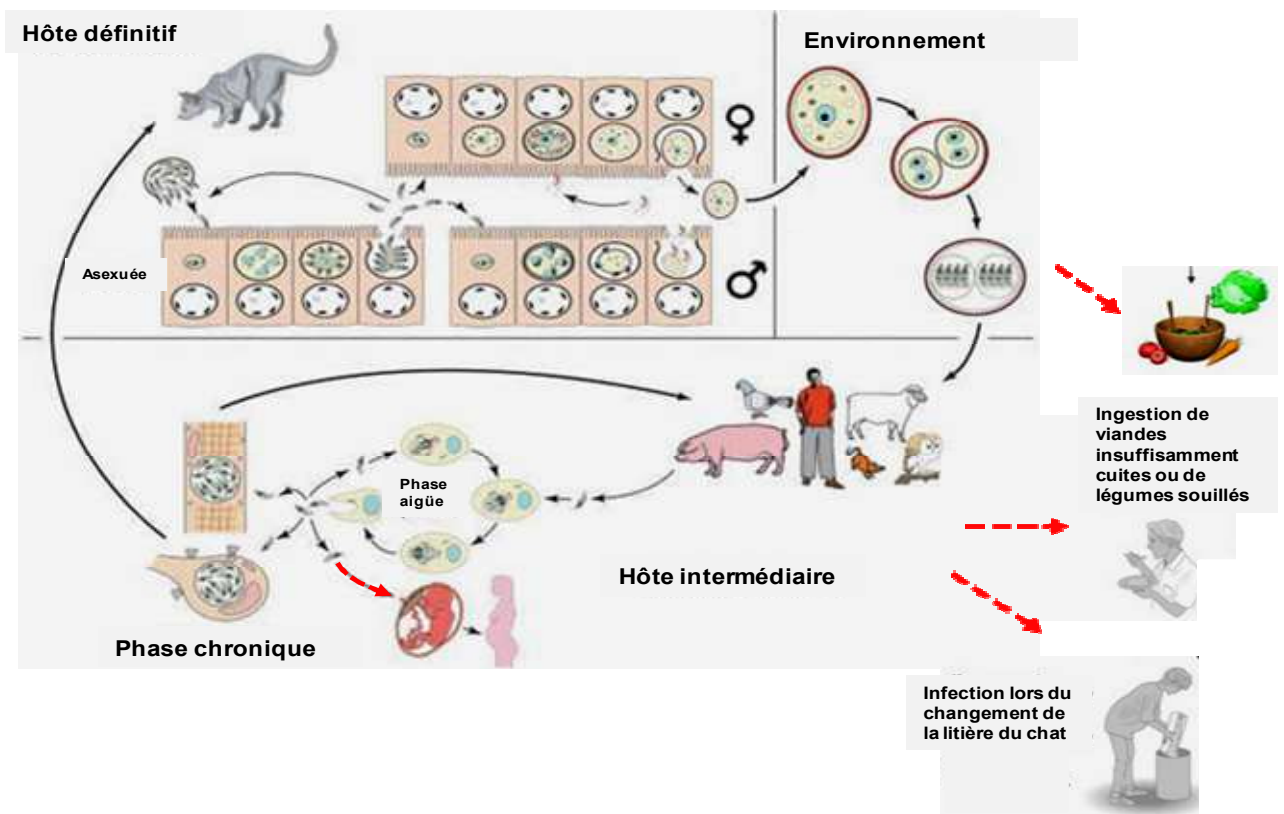


Figure 2: Cycle évolutif et pathogenèse de *Toxoplasma gondii* (adapté de Ferguson, 2002). Le chat, ou hôte définitif ingère les parasites (kystes dans les tissus). Invasion des entérocytes, divisions puis différenciation et phase sexuée du cycle. Formation d’ocystes qui sont relargués dans l’environnement. Formation des sporozoïtes et ingestion par les hôtes intermédiaires (souillures présentes sur les aliments). La différenciation en tachyzoïte, multiplication puis conversion en bradyzoïte (kystes) dans le cerveau et les muscles sont décrites. Les flèches rouges en pointillés indiquent les modes de transmission à l’Homme : ingestion d’ocystes sur des végétaux mal lavés ou par contact avec les fèces du chat ; ingestion de kystes présents chez les animaux d’élevage ; transmission transplacentaire.

b. L’Homme, un hôte intermédiaire dans le cycle de vie de *T. gondii*

L’infection de l’hôte intermédiaire se fait via la chaîne d’alimentation (ingestion d’ocystes ou de kystes contenus dans la viande). Les bradyzoïtes ou les sporozoïtes libérés dans les cellules intestinales se différencient en tachyzoïtes, c’est-à-dire la forme virulente caractéristique de la phase aiguë de l’infection (Figure 2). Ces tachyzoïtes se disséminent dans l’hôte jusqu’à l’induction d’une

réponse immunitaire qui va en éliminer une forte proportion. Cependant, une partie des tachyzoïtes va se différencier en bradyzoïtes et s'enkyster, ce qui conduit à la phase chronique de l'infection. Lorsque le système immunitaire de l'hôte est compromis, le bradyzoïte peut se redifférencier en tachyzoïte. Cette réactivation engendre des lésions tissulaires, notamment encéphaliques, dont les conséquences peuvent être fatales.

c. Les différents stades parasitaires

Le tachyzoïte ou forme virulente asexuée invasive du parasite se multiplie très rapidement à l'intérieur d'une vacuole parasitophore dans les cellules de l'hôte intermédiaire. C'est une cellule de forme arquée de 6 à 8 μm de longueur et de 2 à 3 μm de largeur. L'extrémité apicale du tachyzoïte est plus effilée que l'extrémité basale et le noyau occupe une position centrale dans le parasite (Fortier et Dubremetz, 1993) (figure 3A).

Le bradyzoïte ou forme latente asexuée du parasite se multiplie très lentement chez l'hôte intermédiaire. Il est similaire au tachyzoïte mais est plus effilé, le noyau se retrouve excentré au pôle basal (Figure 3B). On retrouve les bradyzoïtes parfois par centaines dans les structures kystiques (Figure 3D).

Les schizontes sont de grosses cellules possédant de nombreux noyaux et qui donneront après cytokinèse des mérozoïtes (Figure 3F). Les mérozoïtes sont de petites cellules ovoïdes issues de la schizogonie d'un bradyzoïte ou d'un sporozoïte dans l'intestin de l'hôte définitif.

Les gamontes sont les formes sexuées du parasite. Les microgamontes mâles immatures se différencient en microgamètes matures qui sont de très petites cellules possédant deux ou trois flagelles (Figure 3G). Les macrogamontes femelles sont de plus grosses cellules.

L'oocyste non sporulé, résultat de la fécondation durant le cycle sexué est sphérique et mesure 10 à 12 μm de diamètre. Il est entouré d'une double couche formant une paroi (Figure 3H). L'oocyste sporulé est composé de deux sporocystes, chaque sporocyste contenant quatre sporozoïtes (Figure 3E).

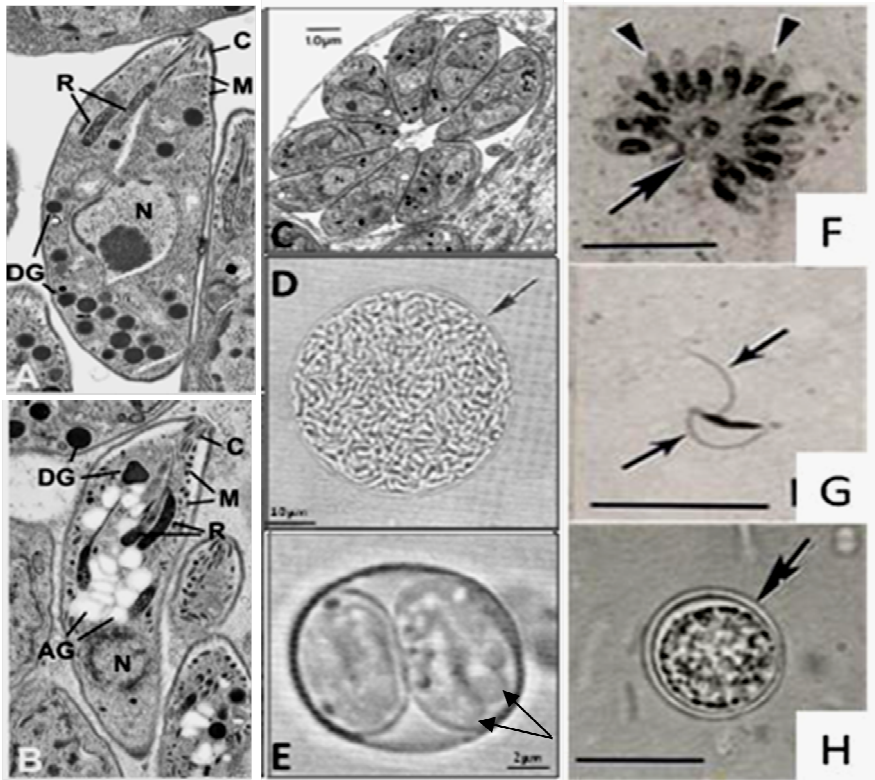


Figure 3 : Morphologie des différents stades parasitaires. 3A : Ultrastructure d'un tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* par microscopie électronique (d'après Coppin et al., 2003) ; C : conoïde, M : microneme, R : roptrie, DG : granule dense, N : noyau. **3B** : Ultrastructure d'un bradyzoïte de *Toxoplasma gondii* (d'après Coppin et al., 2003) ; AG : grain d'amylopectine. **3C** : Vacuole parasitophore contenant huit tachyzoïtes (d'après Shaw et al., 2001). **3D** : Kyste toxoplasmique contenant des bradyzoïtes (d'après Dubey, 2007.). **3E** : Oocyste contenant des sporozoïtes (flèches) (d'après Dubey, 2007). **3F** : Schizonte présentant des mérozoïtes en train de s'individualiser. **3G** : gamète mâle avec deux flagelles. **3H** : oocyste sporulé avec une double paroi.

4. La toxoplasmose

a. Risque infectieux et prévalence

La toxoplasmose est une maladie cosmopolite répandue sur toute la surface du globe. La prévalence de la maladie est majoritairement liée à la consommation d'aliments souillés. L'Homme peut ainsi être contaminé, comme tout autre hôte, par divers biais et on distingue deux modes de transmission : horizontale et transplacentaire. La transmission horizontale correspond à l'ingestion d'oocystes ou de

kystes toxoplasmiques. La transmission transplacentaire est la transmission au fœtus de tachyzoïtes qui ont pu traverser la barrière placentaire. La contamination des aliments et le risque infectieux proviennent majoritairement de la présence d'oocystes infectieux qui sont des formes résistantes qui peuvent perdurer dans les sols et les eaux souillées par les déjections des hôtes définitifs. L'Homme consomme également des herbivores (moutons, porcs, bovins) qui broutent au ras du sol souillé et qui représentent les animaux les plus atteints. En France, 72% des moutons, 28% des porcs et 4% des bovins sont infectés.

En Europe, la séroprévalence de la toxoplasmose humaine est de 54% et touche toutes les populations. On arrive à corréler le type de maladie engendrée et les différentes souches de toxoplasmes existantes. Une étude a démontré que chez les patients atteints de la toxoplasmose oculaire, on ne retrouve que des souches de type I et III (Vallochi et al., 2005). Deux études, dont une en France, ont également permis de déterminer que la toxoplasmose congénitale semble être due à une infection par un parasite de génotype II (Howe et al, 1997 ; Ajzenberg et al.,2002). Dans certaines régions du globe, comme au Salvador, la prévalence peut grimper jusqu'à 75-80%. Ces différences de proportion doivent être dues à plusieurs facteurs concomitants comme la présence abondante de l'hôte définitif, les conditions d'hygiène, les modes de vie et de culture (Tenter et al., 2000). En France, la prévention de la toxoplasmose est une priorité du programme d'action de l'Institut de Veille Sanitaire (AFSSA, 2005).

La maladie peut se décomposer en deux phases successives. En premier lieu, la toxoplasmose aiguë où les tachyzoïtes se disséminent dans l'organisme de manière active, en traversant les épithéliums, jusque dans des organes cibles tels que les muscles, le cœur ou les poumons, ou de manière passive, en pénétrant et en détournant les cellules effectrices du système immunitaire de l'hôte, pour ainsi rejoindre des organes moins accessibles, comme le cerveau. Sous la pression du système immunitaire chez les hôtes immunocompétents, les parasites vont se différencier en bradyzoïtes et s'enkyster. Ces kystes toxoplasmiques vont perdurer durant toute la vie de l'hôte principalement dans le cerveau et les muscles. Au cours de cette phase chronique les bradyzoïtes contenus dans les kystes vont échapper au système immunitaire et seront insensibles aux médicaments qui sont efficaces contre les tachyzoïtes de la phase aiguë de l'infection.

La toxoplasmose est dans la plupart des cas bénigne. Les symptômes, similaires à ceux d'une mononucléose ne durent que quelques jours ou quelques semaines avant de disparaître chez les sujets immunocompétents. Chez les patients infectés, 10 à 20% développent un syndrome pseudo-grippal ou une lymphadénite (fièvre, malaise, myalgie, céphalée, maux de gorge, lymphadénopathie et éruption cutanée). Des symptômes sévères tels que des myosites, myocardites, pneumopathies ou encore des signes neurologiques sont possibles mais rares. Cependant, lorsque le système immunitaire de l'hôte infecté est affaibli, la maladie devient bien souvent létale sans traitement. En effet, si le diagnostic et le traitement ne sont pas mis en place suffisamment tôt, les kystes cérébraux vont libérer des bradyzoïtes qui vont se différencier en tachyzoïtes et envahir les cellules du système nerveux central, conduisant à une toxoplasmose encéphalique entraînant un décès de 10% des patients. Lors d'une primo-infection chez la femme enceinte, la transmission transplacentaire au fœtus peut engendrer de graves séquelles irréversibles voire la mort de ce dernier. L'incidence de la toxoplasmose congénitale est de 1 à 2 pour 1000 naissances. Chaque année, environ 2500 enfants naissent avec une toxoplasmose congénitale.

Même si la toxoplasmose est bien évidemment un problème en santé humaine, elle est également un enjeu majeur de santé vétérinaire puisqu'elle est responsable de nombreux avortements et est capable de décimer des cheptels entiers (Dubey et Lindsay, 2006)

b. Diagnostique et pathogenèse

Le prélèvement de sang veineux est le moyen le plus utilisé pour établir le diagnostic. Les anticorps anti-*T. gondii* de type IgG apparaissent juste après les IgM et persistent indéfiniment à un taux assez faible. Le diagnostic est basé sur la cinétique des IgG précoces et tardifs. Leur détection à un taux relativement faible et stable après au moins deux prélèvements, sans IgM ou à un taux extrêmement faible indique une immunité ancienne probable de plus de deux mois. Ainsi le suivi des IgG et surtout des IgM sont utiles pour connaître le moment de l'infection.

En cas de toxoplasmose aiguë, différents médicaments sont utilisés, certains en synergie : pyriméthamine+sulfadiazine, clindamycine, spiramycine (chez la femme enceinte). Ces molécules possèdent une activité plus ou moins efficace avec des effets secondaires pouvant être prononcés. En effet, ces effets secondaires sont souvent mineurs mais parfois il peut y avoir, par exemples des

neuropathies et des syndromes de Lyell. Par ailleurs, des résistances sont actuellement en train d'émerger chez *T. gondii* et surtout, aucun traitement n'est réellement efficace contre la forme latente de la maladie. Aucune vaccination n'existe à l'heure actuelle pour l'Homme.

Des diagnostics tels que la culture cellulaire à partir de prélèvements, des études histologiques ou des méthodes de biologie moléculaire telle que la PCR, surtout pour la toxoplasmose *in utero* viennent compléter l'arsenal des tests pouvant aider à poser un diagnostic efficace.

_ Chez la femme enceinte

Chez toute femme enceinte, le diagnostic sérologique est réalisé en début de grossesse afin de savoir si elle est déjà séropositive et est ainsi protégée contre une nouvelle infection. En cas d'absence d'immunité, des précautions, essentiellement concernant l'alimentation doivent être prises pour ne pas contracter la maladie durant la grossesse, et une surveillance sérologique est effectuée tous les mois jusqu'à la fin de la grossesse. En cas de séroconversion, un traitement est administré (spiramycine ou la rovamycine), en attendant un diagnostic plus précis. Cela permet d'éliminer l'infection dans 90% des cas. En France, actuellement, le taux de séroconversion chez une femme enceinte non prémunie est de 1 à 2 %.et malgré les dépistages prénataux obligatoires, on recense encore 2500 cas de toxoplasmose congénitale chaque année.

_ Chez le fœtus et le nouveau-né le parasite est capable de passer la barrière hémato-placentaire, et peut ainsi se retrouver dans le placenta puis dans le système circulatoire du fœtus. Les risques pour le fœtus sont élevés : hydrocéphalie, retard mental, calcification intracrânienne, chorioretinite, ictère et parfois une atteinte de tous les organes. Dans certains cas un avortement tardif ou une mort foetale *in utero* sont possibles. Mais il peut arriver que chez l'enfant la maladie soit inapparente. La transmission parasitaire du placenta au fœtus est plus fréquente en fin de grossesse. Dans le cas d'une primo-infection maternelle en cours de grossesse, la contamination fœtale n'est observée que dans 30 à 40% des cas. La sévérité de l'infection fœtale dépend du nombre et de la virulence des parasites, de l'immaturité immunitaire du fœtus, de l'état du système immunitaire de la mère ainsi que de l'intégrité du placenta (Fricker-Hidalgo et al., 1996). Plus *T. gondii* est transmis tard, moins les lésions sont graves. Les enfants doivent toutefois être traités (pyriméthamine, adiazine, acide folinique) car ces formes stationnaires d'infection peuvent se réactiver plusieurs années plus tard. Une des méthodes de diagnostic de la toxoplasmose congénitale est basée sur l'échographie qui peut révéler une ascite,

une augmentation de volume du foie ou une dilatation des ventricules cérébraux. L'examen du liquide amniotique et surtout du sang du cordon permet un diagnostic plus précoce. Après une grossesse marquée par une suspicion de toxoplasmose, différents examens et traitements sont pratiqués chez l'enfant. La surveillance sérologique s'étend généralement jusqu'au premier anniversaire de l'enfant.

_ Chez les patients séropositifs immunodéprimés suite à un traitement médicamenteux (immunosuppresseurs, chimiothérapie) ou une maladie (cancer, SIDA), la toxoplasmose peut se révéler fatale en l'absence de traitement. Avec l'apparition du SIDA, on observait de nombreux cas d'encéphalites (Figure 4A). Chez les patients séropositifs pour le VIH, l'avènement de la trithérapie a permis de réduire la mortalité jusque 10 à 20%, et 30% pour les séquelles neurologiques. Les lésions principales sont retrouvées dans le système nerveux central puis au niveau oculaire (Figure 4). Dans de rares cas, il est possible que l'infection provoque des pneumopathies ou se généralise. Selon les enquêtes, 12 à 47 % des personnes infectées par le virus du VIH et séropositives pour *T. gondii*, souffrent d'une réactivation parasitaire en l'absence d'un traitement prophylactique efficace (Kasper and Buzoni-Gatel, 1998). En France, le nombre de cas déclarés de toxoplasmose chez les patients atteints du VIH est d'environ 200 par an, après avoir sensiblement diminué entre 1992 (800 cas) et 1997 (250 cas) avec l'avènement des trithérapies (AFSSA, 2005).

La toxoplasmose peut aussi être contractée lors de la greffe d'un organe. Le risque est élevé lors des greffes cardiaques et l'évolution très grave lors de greffes de moelle (Montoya et al., 2001 ; Martino et al., 2000). On estime que 10% des sujets contractant la toxoplasmose lors de la greffe vont développer la maladie (Gallino et al., 1996). Il a été démontré que lors d'une greffe d'organe ou de moelle osseuse, le patient receveur, soumis au traitement immunosuppresseur mis en place pour éviter les épisodes de rejet ou à une irradiation réalisée avant la greffe, peut développer une toxoplasmose lorsque le greffon est issu d'un donneur infecté (Hill and Dubey, 2002).

_ La toxoplasmose oculaire.

Il s'agit de la première infection du segment postérieur de l'œil (Figure 4B). Dans la plupart des cas, la gravité est modérée mais dans un nombre non négligeable de cas le pronostic visuel est engagé. Un ancien dogme considérait que celle-ci découlait d'une infection congénitale mais des observations plus récentes attestent de choroïdo-rétinites dues à une primo-infection chez l'adulte. Pour le diagnostic, l'observation et le prélèvement d'humeur aqueuse puis détection d'anticorps anti-toxoplasme sont nécessaires.

_ Les autres formes de toxoplasmose

Dans de rares cas, des tachyzoïtes vont pouvoir pénétrer dans l'épiderme et entraîner des ulcérations diverses. Il s'agit de la toxoplasmose cutanée. Il a été également décrit que l'infection par *T. gondii* pourrait aussi engendrer un désordre psychiatrique dans certains cas. En effet, la présence de toxoplasme est davantage fréquente chez les patients atteints de schizophrénie, d'anxiété ou de dépression (Kar et Misra, 2004 ; Henriquez et al., 2009). Il semble que le parasite puisse modifier le « comportement » de son hôte en agissant sur la dopamine. Il a d'ailleurs été démontré que les rats infectés par *T. gondii* étaient moins craintifs des chats et que les réflexes de fuite étaient retardés ou altérés. Ils étaient donc préférentiellement ingérés, ce qui permettrait au parasite de se propager et de réaliser un cycle de vie efficace (Berdoy et al., 2000).

En Guyane française, des dizaines de cas de toxoplasmose disséminée, menaçant le pronostic vital, ont été décrites chez des sujets immunocompétents (Grigg et al., 2001 ; Carne et al., 2009). Ces formes sévères, connues localement sous le nom de toxoplasmose « guyanaise » ou « amazonienne », remettent en cause la vision « occidentale » d'une infection toujours bénigne chez l'immunocompétent, liée à un cycle domestique du toxoplasme avec seulement 3 souches clonales. Il s'agit en effet de souches très atypiques, ne suivant pas la classification classique de souches de type I, II et III.



Figure 4. Atteintes cérébrale et oculaire de la toxoplasmose. A : IRM cérébrale d'un patient atteint de toxoplasmose encéphalique. **B :** Chorioretinite consécutive à une toxoplasmose congénitale

c. Immunité contre la toxoplasmose

- Immunité Innée

Après l'ingestion de kystes et la réactivation des parasites en tachyzoïtes, les entérocytes répondent à la pénétration du parasite en sécrétant des cytokines et des chimiokines qui attirent au lieu de l'infection des cellules du système immunitaire et notamment les PMN (neutrophiles, basophiles et éosinophiles). Il y a alors la sécrétion de monoxyde d'azote (NO), d'interleukine- 12 (IL-12), d'interféron- γ (IFN- γ), de tumor necrosis factor- α (TNF- α) engendrée par l'activation de la réponse immune. La réponse immune intestinale vise à limiter la prolifération et la propagation du parasite. Cependant, le parasite va alors pouvoir coloniser les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques présents dans les plaques de Peyer et la lamina propria. Ce processus va permettre au parasite de migrer dans les différents organes tels que la rate, le poumon le foie jusqu'à pénétrer dans le cerveau.

L'infection par les tachyzoïtes induit une réponse de type Th1 par induction de facteurs tels que STAT1 ou STAT4, ce qui entraîne la sécrétion de l'INF γ par les lymphocytes T et CD8+ aboutissant à une activité cytotoxique contre les cellules infectées (Cai et al., 2000 ; Gavrilescu et Denkers, 2003). L'INF γ est également produit par les cellules Natural Killer (NK) et représente un régulateur crucial dans la lutte contre le parasite (Sher et al., 1993 ; Fukao et al., 2001).

Des cofacteurs tels que l'IL-1, l'IL-15, l'IL-18, le TNF α et CD28 agissent en synergie avec l'IL-12 produite par les DC pour permettre la production d'INF γ par les NKs (Denkers et al., 2004).

Lors de l'infection, les macrophages principalement mais aussi les polynucléaires neutrophiles produisent de l'IL12 (Gazzinelli et al., 1993 ; Bliss et al., 1999).

Une cyclophiline parasitaire, la cyclophiline-18 se lie au récepteur à chimiokine CCR5 présent sur les cellules dendritiques (DC). Cette fixation déclenche la production d'IL-12. Les TLR (Toll Like Receptor) interagissent avec différentes structures parasitaires : TLR11 lie la profiline (Yarovinsky et al., 2005) et les complexes TLR2 et TLR1 ou TLR6 ont pour ligand les ancras GPI (Yarovinsky et Sher 2006).

Les mécanismes de la réponse immunitaire surtout INF γ et IL-12 vont limiter l'infection aboutissant à la différenciation du tachyzoïte en bradyzoïte.

Après phagocytose, les macrophages vont présenter les antigènes de *T. gondii* via les CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) à la surface cellulaire et activer les LT CD4+ et CD8+. Les macrophages et les DC vont alors assurer le lien entre immunité innée et adaptative (Denkers et Butcher, 2005)

- Immunité adaptative

Suite à l'infection, l'hôte produit des taux élevés d'IgM et d'IgG grâce à la prolifération des lymphocytes B activés lors de la phase innée (Montoya et Liesenfeld, 2004). Les anticorps produits vont opsoniser les parasites extracellulaires et les conduire à la phagocytose par les macrophages et les molécules du complément entraînent la lyse des parasites (Sibley et al., 1985). Des souris déficientes en lymphocytes B survivent à la phase aiguë de l'infection mais meurent lors de la mise en place de la phase chronique, 3 à 4 semaines après l'infection (Kang et al., 2000). L'impact de la déficience en lymphocytes T a été observé la première fois chez les patients sidéens dépourvus de lymphocytes TCD4+. Des travaux menés sur le modèle murin ont montré que la réponse à long terme est dépendante de la production d'IFN γ produite en grande quantité par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ pour contrôler la réplication des parasites au sein des kystes (Gazzinelli et al., 1992 ; Johnson, 1992 ; Beaman et al., 1994). Ces lymphocytes T sont activés par le CMHII présenté par les DC, les macrophages et les lymphocytes B. Après une seconde stimulation des lymphocytes T, il y a production de l'IL-12 permettant leur prolifération (Villegas et al., 1999). L'IL-12 est donc un élément majeur à la survie de la souris mais aussi au contrôle de l'infection à plus long terme (Khan et al., 1994 ; Villegas et al., 2002). D'autres cytokines comme l'IL-7 et l'IL-15, sont impliquées dans la croissance des lymphocytes T et dans l'immunité à long terme contre le toxoplasme.

II. Ultrastructure de *T. gondii* : une cellule eucaryote parasitaire polarisée

La structure d'un tachyzoïte est à la fois typique des cellules eucaryote mais également très originale (Figure 5). En effet, le parasite *Toxoplasma gondii* est une cellule eucaryote qui possède tous les organites classiques tels que le noyau (haploïde, 80 Mb), une mitochondrie, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi et de nombreux ribosomes. Cependant, cette cellule a évolué vers un mode de réplication parasitaire et a pour cela sélectionné un arsenal d'organites spécifiques pour son pouvoir infectieux ou parasitisme. Ces organites particuliers qui définissent le phylum

Apicomplexa sont situés à l'apex du parasite (pôle par lequel le parasite va pénétrer la cellule hôte) (Figure 5). *T. gondii* est une cellule eucaryote hautement différenciée avec une structure orientée très organisée.

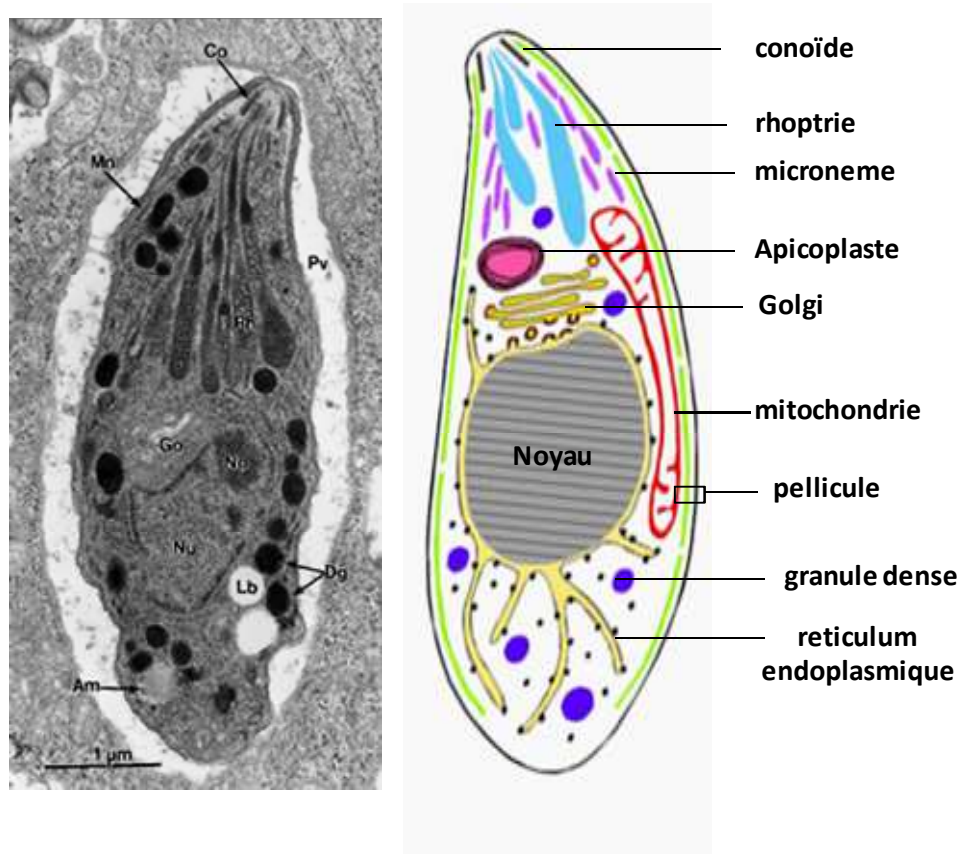


Figure 5. Ultrastructure du tachyzoïte. **A gauche** : image de microscopie électronique d'un tachyzoïte intracellulaire (D'après Dubey et al., 1998) ; Co : conoïde ; Mn : micronème ; Pv : vacuole parasitophore ; Rh : rhoptrie ; Go : Golgi ; No : nucléole ; Nu : noyau ; Lb : corps lipidique ; Dg : granules denses ; Am : amylopectine. **A droite** : Schéma d'un tachyzoïte montrant les principaux organites (adapté de Joiner et Roos, 2002). La pellicule est constituée de la membrane plasmique (noir) et du complexe membranaire interne (vert).

1. Les organites classiques des cellules eucaryotes

Le tachyzoïte dispose d'un noyau contenant un génome haploïde de 61.6 Mb qui sont réparties sur 14 chromosomes dont les tailles varient entre 2 et 8 Mb. L'organisation nucléosomale est analogue à celle des eucaryotes (Meissner and Soldati, 2005 ; Khan et al., 2005). Outre ce génome nucléaire, le parasite dispose de deux génomes extra-nucléaires avec l'apicoplaste, un organe spécifique des

parasites Apicomplexa et la mitochondrie. Le tachyzoïte possède une mitochondrie unique présentant un génome de 6 kb. Le réticulum endoplasmique constitue l'intermédiaire obligatoire des voies de transport et de sécrétions protéiques vers la membrane plasmique et le complexe membranaire interne (CMI), mais aussi vers l'apicoplaste, les micronèmes, les rhoptries et les granules denses (GD) et est le lieu de la synthèse de glycérolipides parasitaires. Le tachyzoïte possède un appareil de Golgi unique simplifié, comprenant 3 à 5 citernes, et situé au-dessus du noyau (Coppens et al., 1999 ; Pelletier et al., 2002).

2. Les organites typiques des parasites Apicomplexa

T. gondii possède plusieurs compartiments spécifiques ou particuliers comme l'apicoplaste, la pellicule présentant trois membranes et le cytosquelette où les microtubules sont extrêmement stables et rigides. Le parasite possède également des organites de sécrétion qui fonctionnent lors de l'invasion selon la séquence suivante: les micronèmes dans la reconnaissance de la cellule hôte, les rhoptries dans la formation de la vacuole parasitophore et la modulation de la réponse immune. Ces deux organites sont localisés au niveau du complexe apical. Enfin, *T. gondii* dispose d'un troisième organe de sécrétion ou les granules denses disséminés dans tout le parasite et qui sont impliqués dans la maturation de la vacuole parasitophore en un compartiment fonctionnel assurant le développement du parasite (Carruthers et Sibley, 1997).

a. L'apicoplaste

L'apicoplaste est un organe uniquement présent chez les parasites Apicomplexes, à l'exception de *C. parvum* (Zhu et al., 2000) est constitué de quatre membranes lipidiques. Il serait le résultat de l'endosymbiose secondaire au cours de laquelle l'ancêtre des parasites Apicomplexa aurait ingéré une algue rouge (Roos et al., 1999). Le génome plastidial est circulaire, mesure 35 kb et contient environ 50 gènes. La majorité des gènes codant des protéines de cet organe a été transférée dans le génome nucléaire au cours de l'évolution. L'apicoplaste n'a plus d'activité photosynthétique mais les fonctions de synthèse d'acides gras et de composés isoprénoïdes sont conservées (McFadden et al., 1996 ; Köhler et al., 1997). Des parasites génétiquement modifiés et dépourvus d'apicoplaste ne sont pas viables (He et al., 2001), ce qui démontre que cet organe a un rôle essentiel dans le développement parasitaire.

b. La pellicule

Le parasite est entouré d'une pellicule de 60 nm d'épaisseur composée d'une membrane externe, une membrane intermédiaire, et une membrane interne (Vivier and Petitprez, 1969).

La membrane plasmique du parasite correspond à la membrane externe (Figure 7, PM : membrane plasmique). Il s'agit d'une bicouche lipidique classique comportant des glycoprotéines ancrées par des groupements glycoposphatidylinositol (GPI) (Tomavo et al., 1989 ; De Macedo et al., 2003). Ces protéines de surface (SAGs : Surface AntiGens) sont impliquées dans l'adhésion initiale du parasite à la cellule hôte lors du processus d'invasion (Mineo and Kasper, 1994), dans la modulation de la réponse immune, dans la virulence de la souche parasitaire et dans la protection du parasite en milieu extracellulaire (Manger et al., 1998 ; Dzierszynski et al., 2000 ; Lekutis et al., 2001 ; He et al., 2002).

Le complexe membranaire interne (CMI) forme les membranes intermédiaire et interne de la pellicule (Figure 7, IMC : complexe membranaire interne).

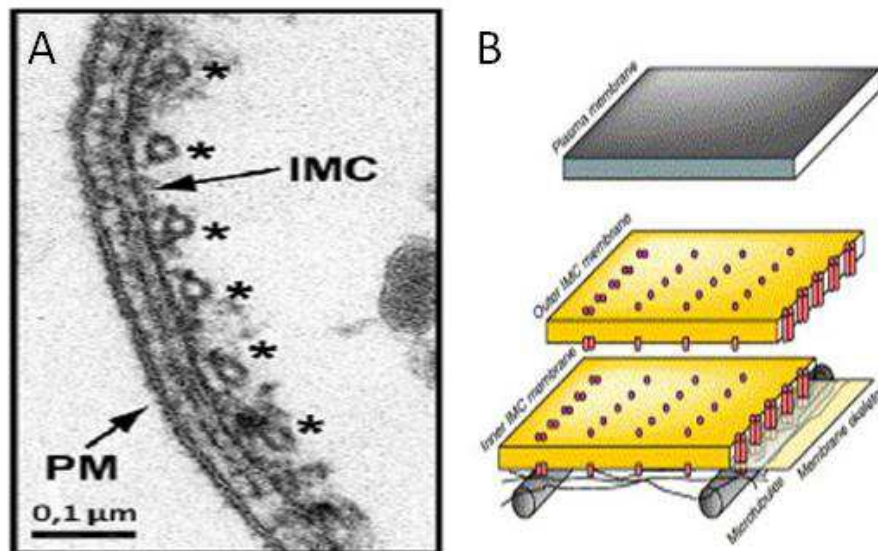


Figure 7. La pellicule de *T. gondii*. **A** : Observation en microscopie électronique d'une coupe transversale de *T. gondii*. IMC : Complexe Membranaire Interne ; PM : Membrane Plasmique ; les astérisques marquent les microtubules sous pelliculaires (d'après Johnson et al., 2007). **B** : Schéma de la pellicule de *T. gondii* présentant les trois membranes : membrane plasmique, membrane externe du CMI et membrane interne du CMI (d'après Keeley et Soldati, 2004)

Il est constitué de saccules aplatis juxtaposés, organisés en plaques longitudinales qui convergent vers l'extrémité postérieure selon un tracé spiralé. Elles constituent un des éléments du squelette membranaire du parasite et jouent un rôle primordial dans la ségrégation des organites lors de la réplication, dans la motilité et l'invasion parasitaire. Le CMI est interrompu à plusieurs niveaux : au niveau apical au dessous du conoïde, au niveau de la partie postérieure arrondie du parasite, et au niveau du micropore, invagination circulaire et latérale de la membrane plasmique qui pourrait être impliquée dans les processus d'endocytose (Nichols et al., 1994). Le CMI est étroitement associé aux microtubules (MT) et au réseau filamenteux sous-pelliculaire sous-jacent. Le réseau sous-pelliculaire est composé essentiellement de protéines TgIMCs et il joue un rôle dans le maintien de la forme parasitaire puis contribue à la motilité du parasite (Mann and Beckers, 2001 ; Morissette and Sibley, 2002 ; Gubbels et al., 2004). La membrane tournée vers le cytoplasme du parasite est en interaction avec les 22 microtubules sous-pelliculaires par l'intermédiaire du réseau filamenteux sous-pelliculaire et des IMPs ou « Inner Membrane Protein » (Figure 7B, en rouge). La face du CMI tournée vers la membrane plasmique permet d'ancrer les éléments du système moteur ou glideosome par le biais de TgGAP50 et TgGAP45 (Gaskins et al., 2004). L'appareil moteur ou « glideosome » est enchassé dans la pellicule du parasite et va permettre la mobilité parasitaire et l'invasion (détaillé dans le paragraphe III).

c. Le cytosquelette cortical

Le cytosquelette du parasite se compose d'un réseau de microtubules corticaux, d'un complexe apical renfermant une structure appelée conoïde, d'un complexe basal et d'un réseau filamenteux sous-pelliculaire. Cette structure est conservée chez les parasites Apicomplexa. Ce cytosquelette cortical sert d'échafaudage à la formation de la pellicule des parasites filles, et son extrême rigidité joue un rôle primordial pour la mobilité du parasite, l'invasion et la prolifération parasitaire (Morrisette et Sibley, 2002 ; Shaw et al., 2001). C'est également le cytosquelette cortical qui assure l'architecture et la polarité du parasite grâce au point d'ancrage que constituent le conoïde et l'anneau polaire apical. Le conoïde a la forme d'un cylindre conique constitué de filaments de tubulines polymérisées qui sont assemblés en proto-filaments de 26 à 30 nm de long enroulés en spirale selon une architecture originale (Hu et al., 2002). Il est limité à l'avant par deux anneaux pré-conoïdaux situés juste sous la membrane plasmique. L'anneau supérieur faisant 160 nm de diamètre et l'anneau inférieur 200 nm. Il

est limité à l'arrière, par un anneau polaire qui est recouvert par l'extrémité antérieure du complexe membranaire interne (Figure 8A).

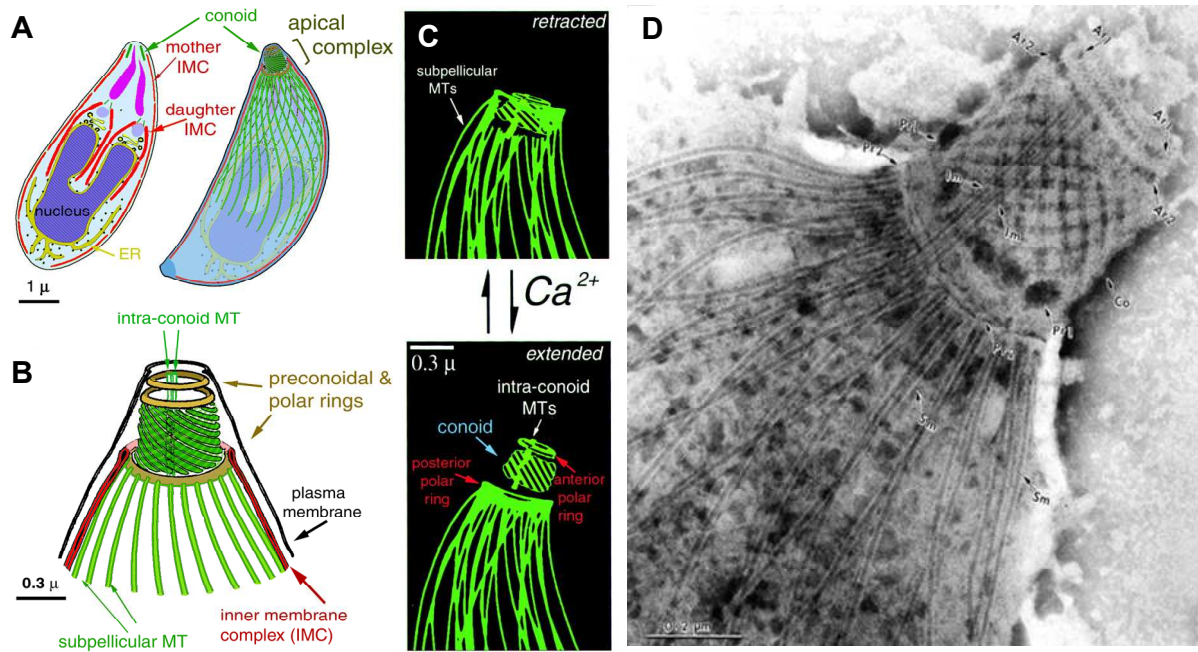


Figure 8. Le complexe apical de *T. gondii*. A et B : Un schéma du complexe apical du toxoplasme (Hu et al., 2006). C : le mécanisme de protrusion/rétractation du complexe apical (Hu et al., 2002). D : microscopie électronique du complexe apical (Dubey et al., 1998). Ar : anneau polaire ; Co : conoïde ; Im : MT internes ; Pr : anneau polaire ; Sm : MT sous-pelliculaire

Les anneaux polaires sont constitués de 6 à 8 microtubules (Dubey et al., 1998). Le conoïde comporte également deux microtubules centraux de 400 nm de long environ, étroitement liés l'un à l'autre. Cette structure rétractile de 250 nm de diamètre effectue des mouvements de protrusion et de rétraction dans l'anneau polaire. L'extrusion du conoïde peut être stimulée par un flux de calcium induit par l'ionomycine et inhibée par un prétraitement par la cytochalasine D qui dépolymérise le cytosquelette d'actine (Hu et al., 2002). 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 notamment : TgDLC1 (Dynein Light Chain, Hu et al., 2006) qui pourrait former une partie du moteur ; TgCAM1-2 (CALcium-binding proteins) qui réguleraient la motilité du conoïde suite à l'influx calcique précédant l'invasion (Mondragón et Frixione, 1996 ; Hu et al., 2006). D'autres protéines impliquées

dans un système moteur, comme les myosines, actine, dynéines et kinésines ont également été identifiées (Hu et al., 2006).

L'anneau polaire apical est constitué des protéines TgMORN1 (Membrane Occupation and Recognition Nexus, Gubbels et al., 2006 ; Hu et al., 2006), Tgcentrine2 (Hu et al., 2006), TgDLC, TgCAM1-2 (; Hu et al., 2006) et TgRNG1 (RING-1 protein, Tran et al., 2010). Cette structure est aussi impliquée dans la biogenèse des cellules filles.

L'anneau polaire postérieur est le centre organisateur (MTOC, Microtubule Organizing Center) circulaire des 22 microtubules sous-pelliculaires disposés à intervalles réguliers. Le MTOC est impliqué dans la synthèse *de novo* des MT au moment de la réplication des parasites.

Les MT s'étendent sur une courte distance vers le cytoplasme à l'avant du parasite et pourrait avoir un rôle dans le transport de vésicules contenant les protéines de micronèmes et/ou de rophies lors de la phase d'invasion du parasite (Nichols et Chiappino, 1987 ; Carruthers et Sibley, 1997). Ils sont composés de 13 proto-filaments de tubulines α et β formant des tubes de 22 nm de diamètre. Ces filaments de tubulines sont associés à l'anneau polaire apical qui est situé sous le conoïde et s'étendent vers le pôle basal du parasite en formant une structure en hélice. Le cytosquelette de microtubules sous-pelliculaires polymérisé lors de la biogenèse du corps des cellules filles sert d'échafaudage à la formation du complexe membranaire interne (CMI) et du réseau filamenteux sous-pelliculaires maintenant en place la forme du parasite (Shaw et al., 2000 ; Gubbels *et al.*, 2006).

Les protéines associées aux microtubules décorent tous les 32 nm les microtubules sous-pelliculaires qui sont connectés au CMI. Ces protéines conféreraient une grande stabilité aux MTs. Elles assureraient également l'interaction entre les microtubules sous-pelliculaires et le CMI (Morrissette et Sibley, 2002).

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

d. Les micronèmes

Les micronèmes sont des organites sécrétoires situés à l'avant du parasite qui ont une forme de petits bâtonnets (0,4 x 0,1 µm). On retrouve entre 50 et 100 micronèmes dans un tachyzoïte. Ils s'associent avec la face cytoplasmique du CMI dans la région apicale. De nombreuses protéines sont localisées dans cet organite : des protéines à domaines adhésines (TgMIC1 à TgMIC16, MIC : MICronème), une protéine possédant un domaine « subtilisin-like serine protease » ou TgSUB1, une protéine impliquée dans la formation de la jonction mobile ou TgAMA1 et une protéine possédant des domaines de type thrombospondine ou TgSPATR pour « Secreted Protein with an Altered Thrombospondin Repeat » (Kawase *et al.*, 2010).

Ainsi, la plupart des MICs contiennent des domaines extracellulaires et des domaines protéiques de type adhésine (Figure 9) : les domaines de type thrombospondine (MIC1 et MIC2), les Von Willebrand A domain/integrin inserted domains (MIC2), les domaines Apple/PAN (MIC4), les domaines EGF-like (MIC3, MIC6, MIC7, MIC8, MIC9 et MIC12), les domaines de type lectine (MIC1, MIC3 et MIC8) (Figure 9).

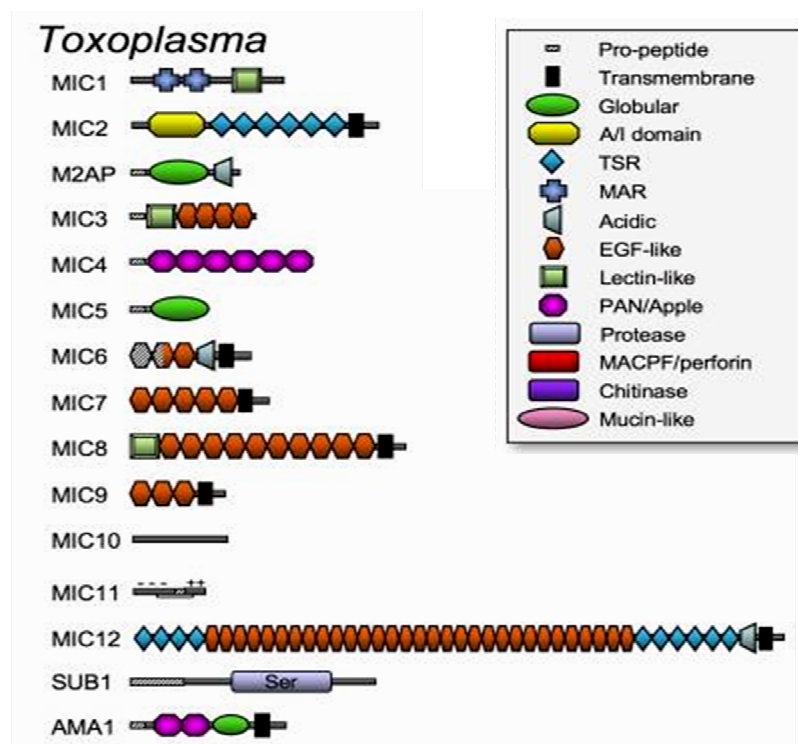


Figure 9. Les protéines de micronèmes et leurs domaines. (D'après Carruthers et Tomley, 2008).

A/I : Von Willebrand A/domaine d'insertion intégrine ; TSR : Thrombospondine ; MAR : micronème adhesive repeat ; PAN : Plasminogen apple, nématode.

Le rôle fonctionnel de ces domaines adhésives a pu être démontré dans les processus d'attachement à la cellule hôte. Par exemple, MIC2 est capable de lier des protéoglycannes héparanes sulfates et la protéine ICAM-1 (Harper *et al.*, 2004 ; Barragan *et al.*, 2005). La protéine MIC1 reconnaît et interagit avec les résidus d'acides sialiques grâce au domaine lectinique (Blumenschein *et al.*, 2007). Le complexe TgMIC3/TgMIC8 semble interagir avec du *N*-acétyl-glucosamine (Cerede *et al.*, 2002 ; 2005). Les protéines TgMIC10 et MIC11 ne possèderaient pas de domaine d'adhésion. Ce sont des protéines solubles, courtes qui ne s'enchâssent pas dans la membrane du parasite au moment de l'invasion et qui auraient un rôle dans l'agencement des complexes protéiques dans les micronèmes.

Les protéines de micronèmes agissent en synergie au moment de l'invasion, les protéines transmembranaires établissant un lien entre la cellule hôte et le moteur acto-myosine situé sous la membrane parasitaire pour permettre la pénétration du parasite à l'intérieur de la cellule hôte (Kappe *et al.*, 1999 ; Jewett and Sibley, 2003).

D'autres motifs sont impliqués dans des interactions protéines-protéines entre différentes protéines de micronèmes, conduisant à la formation de complexes de hauts poids moléculaires. On trouve ainsi des complexes formés de MIC3/MIC8 ; MIC2/M2AP ; et MIC1/MIC4/MIC6. Par exemple, le motif « Galectin-like » présent dans la partie C-terminale de MIC1 permet le repliement de MIC6 et stabilise la conformation de la portion C-terminale (Saouros *et al.*, 2005), ce qui conduit à la formation du complexe protéique (Figure 10) (Reiss *et al.*, 2001).

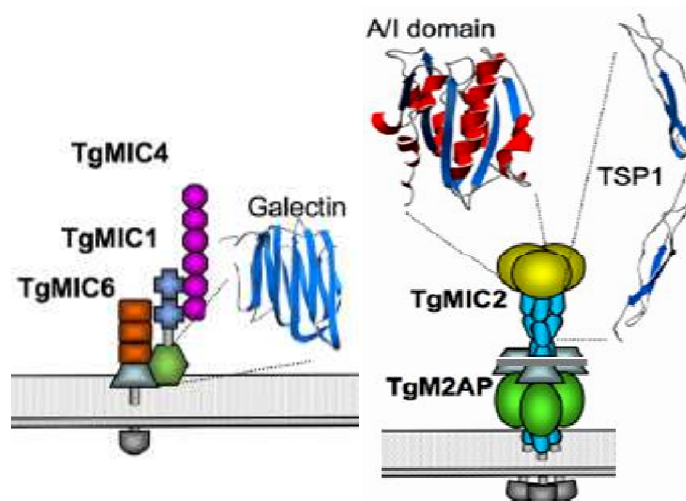


Figure 10. Les complexes de protéines de micronèmes reposent sur la présence de domaines spécifiques (d'après Carruthers et Tomley, 2008). Implication du domaine galectine-like de Mic4 et

des domaines A/I et TSP1 de MIC2 dans la formation des complexes MIC1/4/6 et MIC2/M2AP, respectivement.

Le domaine C-terminal des protéines de micronèmes transmembranaires ont également une importance fonctionnelle majeure puisqu'il permet l'interaction de ces protéines avec le complexe actine-myosine sous-membranaire, impliqué dans la motilité parasitaire et l'invasion. Ces interactions reposeraient notamment sur la présence d'un résidu tryptophane dans l'extrémité C-terminale de la queue cytoplasmique des protéines de micronèmes (Kappe *et al.*, 1999).

On trouve également des protéases parmi les protéines de micronèmes. Les protéases SUB1 et ROM1 sont des sérine-protéases impliquées dans la maturation enzymatique des MICs, qui sont synthétisées sous forme de précurseurs, au cours de leur trafic intracellulaire. Ces clivages protéolytiques interviennent dans la stabilité des complexes de MICs, dans la sécrétion des protéines et dans l'adhésion à la cellule hôte.

e. Les rhoptries

Il y a 6 à 12 rhoptries à l'apex de chaque parasite. Ce sont de gros organites de sécrétion qui présentent une base en forme de bulbe et d'un cou effilé vers l'apex (mesures 2-3 μ m x 0,2 μ m). Leur cou effilé, dense aux électrons, peut fusionner avec la membrane apicale. Les rhoptries possèdent un pH acide, ce qui suggère une origine émanant probablement des voies de sécrétion et d'endocytose (Shaw *et al.*, 1998). On y trouve notamment des hydrolases spécialisées, caractéristiques des lysosomes des peptidases impliquées dans la maturation des protéines. (Que *et al.*, 2002). Les rhoptries sont compartimentalisées avec une absence apparente de membranes internes détectables. Les protéines RONS (RhOptry Neck proteins) sont contenues dans le cou des rhoptries, la partie apicale, et les protéines ROPs (RhOptry Proteins) sont contenues dans le bulbe des rhoptries. Le mécanisme de compartimentalisation est encore mal compris. Depuis les premières études, une multitude de protéines de rhoptries ont été observées dans le bulbe des rhoptries contre 5 dans le cou (Leriche and Dubremetz, 1991 ; Bradley *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, le nombre de protéines de rhoptries est en constante augmentation et outre les protéines ROP et RON, on retrouve d'autres kinases, des phosphatases, ou encore des protéines comme rab11 ou la toxofiline (Bradley *et al.*, 2005 ; Boothroyd et Dubremetz, 2008). Les protéines de rhoptries jouent un rôle dans l'établissement

de la vacuole parasitophore tandis que d'autres serviraient à détourner ou contrôler certaines fonctions biologiques de l'hôte (voir paragraphe III). Les rhoptries sont synthétisées via un organe intermédiaire, la pré-rhoptrie dans laquelle se déroule notamment un clivage protéolytique des protéines de rhoptries. Cette étape qui est cruciale pour la maturation des protéines de rhoptries et par conséquent à la formation d'un organe fonctionnel (Shaw et al., 2002) résulterait en outre de l'action de «cathepsin B-like protease» ou Toxopain-1 et la «subtilisine-like» ou TgSUB2 (Que *et al.*, 2002 ; Miller *et al.*, 2003).

Toutes les protéines de rhoptries possèdent un peptide signal, un prodomaine, et beaucoup présentent au moins un domaine transmembranaire potentiel ou une ancre GPI, ce qui suggère une association avec les membranes. Plusieurs ROPs et de RONS présentent des domaines répétés qui pourraient être impliqués dans des interactions protéines-protéines.

Les membres actuellement caractérisés de la famille de ROP2 (Figure 11) présentent des domaines kinases au niveau de leur région C-terminale, mais seules ROP16, ROP17, ROP18 et ROP2L4 ont conservé la boucle glycine et le résidu acide aspartique, qui sont critiques pour l'activité phosphotransférasique. ROP16, ROP17 et ROP18 possèdent une activité kinase *in vitro* (El Hajj *et al.*, 2007 ; El Hajj *et al.*, 2006; Ong et al., 2010).

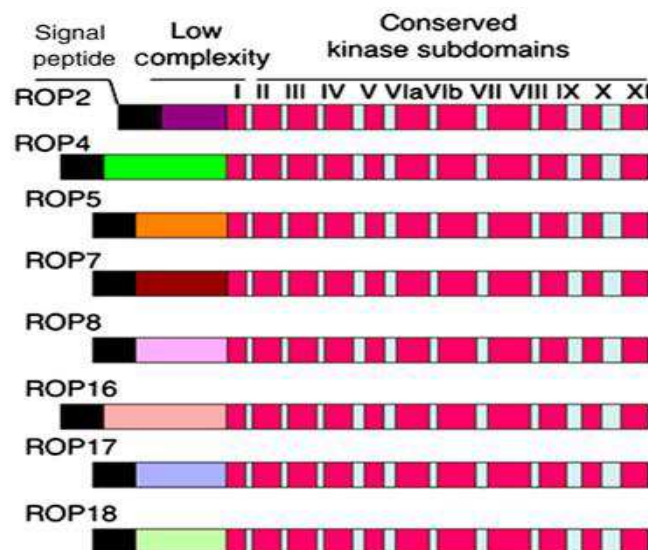


Figure 11. Organisation des protéines de la famille ROP2 (D'après Qiu et al., 2009)

Des « expériences kinases » en présence de P32 ont ainsi montré l'autophosphorylation de ROP16 et cette protéine est capable de phosphoryler des substrats de la cellule hôte (Ong et al., 2010).

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

Les rhoptries de *T. gondii* contiennent aussi une fraction lipidique, composée majoritairement de cholestérol et de phospholipides parmi lesquels la phosphatidylcholine (Foussard *et al.*, 1991). Lors du relargage des rhoptries, la sécrétion des lipides faciliterait la formation de la membrane de la vacuole naissante. Des études plus récentes suggèrent que le cholestérol contenu dans la membrane de la vacuole parasitophore provient majoritairement de la cellule hôte et que la contribution parasitaire bien que mineure, pourrait être essentielle à la formation de la vacuole parasitophore (Coppens and Joiner, 2003, Coppens, 2006).

f. Les granules denses

Les granules denses (GD) sont des structures sphériques de 200 nm de diamètre, denses aux électrons en microscopie électronique. On dénombre environ 15 GD par tachyzoïte, dispersés dans l'ensemble du cytoplasme.

La plupart des protéines GRA possèdent un peptide signal et un domaine transmembranaire de type I entouré par deux domaines hydrophiles. Les GRA ne présentent pas d'homologie de séquences avec d'autres protéines connues. Il y a 12 protéines GRA dans les GD (GRA1-GRA14 mais avec GRA11 et GRA13 dites « phantom-like » ; Ho-Woo Nam, 2009). On retrouve dans cet organite également deux nucléotide-hydrolases (Bermudes *et al.*, 1994 ; Sibley *et al.*, 1994 ; Asai *et al.*, 1995), deux inhibiteurs de protéases (Pszenny *et al.*, 2000 ; 2002 ; Morris *et al.*, 2002 ; Morris et Carruthers, 2003) et une peptidyl-prolyl isomérase (High *et al.*, 1994 ; Carey *et al.*, 2000).

Les protéines GRA représentent un groupe de petites protéines (21 à 41 k Da), qui présentent toutes un peptide signal N-terminal. Les protéines des GD sont secrétées dans la vacuole parasitophore une

fois celle-ci refermée autour du parasite (Carruthers et Sibley, 1997). Certaines protéines de granules denses sont impliquées dans la maturation de la vacuole parasitophore, dans le recrutement de nutriments au sein de la cellule hôte ou dans le déclenchement de la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, la sécrétion des GD intervient en deux temps, tout d'abord sous forme d'un pulse de sécrétion au moment de l'invasion, puis de manière continue pendant le développement intracellulaire du parasite. La sécrétion de ces organites ne peut-être déclenchée par le Ca^{2+} . La sécrétion des GD présente donc des traits caractéristiques à la fois d'une sécrétion régulée et d'une sécrétion constitutive.

En effet, il existe un débat quant au type de sécrétion réalisé par les GD entre voie de sécrétion constitutive et régulée. Dès 1998, il était démontré que n'importe quelle protéine soluble présentant un signal peptidique classique des protéines GRA était adressée vers la vacuole parasitophore via les GD (Karsten *et al.*, 1998). Une protéine soluble dont certains motifs d'adressage ont été mutés est redirigée via les GD dans la vacuole parasitophore (Striepen *et al.*, 2001 ; Bradley *et al.*, 2001). Par ailleurs, le délai très bref de la sécrétion des GD à la fin de la formation de la vacuole suggère un mécanisme régulé (Dubremetz *et al.*, 1993 ; Carruthers et Sibley, 1997).

La sécrétion des protéines GRA se fait par fusion de la membrane des GD avec la membrane plasmique, grâce à l'action de protéines GTPases de la famille Rab ainsi que d'autres facteurs solubles (Chaturvedi *et al.*, 1999). On suppose qu'il existe des interruptions du CMI au niveau sub-apical, qui permettraient l'accès et la fusion des GD avec la membrane plasmique du parasite (MPP) (Leriche and Dubremetz, 1990 ; Dubremetz *et al.*, 1993).

La sécrétion des protéines GRA coïncide avec des changements structuraux de la vacuole. Il y a en effet l'établissement d'un réseau membranaire formant des nanotubes présents dans l'espace entre les parasites et la membrane de la vacuole parasitophore. Ce réseau permet de connecter les parasites à la membrane interne de la vacuole parasitophore, et d'établir des liens entre eux. La majeure partie des protéines GRA est associée au réseau membranaire, soit au niveau des tubules membranaires (TgGRA2/TgGRA4/TgGRA6, Labruyere *et al.*, 1999 ; Mercier *et al.*, 2002), soit au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore et des extensions vers le cytoplasme de la cellule hôte (TgGRA3/TgGRA5/TgGRA7/TgGRA8, Mercier *et al.*, 2005).

g. La vacuole parasitophore

L'interaction du parasite avec la cellule hôte est suivie de sa réorientation apicale puis de la décharge du contenu des rhoptries. La pénétration du parasite dans la cellule hôte s'accompagne de manière concomitante à la formation d'une vacuole parasitophore (VP). La VP qui dérive initialement de la membrane de la cellule hôte est alors modifiée par le parasite de telle manière qu'elle se retrouve exclue du trafic membranaire intracellulaire de la cellule. Après l'invasion, l'interaction métabolique avec la cellule hôte s'effectue par des pores présents dans la membrane vacuolaire, laissant diffuser les molécules de taille inférieure à 1200 daltons (Schwab et al., 1994). L'endocytose de macromolécules n'a jamais pu être formellement observée chez *T. gondii* comme chez les autres parasites Apicomplexa. La vacuole parasitophore (VP) n'est pas un organe à proprement parlé mais constitue un compartiment à part entière formé lors de la pénétration du parasite dans la cellule hôte. Cette structure particulière est indispensable à la survie et à la réplication du parasite. La VP peut être divisée en trois sous-compartiments membranaires distincts, chacun ayant une fonction différente. La membrane de la VP est prolongée par de longues et fines extensions vers le cytoplasme de la cellule hôte, qui sont impliquées dans le recrutement des organites de la cellule hôte. Le second compartiment consiste en une structure appelée «Host Organelle Sequestering Tubulo structures » ou HOSTs qui sont des invaginations de la membrane de la VP vers l'intérieur de celle-ci. Cette structure particulière serait impliquée dans le recrutement d'endolysosomes de la cellule hôte, riches en cholestérol (Coppens et al., 2006). Le dernier compartiment regroupe le réseau nanotubulaire membranaire qui s'étend à l'intérieur de la VP et permet de relier les parasites entre eux et à la membrane de la VP (Magno et al., 2005 ; Lemgruber et al., 2008).

La vacuole est également impliquée dans le recrutement de certains organites de la cellule hôte, comme le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Jones et Hirsch, 1972). Elle contribue par ailleurs au recrutement de nutriments provenant du cytoplasme de la cellule hôte, nécessaire au développement du parasite.

III. Le parasitisme par *T. gondii* : les rôles majeurs des micronèmes et des rhoptries

Le parasitisme par *T. gondii* repose sur un enchainement rapide de mécanismes impliquant diverses protéines parasitaires surtout localisées à l'apex du parasite. Les micronèmes et rhoptries font partie de la structure apicale caractérisant les parasites Apicomplexa (Figure 12) et dont la sécrétion représente la clé de la virulence d'un parasite apicomplexe.

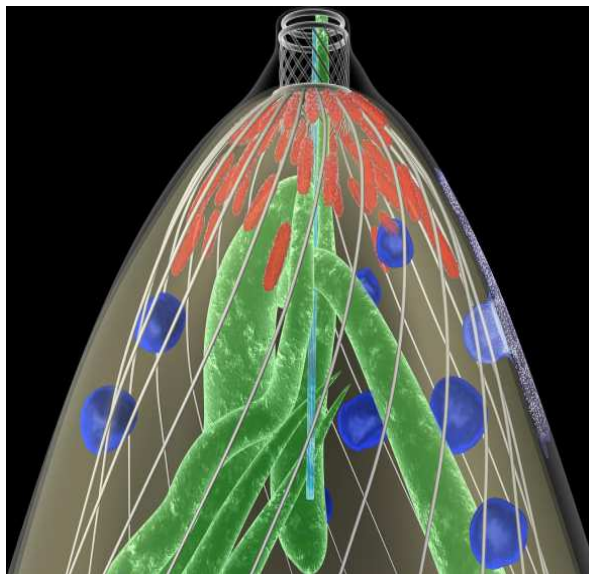


Figure 12. Reconstruction 3D du complexe apical de *T. gondii* (Paredes-Santos et al., 2011). On retrouve le conoïde et les anneaux polaires à l'apex (en gris) desquels émanent les microtubules (MT) en hélices vers l'arrière du parasite. Les rhoptries (vert) qui pénètrent dans la protrusion ainsi que les micronèmes (rouge) et les GD (bleu) sont visibles.

La libération du contenu de ces organites est un phénomène très rapide qui dure moins de trente secondes et doit être orchestrée de manière fine mais nécessitant également des signaux initiés par l'entrée en contact avec la cellule hôte. Afin d'instaurer ce contact avec la cellule hôte, le parasite va se mouvoir puis s'attacher à la cellule via les protéines de surface. Ces étapes qui précèdent la sécrétion des organites apicaux vont permettre la réorientation du parasite et la formation d'une jonction mobile ou jonction serrée que le parasite va utiliser pour pénétrer de façon active dans la cellule.

1. La sécrétion des micronèmes et des rhoptries

Contrairement aux granules denses, il a été clairement établi que les rhoptries et les micronèmes opèrent une sécrétion régulée de manière très précise.

_la sécrétion des micronèmes

Après contact avec la cellule hôte par l'intermédiaire des protéines de surface, la sécrétion des protéines de micronèmes est initiée. Les micronèmes fusionnent alors avec le cou des rhoptries, ce qui permet la libération des protéines de micronèmes dans l'espace extracellulaire (Carruthers et al., 1999 ; Alexander et al., 2005). Il s'agit d'une sécrétion régulée, dont on peut mimer l'effet expérimentalement grâce à l'ionophore de calcium A23187 ou à l'ionomycine. Ce stimulus déclenche la sécrétion des organites en absence de cellules hôtes et induit la sortie des parasites intracellulaires, ce qui indique que la sécrétion régulée des micronèmes est également contrôlée par une voie calcium-dépendante (Carruthers et al., 1999). L'entrée de calcium extracellulaire dans le parasite n'est pas requise pour la sécrétion des protéines de micronèmes (Lovett and Sibley, 2003) car l'augmentation de calcium intra-parasitaire observée lors de l'invasion aurait pour origine des réservoirs internes de calcium au sein du parasite.

Les Apicomplexa possèdent de nombreux réservoirs calciques, tels que le réticulum endoplasmique (RE), les mitochondries et les acidocalcisomes. L'activation de la sécrétion des protéines de micronèmes par la thapsigargine, qui empêche la séquestration du calcium intracellulaire dans le RE, montre que *T. gondii* utilise le RE comme réserve de calcium intracellulaire (Carruthers et Sibley, 1999). L'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et des canaux calciques de la famille des récepteurs IP3/ryanodine, également présents chez les vertébrés à la membrane du RE, semblent être aussi impliqués dans la libération de calcium intra-cellulaire lors de l'invasion (Lovett et al., 2002). L'implication des acidocalcisomes dans la libération du calcium nécessaire à la sécrétion des protéines de micronèmes a également été décrite (Luo et al., 2005 ; Bottova et al., 2010).

Le relargage de Ca^{2+} active la myosine et entraîne la sécrétion des micronèmes indispensables à la motilité et à l'invasion. Deux kinases dépendantes du calcium qui sont indispensables à la sortie des parasites ont été caractérisés chez *Toxoplasma* (TgCDPK1) et *Plasmodium* (PfCDPK5) (Dvorin et al., 2010 ; Lourido et al., 2010). La sécrétion des micronèmes est également inhibée par l'addition d'un

inhibiteur de kinases (Dobrowolski et al., 1997, Carruthers et al., 1999). En particulier, l'activité d'une protéine kinase dépendante du GMP cyclique (PKG) est nécessaire dans les étapes ultérieures à l'augmentation de calcium (Donald et al., 2002 ; Wiersma et al., 2004).

En résumé, l'exocytose des micronèmes est donc contrôlée par une voie calcium-dépendante, impliquant la phosphorylation de protéines.

Une protéine DOC2 (Double C2 domaine) a récemment été décrite comme étant essentielle à l'exocytose chez les parasites Apicomplexa (Farrell et al., 2012). Cette protéine possède deux domaines C2 en tandem. Ces domaines sont connus pour lier le calcium et également les phospholipides. Dans d'autres modèles, comme dans les cellules neuronales, DOC2 agit comme un senseur du Ca^{2+} pour permettre l'exocytose (Yao et al., 2011 ; Xue et al., 2011). Elle va induire, après la liaison au calcium, la fusion des vésicules avec la membrane plasmique en favorisant l'interaction du complexe NSF/SNAP/SNARE. Ce complexe NSF/SNAP/SNARE et ses fonctions seront également discutés dans le paragraphe IV ; Friedrich et al., 2010 ; Groffen et al., 2010).

La sécrétion des rhoptries

L'attachement initial du parasite à la cellule hôte induit la sécrétion des rhoptries par fusion avec la membrane antérieure (Nichols et al., 1983 ; Perkins, 1991 ; Dubremetz, 2007). En effet, il a été démontré qu'en l'absence de la protéine AMA1, impliquée dans l'attachement du parasite, l'exocytose des protéines de rhoptries était réduite (Mital et al., 2005). L'attachement intime à la cellule hôte serait donc requis pour permettre la sécrétion efficace du bulbe des rhoptries. Il semble que les ROPs et les RONS soient libérées de façon simultanée, après la sécrétion des protéines de micronèmes (Lebrun et al., 2005). Le contact avec la cellule hôte est initialement établi de manière transitoire par des antigènes de surface du parasite (He et al., 2002). Ce contact déclenche la sécrétion des micronèmes à la surface du parasite, par le biais du cou des rhoptries avec lequel elles fusionnent (Carruthers et al., 1999, Alexander et al., 2005). Les protéines RONS et ROPs sont alors sécrétées pour former la jonction mobile permettant la pénétration active du parasite dans la cellule (RONS) et la formation immédiate de la vacuole parasitophore (ROPs).

2. Le trafic post-sécrétoire des protéines de micronèmes et de rhoptries

La vacuole parasitophore (VP) de *T. gondii* est composée de différents systèmes membranaires : la membrane plasmique du parasite ; un Réseau de Nanotubules Membranaires (RNM), présent dans tout l'espace de la vacuole permettant de relier les parasites entre eux et à la membrane de la VP (Magno *et al.*, 2005 ; Lemgruber *et al.*, 2007) ; la membrane de la VP, délimitant la vacuole du cytoplasme de la cellule hôte et l'espace immédiat autour de la membrane de la VP qui forme d'une part des extensions dans le cytoplasme de la cellule hôte et d'autre part des invaginations dans la vacuole. Ces invaginations de la membrane de la VP vers l'intérieur de la VP constitue la structure HOSTs ou «Host Organelle Sequestering Tubulo structures » qui serait impliquée dans le recrutement d'endolysosomes de la cellule hôte, riches en cholestérol (Coppens *et al.*, 2006).

Après sécrétion par le parasite, les protéines peuvent être adressées dans n'importe quel compartiment vacuolaire ou même dans la cellule hôte, on parle alors de protéines effectrices par homologies à ce que l'on retrouve chez les bactéries avec les systèmes de sécrétion.

La majorité des protéines de micronèmes transmembranaires sont de type I c'est-à-dire des protéines qui n'ont qu'un seul domaine transmembranaire. Ainsi, ces protéines sécrétées lors de l'invasion s'enchaîneraient dans la membrane plasmique du parasite exposant leur domaine N-terminal vers l'extérieur et leur domaine C-terminal vers le parasite afin d'interagir avec le moteur acto-myosine (Sibley, 2003 ; Keeley and Soldati, 2004 ; Soldati et Meissner, 2004). La pénétration du parasite entraînerait ensuite une redistribution des protéines MIC au pôle postérieur du parasite. Afin de permettre une fermeture de la vacuole parasitophore, les protéines de micronèmes sont clivées au niveau de leur domaine transmembranaire (TM). Des travaux sur MIC2 ont en effet démontré qu'une mutation du domaine TM de cette protéine empêchant la protéolyse de celle-ci bloque l'entrée dans la cellule (Brossier *et al.*, 2003). L'activité protéolytique impliquée a été dénommée MPP1 pour « Microneme Protease Activity 1 ».

L'activité MPP1 aurait en fait plusieurs rôles : 1) moduler la présence des adhésines de surface du parasite pour empêcher la génération par l'hôte d'anticorps neutralisants ; 2) aider à la réorientation du parasite lors de l'invasion en participant à la formation du gradient de protéine de micronèmes à la surface du parasite ; 3) permettre le désengagement du parasite pour la fermeture de la vacuole à la fin de l'invasion. Il a été montré que MPP1 est capable de cliver MIC2, MIC6, MIC12 et AMA1

(Brossier et al., 2003 ; Howell et al., 2005 ; Opitz et al., 2002 ; Zhou et al., 2004) et l'activité protéase est en réalité portée par des sérine protéases de type rhomboïde chez *T. gondii* et les autres apicomplexes (Dowse et al., 2005 ; Brossier *et al.*, 2005 ; Baker et al., 2006). Ces protéines rhomboïdes constituent un vaste champ d'étude aujourd'hui. A titre d'exemple, il est connu dorénavant que la protéine ROM1 est localisée dans les micronèmes ou que TgROM4 est essentielle au clivage de MIC2, AMA1 et MIC3 (Buguliskis et al., 2010). Les rhomboïdes pourraient également jouer un rôle important dans la voie de sécrétion des rhoptries (Santos al., 2012).

La protéine RON2 va s'insérer dans la membrane de la cellule hôte lors de l'invasion et interagit avec les autres RONs présents à proximité du côté cellulaire. Des vésicules dérivées des rhoptries sont libérées dans la vacuole parasitophore en formation. Ces vésicules contiennent des composants lipidiques et certaines protéines de rhoptries (Saffer *et al.*, 1992 ; Beckers *et al.*, 1994 ; Carey *et al.*, 2004 ; El Hajj *et al.*, 2006). En microscopie électronique, on observe que les protéines de la famille ROP2 forment des agrégats au niveau de la MVP, ce qui laisse supposer que ces protéines sont organisées en complexes supra-moléculaires pouvant être impliqués dans l'acquisition de nutriments (Schwab *et al.*, 1994). Les propriétés de l'insertion de ROP2 dans la MVP font actuellement débat et nécessite d'être revisitée. En effet, jusqu'à récemment un domaine transmembranaire était prédit au sein de cette protéine qui exposerait alors son domaine N-terminal dans le cytoplasme de la cellule hôte afin de recruter les mitochondries cellulaires. Cependant, la structure par cristallographie a remis en cause cette prédiction (Labesse et al., 2009). ROP2 serait en fait capable de s'insérer dans la membrane par un domaine de liaison membranaire à hélice situé du côté N-terminal (Reese et Boothroyd, 2009). A l'inverse de ROP2 et ROP4, ROP5 est insérée dans la MVP avec son extrémité C-terminale exposée dans le cytoplasme de la cellule hôte (El Hajj *et al.*, 2007). Certaines protéines de rhoptries, comme la protéine ROP16 sont sécrétées jusque dans le noyau de la cellule hôte (Figure 13) grâce à une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) (Saeij et al., 2007).

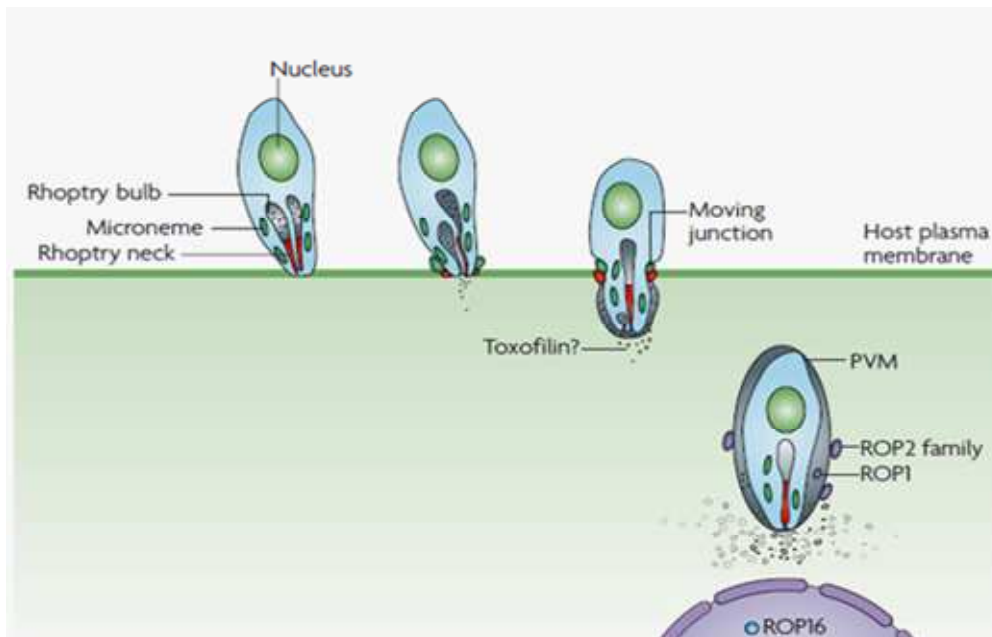


Figure 13. Invasion et devenir des protéines de rhoptries (adapté de Boothroyd et Dubremetz, 2008). Après sa réorientation, le parasite sécrète les protéines de micronèmes et du cou des rhoptries qui vont s'insérer dans la membrane du parasite et dans celle de la cellule hôte pour former la jonction mobile. La VP est alors formée avec la sécrétion des rhoptries qui auront quatre destinations possibles : la lumière de la VP, la MVP, le cytoplasme et le noyau de la cellule hôte.

D'autres protéines comme ROP18 ou ROP38 sont localisées majoritairement dans le cytoplasme de la cellule hôte (Taylor et al., 2006 ; Peixoto et al., 2010) (Figure 13). Des modifications post-traductionnelles telles que la myristoylation ou la palmitoylation présentes du côté N-terminal des protéines de rhoptries joueraient un rôle capital dans l'adressage de celles-ci à la membrane de la vacuole (Cabrera et al., 2012)

3. La motilité parasitaire : les micronèmes et le «glideosome»

L'invasion et la multiplication des parasites dépendent majoritairement de l'action des protéines de micronèmes et de rhoptries ainsi que de leur sécrétion effective puis de leur localisation. Les parasites Apicomplexa ne possèdent ni pseudopodes, ni cils ou flagelles. Ils ont donc développé un système de locomotion dépendant d'un substrat extra-parasitaire pour atteindre la cellule hôte. Le mécanisme de motilité par glissement de *T. gondii*, ou «gliding», fait intervenir un complexe moteur actine/myosine spécifique des Apicomplexa, localisé entre la membrane externe du complexe membranaire interne et la membrane plasmique du parasite (Gaskins et al., 2004).

La motilité et l'invasion du parasite résultent de l'action d'un complexe protéique nommé «glideosome» (Opitz et Soldati, 2002). Il s'agit d'un complexe multiprotéique formé par les protéines TgGAP50, TgGAP45, TgGAP40, TgMLC1 et TgMyoA (Herm-Götz et al., 2002 ; Gaskins et al., 2004 ; Frénel et al., 2010). Le glideosome permet de faire le lien entre le cytosquelette du parasite (ancrage dans le CMI) et les adhésines de surface par le biais des filaments d'actines et de l'aldolase, une enzyme glycolytique. Le complexe MIC2-M2AP joue un rôle prépondérant dans la motilité parasitaire. Le complexe TgMIC2/TgM2AP est assemblé dans l'appareil de Golgi avant d'être transporté aux micronèmes. Une fois sécrété, le complexe TgMIC2/TgM2AP est ancré dans la membrane du parasite via le domaine transmembranaire de MIC2 (Jewett et Sibley, 2004) (Figure 14).

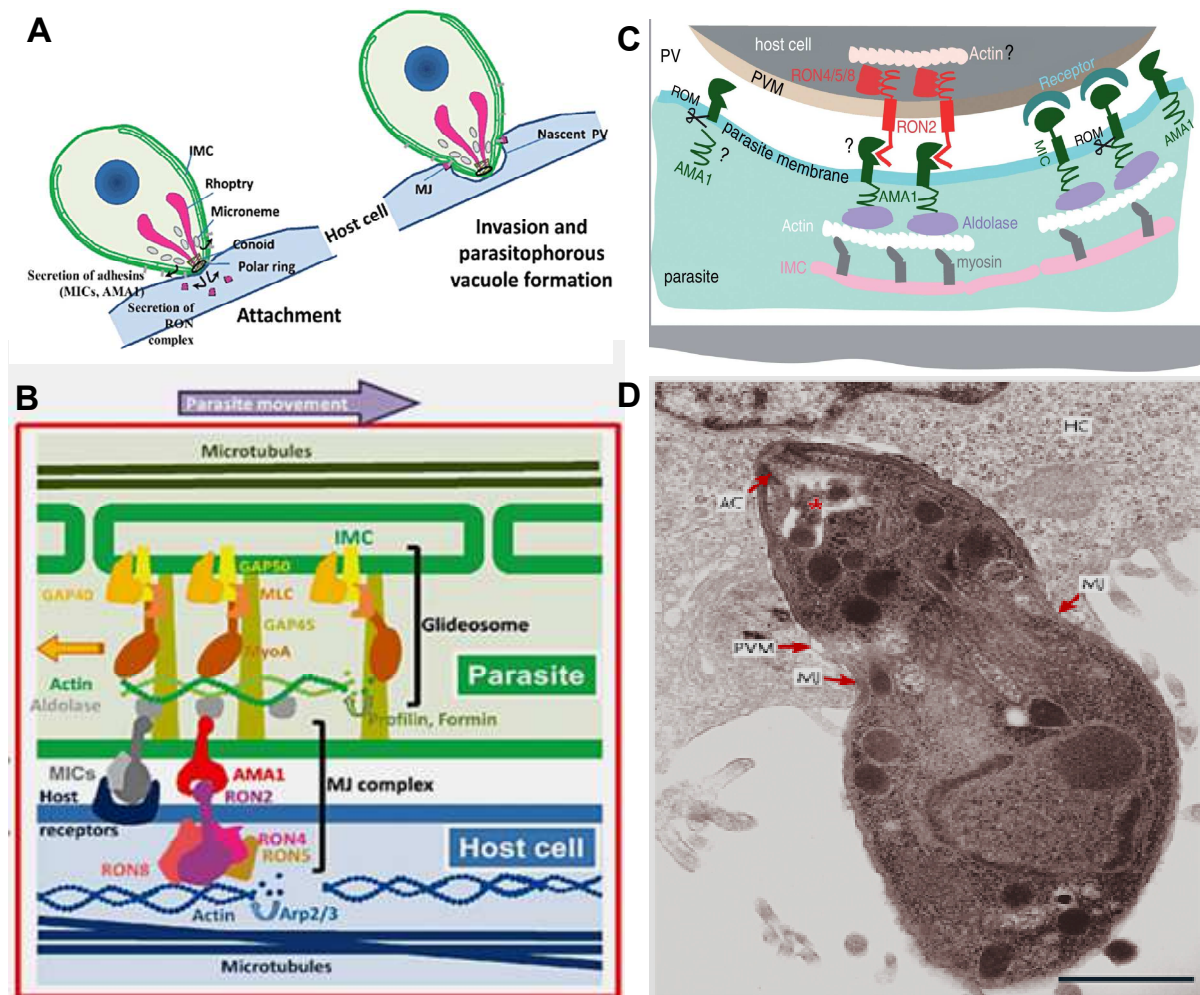


Figure 14. La jonction serrée de *T. gondii*. **A** Attachement du parasite grâce aux adhésines (protéines MICs et AMA1) qui déclenche la sécrétion des RONs entraînant la formation de la jonction serrée (d'après Besteiro et al., 2011). **B** : Schéma détaillé de la jonction serrée (Besteiro et al., 2011). **C** : Clivage protéolytique des adhésines parasites par les rhomboïdes (d'après Shen et Sibley,

2012). **D** : Image de microscopie électronique de la jonction mobile (MJ). HC : cellule hôte ; PVM : membrane de la vacuole parasitophore ; AC : complexe apical.

La sécrétion à un niveau basal de ce complexe TgMIC2/TgM2AP permettrait au parasite de produire le glissement circulaire, et la sécrétion des micronèmes suite à un influx calcique permettrait d'établir les deux autres mouvements, le glissement hélicoïdal et le tournoiement (Huynh et Carruthers, 2006). Chez *P. falciparum*, la protéine TRAP (homologue de TgMIC2) interagit avec les glycosaminoglycannes et la protéine TgMIC2 recombinante interagit avec l'héparine (McCormick et al., 1999 ; Menard, 2001 ; Harper et al., 2004). Dans le parasite, TgMIC2 interagit par l'intermédiaire du domaine cytoplasmique avec l'aldolase, une enzyme glycolytique qui fournit l'énergie sous forme d'ATP (Figure 14B) (Jewett et Sibley, 2003 ; Bosch et al., 2007).

Les filaments d'actines polymérisés interagissent d'une part avec l'aldolase et d'autre part avec MyoA et MLC1. Les protéines GAP40, GAP45 et GAP50 permettent ensuite d'ancrer ce complexe au niveau de la membrane externe du CMI (Figure 14B). MyoA et MLC1 induisent le déplacement des adhésines et des filaments d'actines dans un mouvement allant du pôle antérieur au pôle postérieur. Les N-glycans de TgGAP50 ont été décrits comme nécessaires à la conformation et au trafic de la protéine au CMI et jouent donc un rôle dans la motilité parasitaire et l'invasion des cellules hôtes (Fauquenoy et al., 2011).

4. Implications des MIC et des RON dans la formation de la jonction serrée ou mobile

La pénétration active de la cellule par le parasite, c'est-à-dire l'invasion proprement dite nécessite la formation d'une structure particulière : la jonction serrée (Figure 14).

Le contact entre le parasite et la cellule hôte entraîne une légère dépression de la membrane plasmique de cette dernière jusqu'à ensuite former un anneau faisant la jonction avec le parasite. Cette jonction est formée par la protéine majeure AMA1 des micronèmes (Donahue et al., 2000 ; Hehl et al., 2000 ; Alexander et al., 2005) et celles du cou des rhoptries RON2, RON4, RON5 et RON8 (Alexander et al., 2005 ; Lebrun et al., 2005 ; Straub et al., 2009) (Figure 14B). La protéine AMA1 est ancrée dans la membrane parasitaire et est en contact avec le reste de la jonction mobile (RONs) qui sont enchâssées dans la membrane de la cellule hôte, par l'intermédiaire de RON2 (Besteiro et al., 2009) (Figures 14B et 14C). Il y a une interaction directe entre RON2 et AMA1 révélée par co-cristallisation et cette interaction est critique pour l'invasion parasitaire chez *T. gondii* mais également

chez *Plasmodium* (Lamarque et al., 2011 ; Tonkin et al., 2011). RON2 permettrait également l'interaction de la jonction mobile avec le cytosquelette de la cellule infectée. La jonction ainsi formée sert d'appui au parasite pour pénétrer la cellule l'hôte et pour la formation de la vacuole parasitophore naissante. La jonction n'est en fait pas mobile et le parasite utilise plutôt l'anneau contractile afin de se « glisser » à l'intérieur de la cellule l'hôte grâce au complexe glideosome. Lors de la sortie du parasite de la cellule hôte, une jonction serrée est également mise en place sans le concours de la protéine AMA1. Une étude a montré que l'absence de MIC8 provoque une incapacité à former une jonction mobile. Le complexe MIC3/MIC8 serait donc également impliqué dans la formation de la jonction serrée (Kessler et al., 2008). Il faut également noter que certaines protéines RONs n'existent que chez certains Apicomplexa. L'existence dans le parasite de telle ou telle protéine RON pourrait être le reflet d'un mode d'invasion ou d'une cible spécifique à infecter. Ainsi, le complexe RON8/9 récemment décrit chez *T. gondii* pourrait jouer un rôle important pour le toxoplasme au niveau de l'épithélium intestinal (Lamarque et al., 2012).

Il a été également décrit que des protéases, TgMPP1 et TgMPP2 (Micronemal Protein Protease 1), interviendraient dans le clivage du domaine transmembranaire de TgMIC2 lors de l'invasion des cellules hôtes (Carruthers et al., 2000 ; Opitz et al., 2002 ; Howell et al., 2005). Ces protéines présentent des homologies avec les protéases rhomboïdes, localisées au niveau des membranes plasmiques, capables de cliver leur substrat à l'intérieur du domaine transmembranaire (Figure 14C). TgROM4 (Rhomboïd) clive TgMIC2 à l'intérieur du domaine transmembranaire et TgROM5 est nécessaire au clivage final de toutes les adhésines de surface à la fin du processus d'invasion (Buguliskis et al., 2010). La subtilisine TgSUB1, présente dans les micronemes, est aussi impliquée dans le clivage du complexe TgMIC2/TgM2AP qui est ancré à la surface du parasite (Lagal et al., 2010). Les adhésines vont être majoritairement concentrées au niveau de l'apex du parasite, ce qui est crucial pour la réorientation du parasite lors de l'invasion.

5. Les rhoptries et la formation de la vacuole parasitophore

La sécrétion des protéines de rhoptries constitue l'étape clé pour l'établissement d'un compartiment répliatif pour le parasite : la vacuole parasitophore (VP).

Immédiatement après l'attachement apical, juste avant la pénétration du parasite dans la cellule hôte, les rhoptries déchargent le contenu de leur bulbe, composé de protéines (protéines ROP) et de lipides

organisés en vésicules multilamellaires. Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique et sont retrouvées en partie dans le cytoplasme de la cellule hôte. La sécrétion des ROP serait le facteur déclencheur de la déformation de la membrane plasmique de la cellule hôte (Håkansson et al., 2001). La membrane de la VP est donc initialement formée à partir de la membrane de la cellule hôte, modifiée par la sécrétion du contenu lipidique et protéique des rhoptries qui vont notamment s'insérer dans la membrane en formation (Saffer et al., 1992 ; Foussard et al., 1991 ; Coppens et Vielemeyer, 2005 ; Sibley, 2004).

Avec la formation de la VP, il y a un processus de tri moléculaire : le parasite va se débarrasser des protéines transmembranaires de la membrane plasmique de la cellule hôte et conserver les protéines à ancrage GPI (Mordue et al., 1999). Il semblerait que la composition à la fois parasitaire mais aussi cellulaire de la VP vont permettre au parasite d'échapper à la dégradation par la voie endolysosomale (Joiner et al., 1990).

Des études antérieures ont démontré que le domaine amino-terminal de ROP2, orienté vers le cytoplasme de la cellule hôte établit une interaction avec ROP5, ce qui interviendrait dans le recrutement des mitochondries de la cellule hôte (Sinai et Joiner, 2001 ; El Hajj et al., 2007b). Cependant, une étude récente a remis en cause cette observation n'excluant pas toutefois un rôle secondaire des protéines ROP2/8 dans ce recrutement (Pernas et Boothroyd, 2010).

La localisation dans la cellule hôte de certaines protéines ROP et leurs activités kinasiques potentielles ou avérées suggèrent qu'elles vont moduler et détourner les fonctions biologiques des protéines de la cellule hôte (El Hajj et al., 2006 ; El Hajj et al., 2007 ; Ong et al., 2010).

6. Rôles biologiques des protéines de rhoptries et de micronèmes

Des expériences d'analyses de polymorphismes et de croisements chez le chat ont permis de mettre en évidence l'existence d'une disparité génétique pour certains gènes entre les différents types de souches de *T. gondii*. Les gènes ainsi incriminés seraient responsables du degré de virulence des souches parasites. C'est ainsi que 3 protéines de rhoptries ont d'ores et déjà été décrites comme facteurs importants pour la pathogénie dans un modèle d'infection *in vivo*. Il s'agit des protéines ROP18, ROP16 et ROP5. La protéine TgROP18 est en partie enchâssée dans la VP exposant le domaine kinasique probablement dans le cytoplasme de la cellule hôte et régule ainsi la prolifération

intracellulaire. Cette protéine se retrouve également dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il a été démontré que ROP18 est capable de moduler les réponses de l'immunité innée et adaptative de l'hôte en agissant sur les IRGs (interferon-inducible p47 small GTPases) et ATF6 β (Feng et Sher, 2010 ; Yamamoto et Takeda, 2012). Deux travaux récents décrivent que ROP18 va coopérer avec ROP5 pour inhiber les protéines IRG (Immunity Related GTPase) chez la souris (Fleckenstein et al., 2012). Cependant, ces protéines ne seraient pas capables de permettre l'échappement vis-à-vis de la réponse à l'INF γ chez l'Homme où les protéines IRGs sont absentes (Niedelman et al., 2012)

La protéine ROP16 va moduler et détourner le système immunitaire de l'hôte. Cette protéine est sécrétée dans le noyau de la cellule hôte grâce à la présence du signal peptidique NLS. Le gène codant la protéine ROP16 est différent d'un type de souche de *T. gondii* à l'autre. Les auteurs ont alors pu démontrer que ROP16 était responsable des différences de virulence observées entre les souches de toxoplasme (Saeij et al., 2006 ; Saeij et al., 2007). Des analyses transcriptomiques sur les cellules infectées puis des études biochimiques ont ensuite permis de démontrer que la protéine ROP16 phosphoryle directement les protéines STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Yamamoto et al., 2009) et STAT6 (Ong et al., 2010) de la cellule hôte et va ainsi influencer de nombreuses cytokines et modulateurs de la réponse immunitaire comme par exemple l'IL-12. Behnke et al., ont démontré récemment en utilisant un autre contexte génétique lors de leur croisement que la protéine ROP5 est essentielle à la virulence chez la souris. Ainsi, des parasites mutés pour ROP5 survivent *in vitro* mais sont incapables de tuer la souris (Behnke et al., 2011)

Une étude récente de génomique intégrative et du kinome des parasites a permis d'identifier des kinases parasitaires régulant les réponses de l'hôte (Peixoto et al., 2010). C'est ainsi que les auteurs ont pu démontrer que ROP38, une autre pseudokinase des rhoptries inhibe les activités transcriptionnelles dans les cellules infectées, l'apoptose et la prolifération de celles-ci en ciblant les MAPKinases.

Les micronèmes confèrent au parasite son pouvoir invasif *in vivo*. Les protéines de ces organites vont permettre au parasite de franchir les barrières biologiques. Les études réalisées chez *Plasmodium*, ont indiqué que le parasite utilise les protéines de micronèmes (CTRP, SOAP, MAOP, CelTOS, TRAP) pour migrer au travers de l'épithélium intestinal du moustique (Dessens et al., 2003). Il a été également décrit que *Toxoplasma gondii* serait capable de franchir les barrières biologiques par voie

paracellulaire c'est-à-dire en passant par exemple entre les cellules de l'épithélium intestinal (Weight et Carding, 2012). Ce mécanisme dépendrait de la protéine MIC2 qui est capable d'interagir avec la protéine cellulaire ICAM1. Il a également été démontré qu'un clivage protéolytique de la protéine MPP2 du prodomaine de MIC2 était nécessaire pour cette interaction (Barragan et al., 2005). Les motifs adhésives de TgMIC2 sont impliqués dans les interactions avec des récepteurs de la cellule hôte *in vitro* pour permettre la transmigration (Harper et al., 2004 ; Barragan et al., 2005). Une étude récente a également décrit que cette même protéine cellulaire ICAM1 interviendrait dans le franchissement de la barrière endothéliale au niveau de la rétine (Furtado et al., 2012).

IV. La biogenèse des organites et le trafic intracellulaire chez *Toxoplasma gondii*

Les parasites possèdent de nombreuses protéines dans les organites de sécrétion qui vont être secrétées et permettre au parasite d'envahir la cellule et de s'y multiplier. C'est au cours de la réplication parasitaire que les organites sont néoformés avec l'acheminement des protéines synthétisées dans les organites. Ainsi, la biogenèse des organites apicaux et le trafic intracellulaire des protéines sont étroitement imbriqués.

En outre, le toxoplasme est un modèle expérimental de biologie cellulaire pertinent pour la biogenèse des organites et pour le trafic intracellulaire des protéines (Pelletier *et al.*, 2002). En effet, le parasite possède une organisation polarisée originale de ces organites de sécrétion : micronèmes, rhoptries pour l'invasion ; les granules denses pour la réplication intracellulaire et qui constituent une voie de stockage des protéines (Hager *et al.*, 1999). Le réticulum endoplasmique (RE), distribué au travers du parasite, est concentré au niveau postérieur du noyau tel que l'enveloppe nucléaire et fournit une fraction du volume finale du RE. Trois à cinq vésicules en citerne forment un appareil de Golgi relativement simple qui est antérieur au noyau. Contrairement aux cellules de mammifères, chez le parasite l'enveloppe nucléaire est utilisée comme un intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi. Beaucoup d'aspects du transport des protéines et de la biogenèse des organites semblent avoir été conservés au cours de l'évolution. A priori, certains aspects de ces mécanismes impliqués dans le trafic intracellulaire semblent originaux chez le parasite. Des vésicules couvertes de clathrine sont retrouvées au niveau du réseau trans-golgien. Celles-ci vont distribuer les protéines contenues vers

les organites de sécrétion des parasites Apicomplexa. Le trafic de protéines passant par le RE et l'appareil de Golgi dépendrait des vésicules couvertes de COPI et COPII et serait régulé par des signaux de ciblage antérograde, des motifs de rétention endoplasmique et des protéines accessoires du système sécrétoire.

1. La biogenèse des organites apicaux lors de la réplication du parasite

La division du parasite se fait par endodyogénie. Les parasites filles sont synthétisées de novo au sein même du parasite mère. La division du parasite mère en deux parasites filles est un processus séquentiel contrôlé dans le temps. L'appareil de golgi, avec le centriole, est le premier organe qui se divise chez le toxoplasme (Figure 15B).

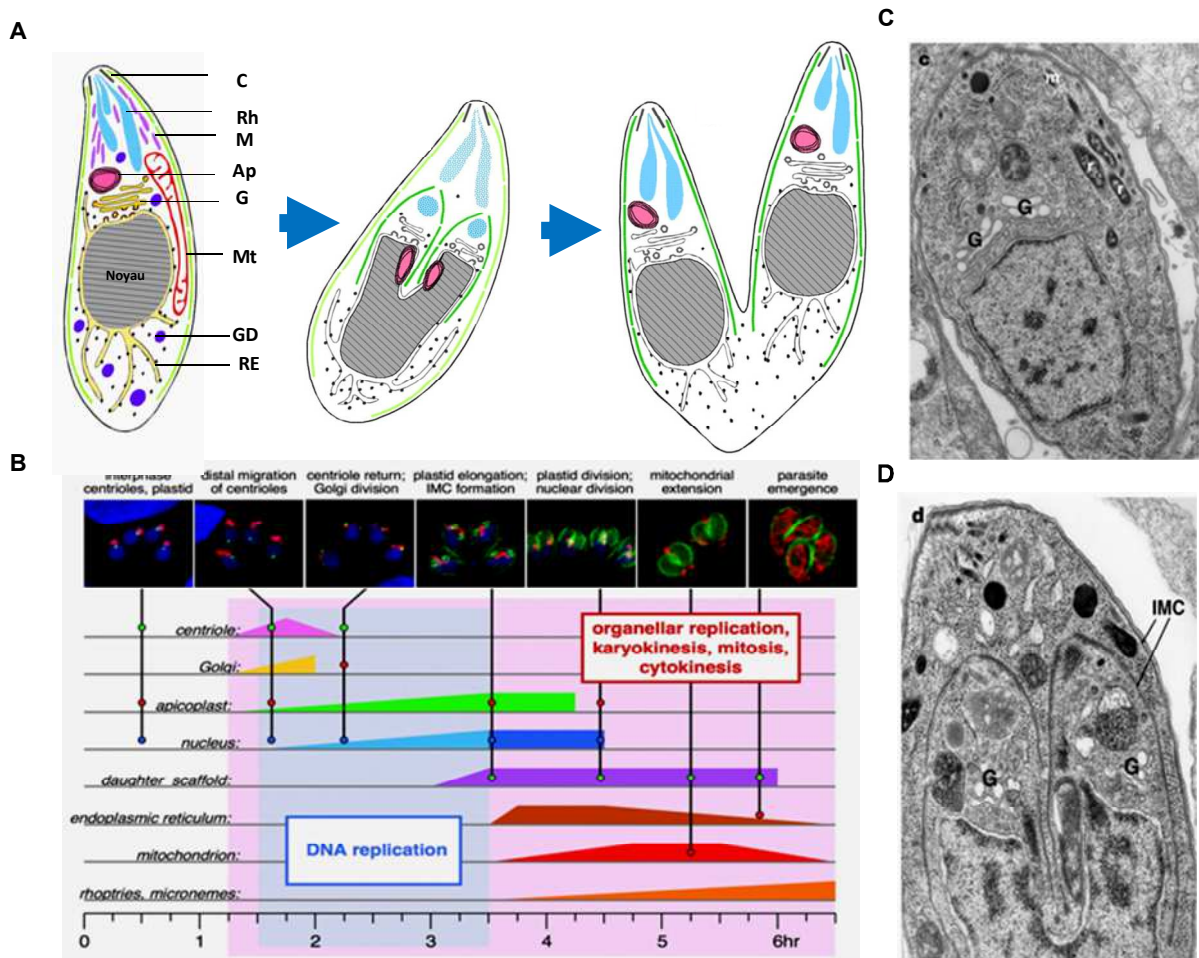


Figure 15. La division par endodyogénie du toxoplasme. A : Représentation schématique de l'endodyogénie (adapté de Nishi et al., 2008). **B :** Réplication des organites et cycle cellulaire de *T. gondii* (d'après Nishi et al., 2008) **C :** Parasite en début de division. On voit distinctement deux

appareils de Golgi (G) au sein du parasite mère (d'après Pelletier et al., 2002). **D** : parasites filles individualisés au sein du parasite mère en fin de division (d'après Pelletier et al., 2002). Les deux complexes membranaires internes (IMC) néo-synthétisés délimitent les parasites filles en formation et permettent se ségréger.

Le centriole est représenté comme une unité constante dans les cellules eucaryotes. La biogenèse de l'appareil de Golgi a fait l'objet d'un débat entre deux hypothèses : le premier faisant état d'une synthèse *de novo* à partir de composés du RE et le second portant sur un désassemblage/assemblage de l'appareil de Golgi préexistant. *T. gondii* qui est polarisé et qui possède un appareil de Golgi unique s'est révélé être un excellent modèle expérimental. Lors de la division du parasite, l'appareil de Golgi va s'étirer latéralement et en même temps que le RE, puis se scinder en deux compartiments. Ensuite, cette division va donner quatre structures golgiennes qui vont être rapidement séparés deux à deux par les membranes du complexe membranaire interne puis fusionner entre elles (Figure 15C) (Pelletier et al., 2002). La division de l'appareil de Golgi est liée à celle du centrosome (Hartmann et al., 2006). Les centrioles vont alors se diviser suite à la migration du centrosome du parasite mère au pôle basal du noyau (Nishi et al., 2008). La précocité de la division de l'appareil de Golgi reflète son importance capitale dans l'élaboration du système sécrétoire pour la formation *de novo* des autres organites. Ensuite, les éléments du cytosquelette se mettent en place (Figure 15B) autour des centrioles au niveau de deux anneaux composés de la protéine TgMORN1 entourant ces centrioles (Hu, 2008). Un autre organite, l'apicoplaste va alors s'allonger et se positionner au dessus du noyau (Figure 15B) (Nishi et al., 2008). Le noyau commence à se scinder en formant une structure incurvée en « U » (Figure 15A). Le noyau sera ensuite séparé en deux par le centrocone. Le conoïde et les anneaux polaires qui forment le complexe apical apparaissent et polarisent les parasites filles. Peu après, les rhoptries et les micronèmes seront formés *de novo* dans la région antérieure à l'appareil de Golgi. Les anneaux « TgMORN1 » commencent à s'éloigner du pôle apical pour se diriger vers le pôle basal de la cellule mère. Le complexe membranaire interne va ségréger les organites des deux parasites filles (Figure 15A) puis la membrane plasmique de la mère bourgeonne fournissant ainsi les membranes des parasites filles (Figure 15D) (Pelletier *et al.*, 2002). Dans une souche RH de type I, la division complète d'un tachyzoïte dure environ six heures. La figure 15B résume la cinétique de la division parasitaire au cours de ces six heures avec la réplication séquentielle du centriole, de l'appareil de Golgi puis de l'apicoplaste et du noyau. Ensuite les éléments

du cytosquelette se mettent en place permettant de séparer les composants des deux parasites filles de manière quasiment simultanée à la biogenèse du RE. Puis la mitochondrie est formée avant l'étape finale et la biosynthèse des organites apicaux, rhotries et micronèmes (Figure 15B). La biosynthèse des protéines, le trafic intracellulaire ainsi que la formation des parasites filles font l'objet de nombreuses études et surtout pour comprendre la mise en place des organites impliqués dans la virulence du parasite.

La biogenèse des organites apicaux résulte de la fusion séquentielle de vésicules issues de l'appareil de Golgi. Ainsi, la synthèse, l'adressage et le transport des protéines de micronèmes et de rhotries sont intimement liés à la formation de ces organites.

2. L'analyse succincte du trafic intracellulaire chez les autres eucaryotes

On distingue chez les eucaryotes supérieurs plusieurs types de transport pour les protéines : par translocation (à travers une membrane), à travers la membrane nucléaire (ouverture contrôlée) et le transport vésiculaire (Figure 16).

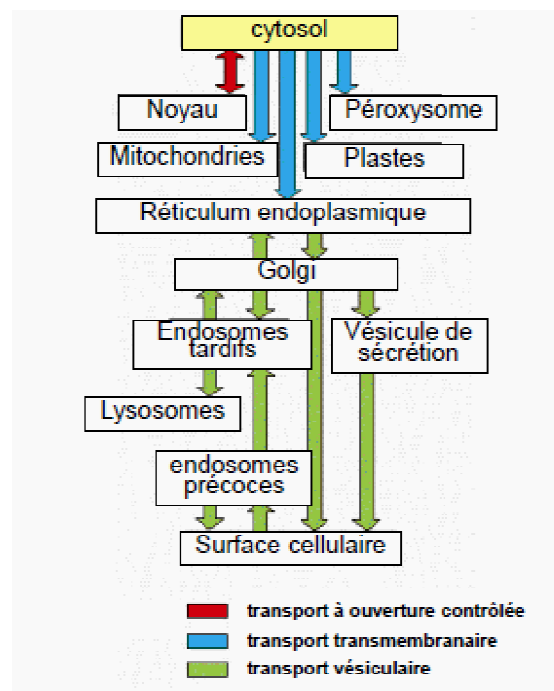


Figure 16. Les différents modes de transport dans les cellules eucaryotes.

On distingue également l'exocytose et l'endocytose. Dans le reste du manuscrit, ce sont préférentiellement les voies de sécrétion et le transport vésiculaire qui seront développées. Les protéines synthétisées dans le cytosol sont transloquées dans le réticulum endoplasmique grâce à la

présence d'un signal peptidique présent au niveau de la protéine synthétisée, puis acheminées jusqu'à l'appareil de Golgi. L'appareil de Golgi est un organite polarisé qui représente le carrefour métabolique du transport vésiculaire à partir duquel les protéines peuvent être acheminées à la surface cellulaire par l'intermédiaire des vésicules de sécrétion ou vers la voie endolysosomale.

Il y a deux sens directionnel pour le trafic intracellulaire : antérograde qui vise à amener des protéines de leur lieu de synthèse vers les organites cibles et rétrograde afin d'internaliser des éléments extérieurs ou de recycler des protéines cellulaires. Une fois au TGN, les protéines synthétisées, après avoir été modifiées, maturées sont soumises à un tri qui les orientera vers une destination subcellulaire : lysosomes, vésicules de sécrétion ou vers la membrane. Généralement, le transport de protéines se déroule par bourgeonnement de vésicules à partir du compartiment donneur. Celles-ci vont ensuite se détacher, se déplacer le long du cytosquelette puis vont fusionner au niveau du compartiment accepteur. La formation des vésicules résulte de l'action de protéines constituant les « manteaux » cytoplasmiques.

a. Les manteaux protéiques impliqués dans le transport de protéines

_ Les manteaux de clathrine interviennent à la sortie de l'appareil de Golgi et lors des endocytoses (Figure 17).

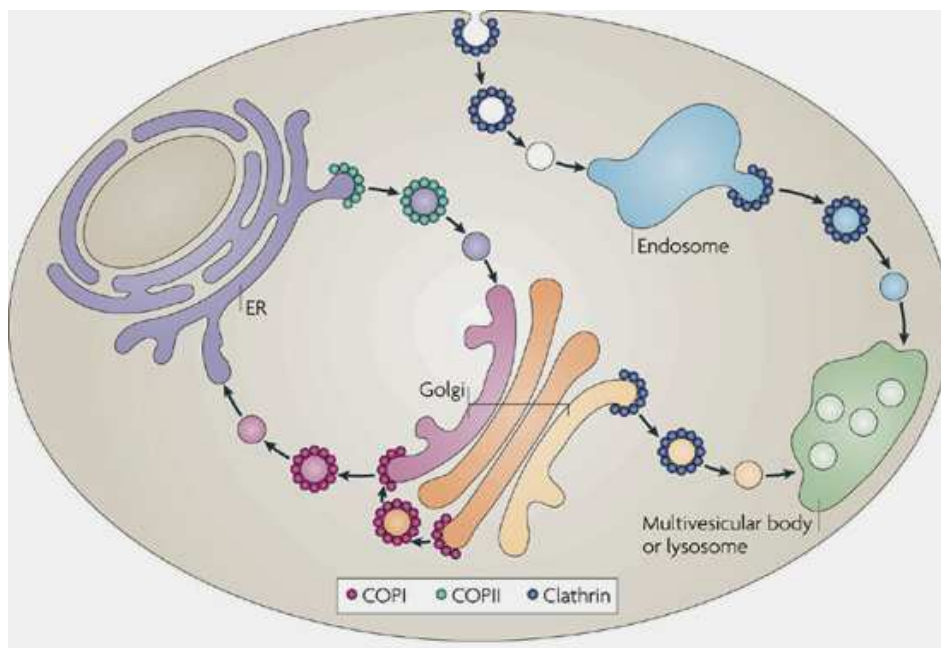


Figure 17. Vue d'ensemble du trafic vésiculaire chez les eucaryotes (voies principales d'après Hsu et al., 2009). Les vésicules COPII assurent le trafic protéique antérograde du RE vers le Golgi (Cis-Golgi). Celles recouvertes de COPI ont un rôle double dans le transport au sein du Golgi et dans le transport rétrograde vers le RE. La clathrine s'associe avec les complexes AP-1 et AP-3 pour permettre le transport du TGN vers le lysosome ou à partir des endosomes. La clathrine s'associe également avec AP-2 lors de l'endocytose.

La clathrine a une structure particulière en triskèle. Les triskèles s'associent pour former un véritable réseau hexagonal plan. Ces structures interagissent alors pour former une sorte de cage autour de la vésicule formée. Le lien entre la clathrine et le transporteur membranaire est exercé par des adaptines telles que les complexes AP (Adaptor Protein) et les protéines GGA (Golgi-localized Gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein) (Robinson, 2004 ; Bonifacino, 2004 ; Hirst et al, 2011 ; Govero et al., 2012). Les protéines adaptatrices forment un pont entre la clathrine et le récepteur transmembranaire auquel elles sont adaptées. En somme, ce sont les adaptines qui confèrent la sélectivité aux vésicules (Robinson, 2004 ; Bonifacino, 2004). Il existe plusieurs types d'adaptines : celles du réseau trans-golgien et celles à la membrane plasmique sont différentes (Boehm et Bonifacino, 2001). Il existe à l'heure actuelle, quatre complexes AP documentés ainsi que la famille des GGAs, celles des « stoned B ». AP-1, AP-3, AP-4 et les GGAs sont impliqués dans le tri au niveau du TGN (Trans-Golgi Network), les autres adaptines étant impliquées au niveau de la membrane plasmique (Robinson et Bonifacino, 2001). Très récemment, un cinquième complexe AP-5 qui serait indépendant de la clathrine a été découvert et est localisé au niveau des endosomes tardifs (Hirst et al., 2011b). Les autres adaptines interagissent avec la clathrine lors de la formation de la cage, les récepteurs sont alors tirés dans cette cage avec la membrane. La fermeture de la vésicule fait intervenir une GTPase : la dynamine avec le concours de l'endophiline (Milosevic et al., 2011 ; Ferguson et De Camilli, 2012). Une fois la vésicule détachée, celle-ci est « décoiffée ». Les adaptines et triskèles sont alors recyclés (Robinson et Bonifacino, 2001 ; Medigeshi et al., 2008).

_ Les manteaux COP

Il existe deux types de manteaux COP (coatomères) : COPI et COPII. COPII agit dans le réticulum et entre le réticulum et l'appareil de Golgi (Figure 17). COPI qui a été découvert de manière plus précoce est en fait localisé en aval dans le système de sécrétion, pour le transport dans l'appareil de Golgi

(Figure 17). Dans les deux types de COP, on retrouve des protéines de la famille des Ras, les protéines ARF1 ou « ADP ribosylation factor » et Sar1 ou « Secretion associated ras superfamily gene 1 ». Ce sont de petites GTPases qui ont un rôle primordial dans l'assemblage de ces vésicules. Une fois activées par une liaison d'un GTP via l'action d'une « GEF » ou G exchange factor, elles vont exposer un acide gras et ainsi s'enchaîner dans la membrane (McMahon et Mills, 2004 ; Jin et al., 2012)

. COP II : Ce manteau est constitué des complexes Sec23/Sec24 et Sec13/Sec31. Le point de départ de la formation des vésicules est la présence sur la membrane plasmique de Sec12, une GEF. Celle-ci va induire l'activation d'une autre protéine Sar1 (Drin et Antony, 2005). Sar1-GTP c'est à dire la forme active va alors exposer un acide gras et s'ancrer dans la membrane. Ceci permet l'interaction avec le complexe Sec23/24, induisant le recrutement des protéines transmembranaires incorporées ensuite dans la vésicule. Sec13/Sec31 vient alors parfaire l'assemblage du manteau sur des vésicules déjà formées (Zanetti et al., 2011). Sec23 joue également le rôle de GAP (GTPase Activating Protein) en activant ainsi l'activité GTPasique de Sar1, ce qui permet le désassemblage du manteau (Lord et al., 2011 ; Jin et al., 2012).

. COP I : Ce manteau est constitué d'ARF1 et de 7 sous-unités coatomériques. Ainsi, la protéine Gea1 active ARF1 qui vient s'enchaîner dans la membrane puis recrute le coatomère. Cela provoque une courbure de la membrane puis un détachement. Les protéines membranaires seront recrutées dans la vésicule via ARF1 et le coatomère (Hsu et al., 2009). Le « décoiffage » est réalisé suite à l'activité d'ARFGAP1.

Les protéines synthétisées dans les ribosomes sur le RE vont se retrouver dans le Golgi par un transport antérograde médié par COPII. Les protéines transitent alors du Cis au trans-Golgi par l'intermédiaire de vésicules COPI qui joue également un rôle essentiel dans le transport rétrograde dans l'appareil de golgi et de celui-ci vers le RE.

_ Les manteaux de cavéoline

Ce type de manteau repose sur la présence de cavéoline qui contrairement aux protéines décrites précédemment, est une protéine membranaire et non soluble. La cavéoline va « s'enrouler » autour des membranes et entraîner la formation de cavités avec le concours d'acides gras qui renforcent

l'interaction avec la membrane. Elle est également capable d'interagir *via* la filamine avec les microfilaments d'actines (Chadda et Mayor, 2008 ; Hill et al., 2008).

b. Les protéines Rab

Un autre aspect essentiel du trafic repose sur la reconnaissance et l'attachement des vésicules par les GTPases solubles appelées Rab et l'implication de ces protéines Rab dans ces processus est cruciale (Hutagalung et Novick, 2011). Sur les membranes, la présence d'une GEF va induire l'activation de la protéine Rab qui échange le GDP pour GTP et va alors exposer le lipide puis s'ancrer dans la membrane. Les protéines Rab, comme les ARF ou les Sar sont capables de recruter toute la machinerie vésiculaire directement ou indirectement. Elles vont pouvoir ainsi recruter des récepteurs, des enzymes modifiant les lipides, des protéines motrices, des protéines d'arrimage comme les golgines, etc... Ces protéines vont alors recruter à leur tour des protéines comme les SNAREs (Ohya et al., 2009 ; Dacks et al., 2009 ; Epp et al., 2011).

Il existe une multitude de protéines Rab jouant un rôle à différentes étapes du trafic et qui constituent de véritables marqueurs de certains compartiments subcellulaires. Par exemple, Rab 1 et 2 interviennent entre le RE et l'appareil de Golgi tandis que Rab 5 et Rab 7 jouent leur rôle dans les endosomes respectivement précoces et tardifs (Hutagalung et Novick, 2011 ; Liu et Storrie, 2012). Les protéines Rab vont aussi permettre la reconnaissance et vont contrôler celle-ci entre le complexe d'attachement du donneur et du receveur. Une fois, les compartiments attachés de la sorte, la dernière étape consiste en une fusion des membranes par les protéines SNAREs (Lorentz et al., 2012 ; Risselada et Grubmüller, 2012 ; Epp et al., 2011).

c. Les protéines SNAREs

Sur la vésicule, une protéine v-SNARE (**v** pour vésicule ou Q-SNARE avec Q pour glutamine) est présente et du côté de la membrane cible se trouve t-SNARE pour « **T**arget », cible ou R-SNARE pour arginine (SNARE : « Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor ». Ces deux protéines vont s'associer et entraîner un rapprochement puis une fusion des membranes. Les protéines SNAREs déterminent la spécificité de fusion membranaire et représente la « machinerie

minimale » pour une telle fusion mais des protéines accessoires ou protéines d'arrimage, NSF, SNAP...) sont indispensables *in vivo* car la fusion *in vitro* est possible mais extrêmement longue sans ces protéines accessoires (Weber et al., 1998 ; Ohya et al., 2009 ; Giraudo et al., 2008). Le NSF ou «N-éthylmaleimide Sensitive Factor» se fixe au SNARE par l'intermédiaire de SNAP ou «Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein ». NSF et SNAP interviennent dans la fusion membranaire et la dissociation du complexe des SNAREs se fait après la fusion des membranes. Lorsque les fonctions de NSF sont inhibées, cela entraîne en effet un blocage de l'endocytose et de l'exocytose (Söllner, Whiteheart et al., 1993 ; Söllner, Bennett et al., 1993).

d. **Transport rétrograde et recyclage du récepteur cargo par le « retromer »**

Le recyclage et le transport rétrograde constituent deux événements imbriqués. Chez la levure, le « retromer » est un complexe protéique impliqué dans le transport rétrograde et le recyclage des récepteurs transmembranaires des compartiments endosomaux et compartiments pré-vacuolaires vers le TGN. Le retromer est composé d'un noyau d'adaptateurs Vps (Vacuolar protein sorting, Vps26p, Vps29p et Vps35p) et deux autres protéines Vps impliquées dans la déformation de la membrane pour permettre le bourgeonnement (Vps5p ; Vps17p) (McGough et Cullen, 2011). Chez les mammifères, le retromer contient un trimère de Vps26, Vps29 et Vps35 tandis que les orthologues des Vps5 et Vps17 ont été dupliqués pour donner les protéines appelées « sorting nexin » (SNX1, 2, 5 et 6) (Koumandou et al., 2011). Les Vps (Vps35 et parfois vps26) vont lier le domaine cytoplasmique du récepteur cargo, comme par exemple le M6PR ou la sortiline et permettre le retour de ces récepteurs au TGN (Pfeffer et al., 2001 ; Seaman et al., 2004). La protéine Rab7 va permettre le recrutement du noyau du retromer à la membrane (Seaman et al., 2009). Les SNX jouent davantage un rôle important dans la courbure de la membrane à l'image de leurs homologues chez la levure (Cullen et Korswagen, 2012).

Le transport rétrograde des protéines et des récepteurs transmembranaires fait intervenir beaucoup de protéines. Des adaptateurs comme AP-1 ou EpsinR permettent à des protéines de manteaux comme la clathrine, le retromer ou TIP47 d'entraîner la formation de vésicules intermédiaires contenant les protéines cargo (Johannes et Popoff, 2008). L'attachement de ces intermédiaires dépend ensuite de facteurs d'arrimage tels que les golgines (golgin-97 ; golgin-245) puis de protéines

SNAREs pour la fusion avec le TGN. Les SNAREs et les facteurs d'arrimage varient selon le cargo et le lieu de départ de la vésicule intermédiaire (Johannes et Popoff, 2008). Les complexes retromer, AP-1 ou la clathrine interviennent dans le transport de l'endosome précoce (EE) au TGN tandis que Rab9 et TIP47 joue un rôle crucial à partir de l'endosome tardif (LE) (Johannes et Popoff, 2008 ; Carroll et al., 2001).

e. **Les complexes ESCRT**

Il existe quatre complexes protéiques ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (ESCRT-0 ; ESCRT-I ; ESCRT-II ; ESCRT-III) et un complexe associé (ESCRT-III associated complexe ou complexe Vps4). Les complexes ESCRT sont recrutés séquentiellement au niveau des endosomes tardifs, reconnaissent les protéines cargo et déforment les membranes biologiques et sont impliqués principalement dans la formation de la MVB (MultiVesicular Bodies), permettant ainsi l'acheminement des protéines vers les lysosomes (Henne et al., 2011 ; Leung et al., 2008).

f. **La glycosylation des protéines**

Les modifications post-traductionnelles et la glycosylation jouent un rôle crucial dans la biosynthèse des protéines, dans le tri et le transport efficace vers leurs compartiments terminaux mais aussi dans la mise en place d'un organite fonctionnel. La glycosylation dans les cellules eucaryotes est primordiale pour permettre une conformation optimale et correcte des protéines ainsi que l'oligomérisation des protéines glycosylées. La N-glycosylation se déroule dans le réticulum endoplasmique (RE) et de façon concomitante à la traduction de l'ARNm par les ribosomes ancrés au RE. Chez les Eucaryotes, on retrouve des structures N-glycanniques de type riche en mannose, hybride et complexe (Roth, 2002 ; Lehle et al., 2006). Ces deux dernières structures résultent de la maturation de la structure riche en mannose dans l'appareil de Golgi (Figure 18).

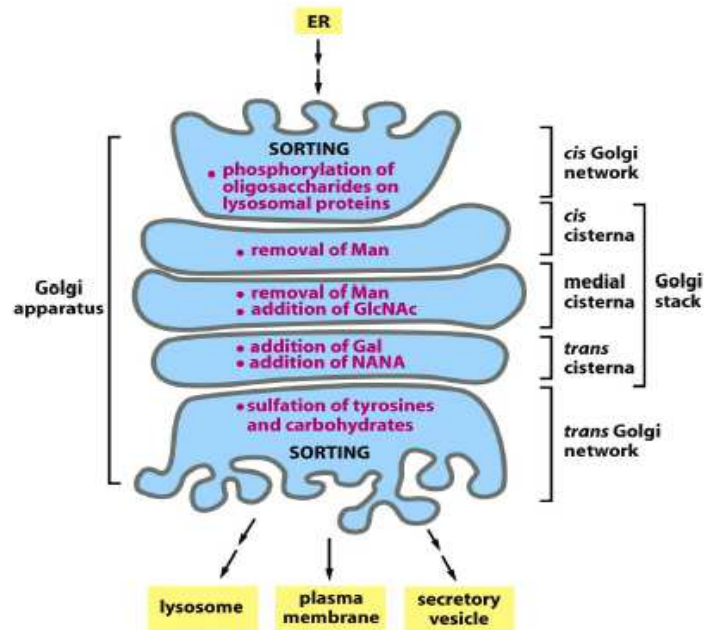


Figure 18. Modifications post-traductionnelle et glycosylation au sein de l'appareil de Golgi

Contrairement à la N-glycosylation, les O-glycosylations sont entièrement réalisées dans le Golgi (Figure 18) et leurs fonctions sont connues dans le trafic intracellulaire ou l'adhésion cellulaire (Luther et Haltiwanger, 2009 ; Gill et al., 2011).

La mise en place d'un contrôle qualité strict et rigoureux repose sur la glycosylation post-traductionnelle des protéines (Roth, 2002). Ainsi, la phosphorylation en C6 du mannose présent sur certaines protéines lysosomales va entraîner la reconnaissance de celle-ci par le récepteur M6PR et induire l'acheminement vers le lysosome (Ghosh et al., 2003).

g. Tri et adressage des protéines

Chez les eucaryotes supérieurs, le tri des protéines destinées à être sécrétées de manière constitutive *versus* celles dont la sécrétion est soumise à la régulation se fait au niveau du trans-Golgi (TG). En l'absence de signal de rétention, les protéines transmembranaires de surface ainsi que les protéines associées à une ancre GPI sont ancrées dans la membrane des vésicules de la voie constitutive, qui permettent leur adressage par défaut à la surface de la cellule. A l'inverse, les protéines qui doivent être adressées aux voies de sécrétion régulées sont empaquetées dans des granules de sécrétion immatures, avant d'être stockées dans les granules de sécrétion définitifs. Certaines données

montrent que l'adressage aux vésicules de sécrétion régulée repose sur des récepteurs présents au niveau du trans-golgi qui reconnaissent spécifiquement des motifs présents dans les protéines destinées aux granules de sécrétion. Malgré tout, ces deux mécanismes sont assez mal connus. La troisième voie de transport conduit les protéines dans la voie endolysosomale (voir aussi paragraphe V.3.)

Plusieurs mécanismes ont été identifiés pour expliquer l'adressage spécifique de certaines protéines dans la voie de sécrétion régulée. Certaines protéines vont pouvoir grâce à une acidification du pH et/ou une augmentation en ions Ca^{2+} ou Zn^{2+} , se rassembler en agrégats (Micaroni, 2010). Un autre mécanisme fait intervenir les protéines adaptatrices (AP) se fixant sur des motifs de type $YXX\Phi$ avec Y =Tyrosine ; X = n'importe quel acide aminé, et Φ = acide aminé portant un domaine hydrophobe encombrant. Des protéines transmembranaires présentant ces motifs tyrosine dans leur partie cytoplasmique peuvent ainsi être adressées spécifiquement aux membranes des organites de sécrétion. Une influence du domaine transmembranaire de ces protéines peut également être impliquée dans les processus de rétention ou d'adressage dans des compartiments spécifiques (Bonifacino *et al.*, 1991 ; Zaliauskiene *et al.*, 2000). En outre, la conformation correcte des protéines, une éventuelle maturation, le niveau et le temps d'expression sont autant de paramètres qui interviennent également dans l'adressage correct des protéines.

3. Le trafic intracellulaire et l'adressage chez *T. gondii*.

Comme le parasite protozoaire unicellulaire *T. gondii* possède des organites similaires à ceux retrouvés chez la levure ou dans les cellules humaines, certains mécanismes de transport, notamment ceux impliqués dans les étapes précoces du trafic subcellulaire sont conservés au cours de l'évolution. Chez *T. gondii*, l'existence d'une voie de sécrétion constitutive n'a toujours pas été formellement démontrée. Les protéines de surface sont majoritairement ancrées dans la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une ancre GPI (protéines SAG pour Surface Antigens), mais le trafic intra-parasitaire de ces protéines ou les vésicules par lesquelles elles transitent pour gagner la surface n'ont pas été identifiés jusqu'à ce jour. En revanche, les organites de sécrétion spécifiques des Apicomplexa que constituent les micronèmes, les rhoptries et les granules denses ont été étudiés de manière extensive. Les mécanismes impliqués dans leur formation sont partiellement élucidés, et font intervenir à la fois des processus conservés et des événements originaux. Des vésicules

couvertes d'AP-1 et de clathrine sont retrouvées au niveau du réseau *trans*-golgien (Ngô et al., 2003). Celles-ci vont distribuer les protéines vers les organites de sécrétion des parasites Apicomplexa. Plusieurs études antérieures ont suggéré que le trafic de protéines passant par le RE et l'appareil de Golgi dépendrait des vésicules couvertes de COPI et COPII et serait régulé par des signaux de ciblage antérograde, des motifs de rétention endoplasmique et des protéines accessoires comme les Rab (Kats et al., 2008 ; Sheiner et Soldati, 2008 ; Joiner et Roos, 2002).

a. La machinerie de trafic vésiculaire et le système endo-lysosomal de *T. gondii*

Jusqu'à récemment, le lysosome présent chez les cellules de mammifères semblait inexistant chez les Apicomplexes. Toutefois, il semble que les rhoptries pourraient être considérées comme des organites de type lysosomal. En effet, des travaux ont déterminé que les rhoptries sont les seuls compartiments qui ont un pH acide chez *T.gondii* (Shaw et al., 1998). Des études plus récentes sur les cathepsines suggèrent en réalité la présence d'un compartiment comparable aux lysosomes classiques (Parussini et al., 2010). De plus, *T. gondii* qui ne possède pas de peroxysomes contient un organite appelé acidocalcisome qui permet le stockage du calcium chez les micro-organismes (Luo et al., 2001 ; Drozdowicz et al., 2003). L'acidocalcisome est acidifié par l'action d'une pyrophosphatase à proton vacuolaire (V-H⁺-PPase ou TgVP1). Le « compartiment VP1 » est très dynamique et est localisé au niveau des endosomes durant la réplication parasitaire (Figure 19).

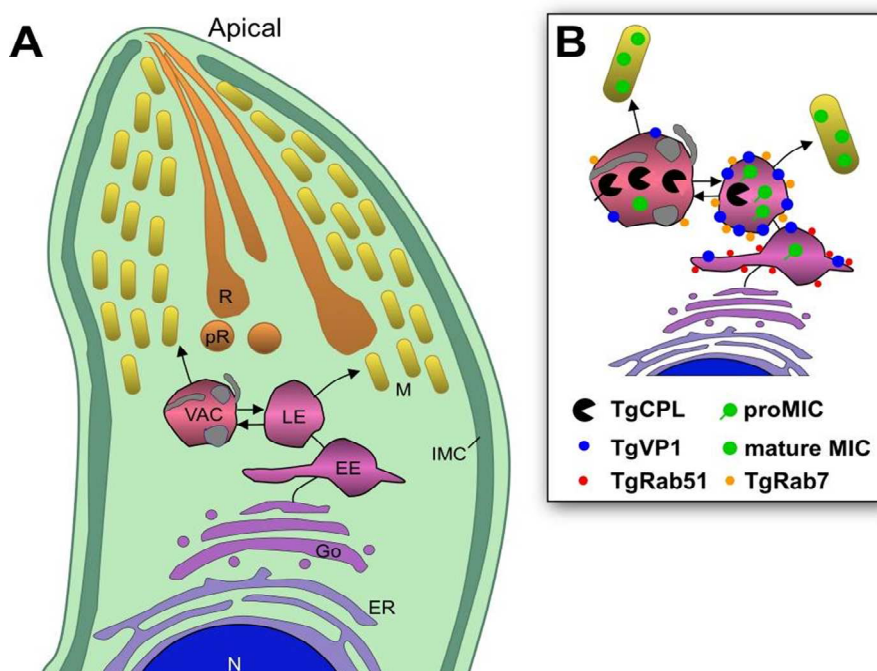


Figure 19. Le système endolysosomal de *T. gondii* (d'après Parussini et al., 2010). Le compartiment de type lysosomal VAC de *T. gondii* se trouve au sein de la voie de sécrétion des protéines. Il semblerait que cet organite jouerait d'intermédiaire pour le trafic des protéines de micronèmes vers les organites cibles et serait le lieu de la maturation protéolytique. M : micronèmes ; R : rhoptrie ; pR : pré-rhoptrie ; Go : Golgi.

Ces travaux ont conclu que l'organite TgVP1 pourrait faire partie de la voie endo-lysosomale. Il a été décrit que TgVP1, TgCPL (cathepsine L) et TgAQP1 (aquaporine) composeraient une large vacuole de type végétal lorsque les parasites extracellulaires sont soumis aux conditions de stress (Miranda et al., 2010). Lors de la répllication intracellulaire des parasites, TgCPL serait contenu dans des structures particulières, proches des endosomes tardifs (Figure 19). Lorsque les parasites quittent la cellule hôte, il y aurait alors une fusion des deux organites qui constituerait un compartiment de type plante (VAC ou PLV) où sont localisées certaines cathepsines parasitaires, suggérant la constitution d'un compartiment similaire aux lysosomes (Miranda et al., 2010 ; Dou et Carruthers, 2011).

Les protéines Rab (membre de la super-famille Ras) sont des petites protéines G avec des activités GTPasiques impliquées dans la régulation du transport vésiculaire (Spang et al., 2004). Il y a dix à onze protéines Rab qui sont exprimées chez *Plasmodium* et quinze chez *T. gondii* (Quevillon et al., 2003 ; Langsley et al., 2008). Les Rab sont des protéines associées aux membranes après prénylation de leur extrémité C-terminale sur un motif CC ou CXC. Le *Plasmodium* possède également un récepteur rabGDI, liant les Rab-GDP, impliqué dans le recyclage des Rab (Attal et Langsley, 1996). Chez *T. gondii*, le transport rétrograde de protéines à partir des vésicules de sécrétion post-golgiennes vers l'appareil de Golgi fait intervenir la protéine Rab6 (Stedman et al., 2003). Le transit de protéines solubles du trans-Golgi vers les granules denses serait indépendant d'un signal d'adressage spécifique alors que celui de protéines membranaires serait tributaire de la taille du segment transmembranaire (Sheiner et Soldati-Favre, 2008). Les protéines de rhoptries sont acheminées via un compartiment intermédiaire faisant partie de la voie endosomale et les pré-rhoptries présentent une structure proche des MVB ou « MultiVesicular Bodies » existant chez les cellules de mammifères. Une implication de motifs tyrosine, dileucine et d'adaptateurs a été décrite pour les protéines membranaires des rhoptries. Un compartiment intermédiaire semble être également utilisé pour les micronèmes (Gaji et al., 2011).

TgRab11 a été retrouvé dans le protéome des rhoptries et est majoritairement localisé dans ces organites de sécrétion (Bradley et al., 2005). Des études plus récentes font état de deux isoformes de Rab11. Rab11A qui a un rôle majeur dans l'assemblage du complexe membranaire interne ou CMI et la cytokinèse tandis que Rab11B est plus impliqué dans la biogenèse du CMI (Agop-Nersesian et al., 2009 ; Agop-Nersesian et al., 2010). TgRab5a est présent sur les endosomes de types précoces et colocalise partiellement avec TgVP1 (Harper et al., 2006). La surexpression de TgRab5 entraîne une augmentation de l'acquisition de cholestérol provenant de l'hôte (Robibaro et al., 2002) alors que TgRab7 est présent sur les structures de type endosomes tardifs et colocalise partiellement avec TgCPL (Parussini et al., 2010).

Chez *Plasmodium* PfRab1a et PfRab1b interviendrait dans le transport du RE au Golgi alors que Rab11a jouerait un rôle dans le recyclage issu des endosomes (Quevillon et al., 2003). Trois effecteurs des Rab sont connus à ce jour chez *Plasmodium* : 1) la protéine: MTIP, homologue de la protéine TgMLC1 (Agop-Nersesian et al., 2009); 2) PfCK ou Casein Kinase 1; 3) PfPKA-C ou unité catalytique de la Protéine Kinase A (Rached et al., 2012). Rab5B se lie avec la CK1 tandis que Rab5a et Rab7 lie PKA-C. Ces expériences suggèrent alors un rôle de PKA dans la mobilisation de l'actine au niveau des endosomes. En effet, chez *Plasmodium*, le déplacement des vésicules dépendrait d'un processus actine/myosine similaire à celui des mammifères (Taraschi et al., 2003).

D'autres éléments majeurs du trafic vésiculaire ont été mis en évidence chez *T. gondii*. Ainsi, des vésicules de clathrine ont été observées au niveau du TGN (Liendo et al., 2001) Des approches biochimiques ont montré que le NSF (N-ethylmaleimide sensitive Factor, molécule activatrice de Sec23/24) et la machinerie NSF/SNAP/SNARE ont un rôle important pour la sécrétion des granules denses au sein du parasite (Chaturvedi et al., 1999). Chez *Plasmodium*, les homologues du NSF, de Sec31p, Rab6a, Sec61a, COP ont été en partie caractérisés et sont impliqués dans le trafic subcellulaire (Kats et al., 2008 ; Hayashi et al., 2001 ; Quevillon et al., 2003).

Les adaptines sélectionnent les récepteurs cargo incorporés aux vésicules de transport. Il existe quatre AP (Adaptins) chez les eucaryotes. Dans ces cellules, AP1 et AP3 sont impliqués dans le transport entre le TGN et les endosomes, AP4 entre le TGN et la surface cellulaire, et AP2 dans l'endocytose provenant de la surface (Robinson et Bonifacino, 2001). Des analyses phylogénétiques ont montré que les parasites Apicomplexa possèdent les complexes AP1 et AP4 (Nevin et al., 2009).

Le complexe AP2 est également présent dans la majorité des apicomplexes étudiés tandis que le complexe AP3 n'a été trouvé que chez *Plasmodium*, *T. gondii* mais absent chez *Cryptosporidium* et *Theileria*. Il s'agirait d'une évolution indépendante où l'hypothétique redondance des complexes AP1 et AP3 a été supprimée. Un traitement de *T. gondii* par un agent chimique, le N-benzoyl-2-hydroxybenzamide, entraîne l'altération des GD, micronèmes, rhoptries et surtout du compartiment acidocalcisome/PLV (Fomovska et al., 2012). Les auteurs ont pu alors déterminer que la cible du N-benzoyl-2-hydroxybenzamide était l'adaptine-3 β initialement localisée dans le TGN et les endosomes.

On retrouve également des éléments du complexe COPI chez *T. gondii*. La protéine TgARF1 intervient dans la modulation positive du relargage des granules denses (Liendo et al., 2001). Tg β -COP, une sous-unité de COPI serait impliquée dans le transport rétrograde du Golgi vers le réticulum (Hager et al., 1999). De plus, de nombreuses et autres protéines de la machinerie vésiculaire telles que des composants du complexe COPII : Sec23, Sec24, Sar1, pour ne citer que celles-ci ont été identifiées dans les génomes des parasites.

On retrouve chez *Plasmodium* une multitude de protéines de type SNARE (de la famille des membrines, de Bet1, de la syntaxine5, des VAMP) (Ayong et al., 2007) ainsi que la plupart des protéines intervenant dans le transport vésiculaire telles que ARF1, ARFGAP, ARF-GEF, Sar1p, et Sec31p (Kats et al., 2008).

Des travaux réalisés par l'équipe de Markus Meissner ont permis de caractériser la protéine DrpB ou «Dynamine-related protein B» chez *T. gondii* (Breinich et al., 2009). Les dynamines sont des GTPases de masses moléculaires élevées qui interviennent dans la formation des vésicules (scission des vésicules néoformées), la cytokinèse et la biogenèse des organites chez les eucaryotes (Ferguson et De Camilli, 2012). Il a été démontré que DrpB est localisée au dessus de l'appareil de Golgi du parasite, dans un compartiment non défini et qu'elle est nécessaire pour la biogenèse des organites de sécrétion (rhoptries et micronèmes) de *Toxoplasma gondii* (Breinich et al., 2009).

b. Trafic protéique de l'entrée du réticulum à l'appareil de Golgi

Plusieurs données permettent de comparer le système de sécrétion précoce des protéines de *T. gondii* avec celui des autres cellules eucaryotes. Les protéines de *T. gondii* destinées aux organites

de sécrétion ou à la surface du parasite possèdent un peptide signal au début du domaine N-terminal. Ce peptide signal permet l'entrée des protéines dans la voie de sécrétion au niveau du RE. Ainsi, les protéines sont transloquées dans la lumière du RE et le peptide signal est clivé.

Le séquençage des génomes a permis de mettre en évidence la présence de la plupart des gènes codant pour les protéines de la machinerie de translocation (Sec61, Sec62, Sec71, Sec11) (Ajioka et al., 1998). Un homologue d'un des composants de la machinerie de translocation, TgBiP (Binding Protein ; Hager et al., 1999) et des protéines telles que la calnexine ou Hsp70 (Banerjee et al., 2007) ont ensuite été caractérisées. Des mécanismes de rétention dans le RE ont également été mis en évidence (Hager et al., 1999). Ainsi, le signal de rétention dans le RE tel que HDEL est retrouvé dans les séquences peptidiques des protéines résidentes du RE (Hager et al., 1999). La protéine qui intervient dans la reconnaissance du signal HDEL, TgERD2, a également été identifiée (Pfluger et al., 2005). Malgré cela, il est à noter que bien que les génomes de *T. gondii* et même *Plasmodium* possèdent les éléments du SRP ou «Signal Recognition Particle», certains facteurs comme la sous-unité β du récepteur SRP sont absents chez ces parasites. Cette absence si elle est avérée, pourrait indiquer l'existence probable des mécanismes originaux du trafic intracellulaire chez les parasites Apicomplexa. Par ailleurs, contrairement aux cellules de mammifères, l'enveloppe nucléaire du parasite est utilisée comme un intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi (Hager et al., 1999).

La bréfeldine A (BFA) est une toxine qui inhibe le trafic du RE vers l'appareil de Golgi. Les tachyzoïtes de *T. gondii* traités à la BFA montrent une abolition globale de la formation des vésicules de sécrétion, ce qui suggère que toutes les protéines destinées aux organites de sécrétion transitent entre le RE et l'appareil de Golgi (Chardin and McCormick, 1999). Plusieurs protéines de revêtements de type COPI/COPII (COatomer Protein) et des protéines impliquées dans le transport de vésicules entre le RE et l'appareil de Golgi comme Sar1 (GTPase régulant l'assemblage/désassemblage de COPII) ou ARF1, décrites chez les mammifères et la levure existent chez le toxoplasme (Ajioka et al., 1998 ; Hoppe et Joiner, 2000).

ARF1 qui chez les mammifères, recrute COPI est importante pour assurer l'intégrité de l'appareil de Golgi et une sécrétion efficace des granules denses chez le parasite (Liendo et al., 2001). Des travaux antérieurs ont montré que l'addition d'un motif acide à une protéine exprimée dans le parasite permet l'export du RE, probablement par liaison avec les protéines COPII parasitaires (Hoppe et Joiner, 2000). Chez *Plasmodium*, les sous-unités Sar1p et Sec23p et Sec31p ont été décrites (Albano et al.,

1999 ; Adisa et al., 2001) et les résidus de PfSec23 impliqués dans l'interaction avec la protéine Sar1 ont été caractérisés (Wickert et al., 2003). La localisation par immunofluorescence chez *T. gondii* des sous-unités du COPI révèle une présence de ce complexe au niveau de l'appareil de Golgi (Liendo et al., 2001). Chez *Plasmodium*, la sous-unité δ -COP (COPI) a été aussi caractérisée et son implication dans le transport intra-parasitaire, sa localisation au niveau du RE, du TG et la colocalisation partielle avec Rab6 ont été également décrite (Adisa et al., 2002). Les gènes codant les composants du complexe COP II recouvrant les petites vésicules qui transitent du RE vers l'appareil de Golgi (Hager et al., 1999), de même que les gènes codant les protéines du complexe COP I, impliqué dans le transport antérograde et rétrograde des vésicules golgiennes vers le RE ont été retrouvés dans le génome du toxoplasme (Sheiner et Soldati, 2008).

c. Adressage et trafic des protéines de micronèmes

Les protéines de micronèmes fonctionnent généralement en complexe comportant une protéine transmembranaire et une ou plusieurs protéines solubles (MIC2/M2AP ; MIC3/MIC8 ; MIC1/MIC4/MIC) (Carruthers et Tomley, 2008 ; Meissner et al., 2002 ; Reiss et al., 2001 ; Striepen et al., 2001 ; Harper et al., 2006). Ces premières études ont montré que l'adressage correct des protéines de micronèmes solubles était dépendant de leur assemblage en complexe avec des protéines de micronèmes transmembranaires. Ainsi, la formation de ces complexes est indispensable au transport des protéines vers les micronèmes. Par exemple, les protéines MIC1, MIC4 et MIC6 forment un complexe protéique et la délétion du gène codant la protéine Mic6 conduisait à la libération de MIC1 et MIC4 dans la vacuole via les GD et le domaine C-terminal de MIC6 était suffisant pour localiser la protéine aux micronèmes (Reiss et al., 2001). Le domaine de type galectine de MIC1 stabilise le troisième domaine EGF de Mic6, ce qui va permettre le bon repliement de MIC6. En supprimant ce domaine, le complexe Mic1/4/6 est retenu dans le RE (Reiss et al., 2001). De même, il a été montré que la protéine transmembranaire MIC8 s'associe avec MIC3 (Meissner et al., 2002). Des travaux menés sur la protéine soluble MIC3 ont mis en évidence la présence de régions importantes pour l'adressage de la protéine au cœur de la protéine (Striepen et al., 2001). Ces régions doivent donc permettre soit l'interaction avec MIC8 ou permettre la bonne conformation de la protéine qui peut alors passer le contrôle qualité dans l'appareil de Golgi.

Un autre complexe fait intervenir la protéine MIC2 avec la protéine M2AP (MIC2- Associated Protein). Une délétion de M2AP entraîne l'accumulation du complexe dans les parasites au niveau du ER/Golgi (Huynh *et al.*, 2003). La protéine M2AP, grâce à son prodomaine, agit en tant qu'escorteur de la protéine MIC2 (Harper *et al.*, 2006).

Des motifs d'adressage aux micronèmes comme le motif SYHYY ou EIEYE ont été identifiés dans le domaine C-terminal de certaines protéines transmembranaires (Di Cristina *et al.*, 2000 ; Reiss *et al.*, 2001). Cependant, des études récentes ont démontré que ces éléments ne sont pas suffisant pour permettre le transport vers les micronèmes et que le partenaire soluble du complexe a un rôle majeur dans le trafic des protéines (Huynh *et al.*, 2003). Ainsi, en 2006, Harper *et al.*, ont démontré que le propeptide de M2AP est essentiel pour l'adressage du complexe. D'autres études ont démontré que des résidus aliphatiques conservés dans la partie N-terminale des protéines solubles agissent comme des déterminants majeurs du trafic des micronèmes (Gaji *et al.*, 2011).

L'hypothèse aujourd'hui avancée consiste en un rôle du domaine C-terminal de la protéine transmembranaire dans les étapes précoces du trafic (ER, Golgi, TGN) et le propeptide serait crucial dans le trafic au niveau des endosomes, de manière plus ou moins tardive en fonction des protéines.

Le rôle majeur du propeptide a depuis été décrit pour d'autres protéines, notamment pour la protéine soluble MIC3 (El Hajj *et al.*, 2008) ou pour TgMIC5 où il est indispensable à l'adressage de cette protéine aux micronèmes (Brydges *et al.*, 2006). La délétion du propeptide de cette protéine entraîne une délocalisation dans la vacuole parasitophore, ce qui montre que l'information nécessaire à l'adressage aux micronèmes est contenue dans ce pro-domaine. En plus du propeptide, chacun des 3 domaines EGF de la protéine est suffisant pour l'adressage aux micronèmes.

Le modèle repose sur l'existence d'un ou plusieurs récepteurs qui pourrait lier le propeptide et amener les différents complexes aux micronèmes. La liaison et la reconnaissance de la protéine de micronème avec le récepteur qui effectue le tri devrait donc s'effectuer au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 20).

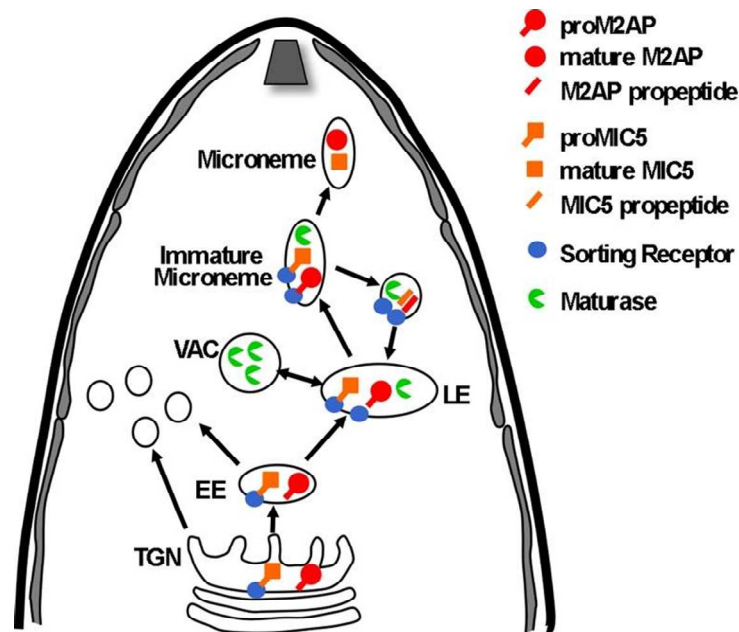


Figure 20. Schéma putatif récapitulatif du Transport et de la maturation des protéines de micronèmes. (d'après Gaji et al., 2011). Les protéines de micronèmes sont prises en charge au niveau du TGN par un récepteur de tri pour être acheminées vers les micronèmes via le système endolysosomal de *T. gondii*. La maturation des protéines est réalisée pendant le cheminement des protéines dans ce système.

Le rôle du propeptide est primordial pour différents processus. Par exemple, il empêche des interactions aberrantes comme c'est le cas pour Mic3 et empêche la liaison du domaine «chitin-binding-like» aux récepteurs cellulaires (Cérède *et al.*, 2002). Les régions propeptidiques des protéines de micronèmes sont par la suite clivées par une enzyme, SUB1 ou subtilysine 1 au niveau du réseau post-golgien (Figure 20) (Soldati *et al.*, 2001 ; Carruthers, 2006).

Les protéines MIC5 et M2AP dépourvus de leurs propeptides se retrouvent bloqués au niveau du TGN et des vésicules post-golgiennes, ce qui évoque un rôle potentiel d'un récepteur cargo prenant en charge les protéines dans ce compartiment post-golgien (Brydges et al., 2006). La mutation de M2AP sur le site de clivage protéolytique conduit à l'accumulation de MIC2 dans le compartiment VP1 (Harper et al., 2006), démontrant le transport sous forme de complexe de ces deux protéines et que le compartiment où se trouve VP1 est un intermédiaire possible dans la voie de sécrétion des protéines de micronèmes. Il a été suggéré que la maturation des protéines de micronèmes se déroulerait dans les endosomes où dans un compartiment particulier de type lysosomal, VAC (VAcuolar Compartment)

(Parussini et al., 2010). Les protéines sont ainsi clivées dans des compartiments intermédiaires de l'endocytose avant d'emprunter la voie d'exocytose, ce qui implique que les deux voies d'exo et endocytose auraient été « fusionnées » chez *T. gondii* (Ngô et al., 2004 ; Harper et al., 2006 ; Parussini et al., 2010, Gaji et al., 2011).

Les protéines MIC immatures sont localisées au niveau de VP1 qui est proche du TGN et des endosomes précoces (EE). TgCPL, une Cathepsine L ou protéase de type lysosomal réside dans le VAC et va protéolyser de manière fine le propeptide d'au moins deux protéines : M2AP et MIC3 (Parussini et al., 2010) (Figures 19 et 20). La présence de cette cathepsine CPL et la localisation du compartiment VAC suggèrent que cet organite constitue le compartiment de type lysosome du parasite (développé dans la partie III.2.1.).

d. Adressage et trafic des protéines de rhoptries

En ce qui concerne les protéines de rhoptries solubles, l'étude de l'adressage de ROP1 aux rhoptries a révélé que le pro-domaine de ROP1 serait suffisant mais pas nécessaire à l'adressage de la protéine vers les rhoptries (Bradley et Boothroyd, 2001). Il existe deux signaux indépendants dans la protéine ROP1 permettant son adressage aux rhoptries. En effet, une séquence centrale de 146 acides aminés composée de séquences répétées a été également identifiée comme un élément déterminant pour le ciblage de la protéine ROP1 aux rhoptries (Striepen *et al.*, 2001). Le pro-domaine de ROP1 seul permet d'orienter la protéine aux Rhoptries mais permet une localisation dans le « cou » des rhoptries et non dans le bulbe (Bradley et Boothroyd, 2001). Il semble aussi que la maturation de ROP1 n'est pas indispensable pour la localisation correcte de la protéine (Bradley et Boothroyd, 2001 ; Bradley et al., 2002). Les données disponibles sur *Plasmodium* font également état de la présence probable d'un signal de rétention dans le bulbe des rhoptries au niveau du domaine C-terminal de RAP1, l'homologue de ROP1 (Richard et al., 2009).

Chez *Plasmodium*, 3 protéines de rhoptries s'associent en complexe : RAP1 avec RAP2 ou RAP3. La délétion du domaine C-terminal de RAP1 conduit à l'abolition de l'interaction RAP1-RAP2/3 et entraîne la rétention de RAP2/3 dans le RE (Baldi et al., 2000 ; Richard et al., 2009). Dans ce cas, RAP1 est toujours dirigé vers les rhoptries mais n'est pas sécrété ensuite dans la vacuole comme la protéine sauvage. Ces travaux ont confirmé que le pro-domaine de RAP1 est nécessaire et suffisant

pour le positionnement aux rhoptries. La protéine RAP1 posséderait deux signaux distincts : un pour l'adressage aux rhoptries, un pour la sécrétion dans la vacuole parasitophore (Richard et al., 2009). Les auteurs ont également mis en évidence une protéine, RAMA, présente dans la lumière de l'appareil de Golgi qui escorte RAP1 en liant le domaine N-terminal de cette dernière. Ces études montrent que, comme les protéines de micronèmes, les protéines de rhoptries sont capables de s'associer en complexe pour leur transport.

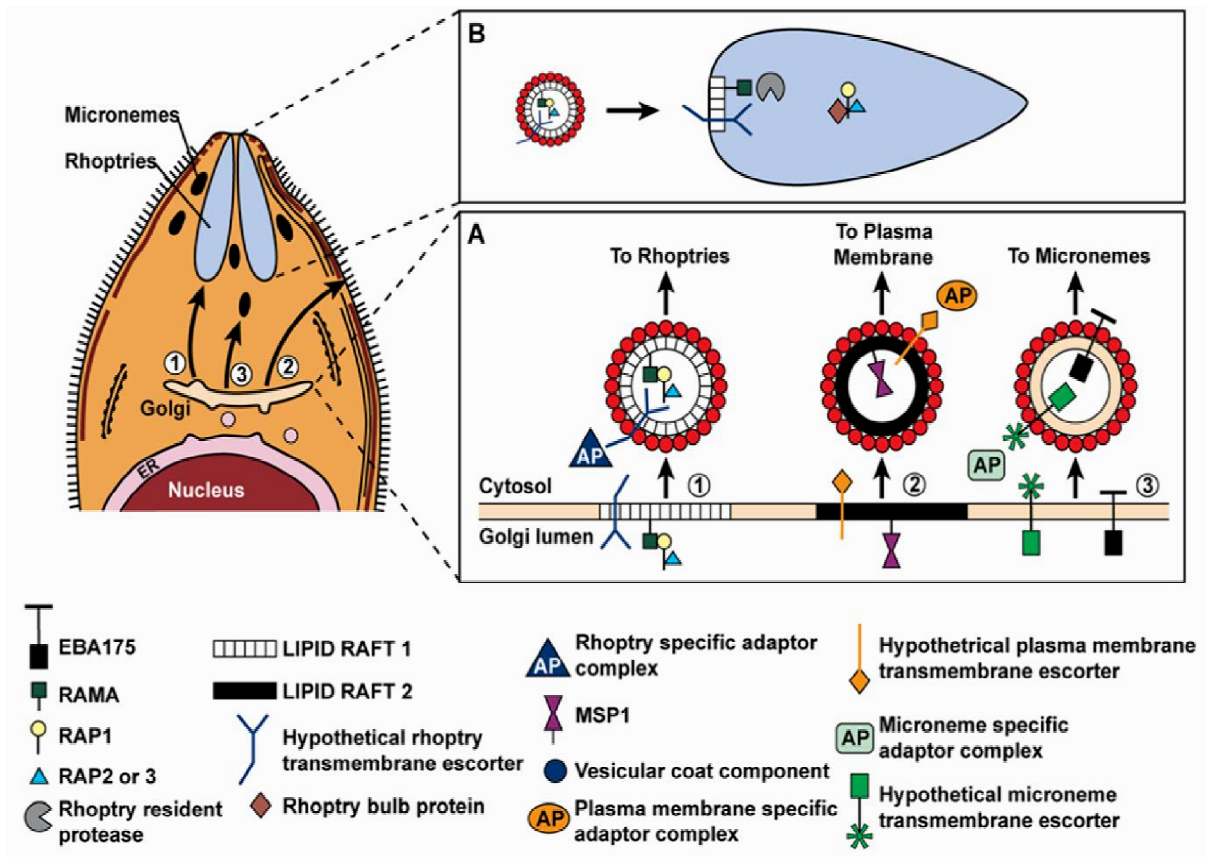
Concernant la protéine ROP4, la création d'une protéine tronquée ne portant que les 163 premiers acides aminés de la protéine, donc dépourvue de motifs C-terminaux, a révélé que ces résidus étaient suffisants à l'adressage vers les rhoptries (Bradley et al., 2004)

Le rôle capital du pro-domaine des protéines suggère que la protéolyse participe également au transport et à la biogenèse des organites. De plus, une Serine protéase, SUB2 (subtilisin) enlève le domaine N-terminal impliqué dans l'adressage des protéines de rhoptries. De nombreuses protéines de rhoptries sont clivées et les pro-domaines N-terminaux sont impliqués dans le trafic et le tri des protéines. SUB2 reconnaît et clive après la séquence consensus S ϕ XE (dans laquelle ϕ est un acide aminé hydrophobe, et X n'importe quel acide aminé) le pro-domaine de ROP1 (Miller et al., 2003). D'autres protéines ROP et RON possèdent également ce site de clivage par prédiction bioinformatique et certaines coupures protéolytiques d'autres ROP ont déjà été démontrées (Turetzky et al., 2010). Les parasites Apicomplexes semblent utiliser leurs homologues des protéines du système endosomal connu chez la levure et les mammifères (les protéines Rab, AP-1, etc..). Ces homologies ont incité des auteurs à mener des expériences de dominant négatif de la protéine chaperone Vps4 (Vacuolar Protein Sorting 4) chez *Plasmodium* (Yang et al., 2004). Celles-ci ont permis de mettre en évidence la présence d'une large structure MVB (MultiVesicular Body) présentant une accumulation de Vps4, de cholestérol, de marqueurs endosomaux comme Rab5 et de protéines de rhoptries (Yang et al., 2004). Le rôle important de Vps4 dans la dynamique des endosomes ainsi que la présence de structures dérivées des endosomes comme des intermédiaires pour la formation des rhoptries au croisement des voies d'endo et d'exocytose ont été démontrés chez les Apicomplexa (Yang et al., 2004 ; Ngô et al., 2003).

Les protéines de la famille ROP2 possèdent du côté C-terminal des motifs tyrosine et di-leucine (Hoppe et al., 2000 ; Ngô et al., 2003). La mutation de l'un ou l'autre de ces signaux provoque la

diminution de l'adressage aux rhoptries de ROP2 ou ROP4, et on observe l'accumulation de ces protéines dans un compartiment de type «multivesicular body» ou MVB. Ce compartiment correspond à une rhoptrie immature ou pré-rhoptrie. La sous-unité $\mu 1$ de la protéine adaptatrice AP-1 interagit avec le motif YXX Φ de la protéine ROP2 (Hoppe et al., 2000). Ces résultats suggèrent que les protéines de rhoptries transitent via le système d'endocytose. Tg $\mu 1$ est détectée au niveau de l'appareil de Golgi, de vésicules associées au Golgi, et au niveau des rhoptries (Ngô et al., 2003). Le rôle de $\mu 1$ dans l'adressage aux rhoptries et la biogenèse de ces organites a été démontré en utilisant une stratégie de dominant négatif (Ngô et al., 2003). Dans cette expérience, la protéine ROP2 est alors bloquée dans les pré-rhoptries. Ces travaux sur les mécanismes d'adressage aux rhoptries en plus de l'acidité de cet organite tendent à conforter l'hypothèse que les rhoptries fonctionneraient comme des lysosomes sécrétoires.

Par ailleurs, chez *Plasmodium*, la plupart des protéines de rhoptries ne sont pas des récepteurs transmembranaires de type I. Des travaux récents, notamment réalisés chez ce parasite montre que le trafic des protéines de rhoptries pourrait reposer sur les mêmes mécanismes que pour celles de micronèmes c'est-à-dire via la formation de complexes transitoires qui sont assemblés au sein des vésicules du TGN et dissociés par clivage protéolytique dans des étapes plus tardive de leur transport (Richard et al., 2009). Dans ce travail, les auteurs proposent l'intervention d'un escorteur transmembranaire au niveau de l'appareil de Golgi et qui recruterait à la fois les protéines de rhoptries sous forme de clusters protéiques dans des radeaux lipidiques présents dans la lumière de la vésicule lors du bourgeonnement. Des adaptateurs cytosoliques conduiraient les vésicules jusqu'à l'organite cible ou le pré-organite dans lequel un clivage protéolytique a lieu, ce qui amènerait à destination les protéines dans l'organite final (Figure 21).



V. La sortiline : un récepteur cargo à domaine vps10 aux multiples fonctions

Chez des patients atteints de mucopolysaccharidose (I-cell disease, maladie lysosomiale), un certain nombre de protéines lysosomales continuent d'être acheminées de manière efficace malgré l'altération de la voie du MPR (Mannose-6-phosphate receptor ou MPR). Cette observation indique qu'il existe un récepteur alternatif qui a été identifié comme la sortiline avec une fonction responsable du transport indépendant de la voie du MPR des SAPs ou «sphingolipid activator proteins» et de la ASM ou «sphingomyelinase acide» (Lefrancois et al., 2003 ; Ni et Morales, 2006). Dès lors, de multiples fonctions intervenant dans de nombreux processus biologiques ont été attribuées à la sortiline ou à d'autres protéines de la même famille. Cette famille de protéines est regroupée en fonction de la présence commune d'un domaine particulier, le domaine Vps10p.

1. La famille des récepteurs à domaine VPS10p

Le domaine Vps10p est nommé ainsi en raison de la forte homologie avec la protéine Vps10p pour «vacuolar sorting protein» existant chez *Saccharomyces cerevisiae*. Chez la levure, la protéine Vps10p est un récepteur de tri golgien requis pour le trafic intracellulaire. Elle permet l'acheminement de l'hydrolase carboxypeptidase Y (CPY) et de la protéinase A dans la vacuole (apparentée au lysosome des mammifères) de la levure (Marcusson et al., 1994). Les récepteurs à domaine Vps10p sont des protéines transmembranaires de type I (Figure 22).

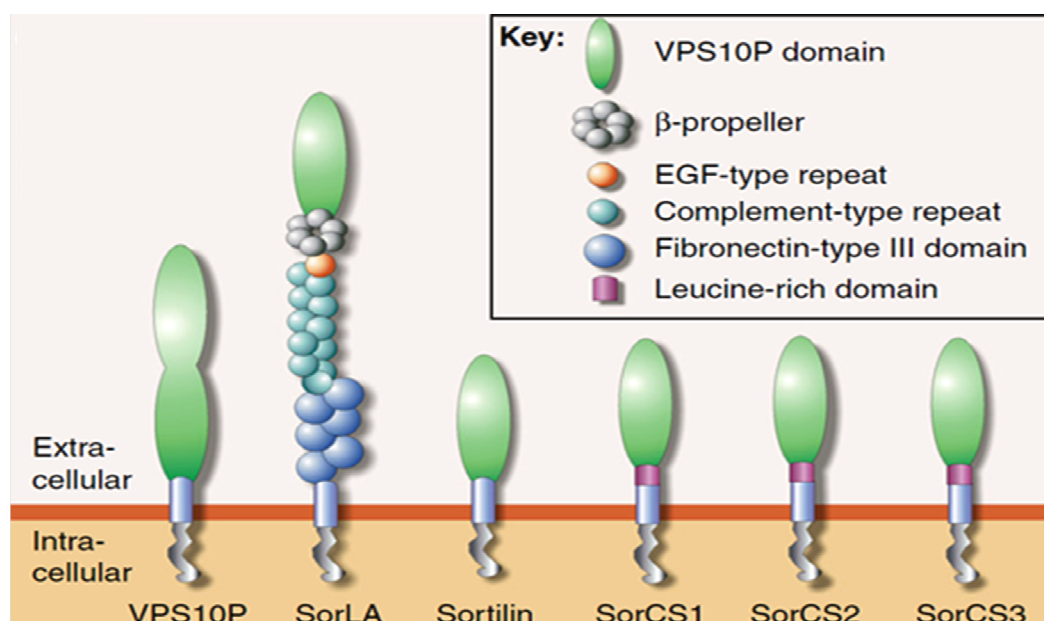


Figure 22. La famille des récepteurs à domaine VPS10p chez l'Homme. (Nykjaer et Willnow, 2012). Vps10p correspond à la protéine de la levure à laquelle sont apparentés les 5 membres de la famille des protéines à domaine Vps10p de l'Homme.

Dans la famille des récepteurs de type I à domaine Vps10p dans les cellules humaines, on retrouve les protéines sortiline (ou NTR3), SorCS (1, 2, et 3) et SorLA. Cette famille possède un large domaine N-terminal et une courte queue cytoplasmique (40 à 80 acides aminés). Le domaine Vps10p est présent dans le domaine amino-terminal qui se caractérise par la présence de motifs riches en cystéines très conservés. D'un point de vue structural, le domaine Vps10p couvre la quasi-totalité de la partie luminale/extracellulaire de la sortiline tandis que des modules additionnels sont présents dans les autres récepteurs de la même famille. (Figure 22).

Les SorCS1-3 contiennent ainsi une séquence riche en leucine précédant le domaine transmembranaire tandis que dans la protéine SorLA de multiples domaines annexes de type LDLR (low-density lipoprotein receptor), EGF et fibronectine sont présents (Hermeij, 2009 ; Nykjaer et Willnow, 2012). La famille des récepteurs à domaine Vps10p participe à divers processus biologiques incluant le métabolisme des lipides, des sucres et la signalisation intracellulaire. Toutes ces protéines sont synthétisées sous la forme de pro-protéines. Le récepteur est ensuite maturé par clivage enzymatique par la furine au niveau du TGN. Les protéines de cette famille de récepteur sont localisées dans de nombreux tissus chez l'Homme. Bien que majoritairement présent dans le système nerveux, ces récepteurs sont retrouvés dans des tissus métaboliques tels que le foie ou les muscles. (Strong et al., 2012 ; Linsel-Nitschke et al., 2010)

La sortiline a été identifiée indépendamment dans le cerveau humain (nommée alors NTR3) et dans les vésicules contenant le transporteur de glucose GLUT4 (Petersen et al., 1997 ; Mazella et al., 1998). D'autres fonctions que le transport lysosomal ont été imputés à la sortiline de manière plus récente (Nykjaer et Willnow, 2012 ; Strong et Rader, 2012). La sortiline est une protéine d'environ 100 kD qui est associée à de multiples fonctions comme la liaison et le tri de protéines à la membrane plasmique (Mazella et al., 1998 ; Nielsen et al., 1999 ; Nykjaer et al., 2004 ; Canuel et al., 2009), de l'appareil de Golgi à l'endosome (Nielsen et al., 2001), ainsi que dans le trafic lysosomal notamment de certaines cathepsines (Lefrançois et al., 2003 ; Canuel et al., 2008).

Il a ainsi été décrit que la sortiline transite entre la surface cellulaire et différents organites subcellulaires dirigeant alors les protéines partenaires pour induire divers mécanismes biologiques : exposition à la membrane, transduction de signaux, endocytose, transport antérograde et rétrograde (Nykjaer et Willnow, 2012 ; Strong et Rader, 2012). Parmi les fonctions plus « originales » de la sortiline, un exemple est le rôle de la sortiline dans le trafic protéique le long de l'axone des neurones (Willnow et al., 2008).

La sortiline est capable d'interagir avec divers ligands via son domaine N-terminal qui est couvert quasiment totalement par le domaine Vps10p et forme une structure en hélice β constituée de 10 pâles ou «bladed beta-propeller» (Figure 23).

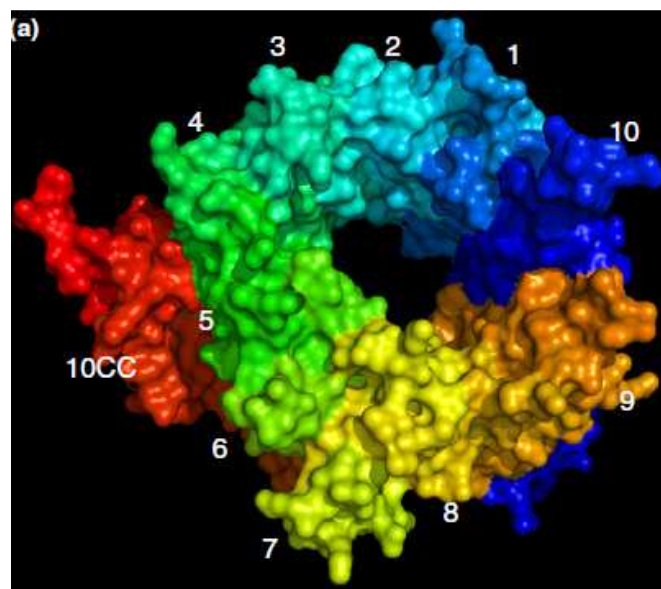


Figure 23. Structure moléculaire du domaine vps10p de la sortiline (résolution 2 Å) (Nykjaer et Willnow, 2012). Un véritable tunnel est formé par le domaine N-terminal de la sortiline qui est composé de 10 bladed beta-propeller (structures en hélice) numéroté ci-dessus et du domaine 10CC.

La sortiline possède au sein de son domaine carboxy-terminal des éléments permettant la signalisation cellulaire par l'intermédiaire de partenaires cytosoliques. Ce sont en réalité les partenaires cytoplasmiques de la sortiline qui vont gouverner et contrôler ses fonctions de transport de protéines ou d'autres molécules (Canuel et al., 2009).

Le domaine N-terminal luminal de la sortiline est capable de lier différents ligands :

_ Le propeptide de 44 acides aminés libéré lors de la maturation de la pro-sortiline.

_ La protéine RAP ou «receptor associated protein», une protéine de 40 kDa qui a servi à purifier et à cloner la première fois le gène codant la sortiline.

_ La neurotensine (NT), un neuropeptide de 13 acides aminés (qui a servi à purifier le NTR3, un récepteur qui s'avéra être la sortiline).

_ La lipoprotéine lipase (LpL), une protéine de 50 kDa que la sortiline est capable de lier et d'internaliser.

_ Le proNGF (précurseur du NGF, nerve growth factor, 31 kDa) pour délivrer un signal de mort cellulaire.

Dans la plupart des types cellulaires, la sortiline est localisée de manière préférentielle au niveau du TGN voire des endosomes (90%). Toutefois, une partie de cette protéine est retrouvée à la membrane et va alors jouer un rôle dans la signalisation intracellulaire. La localisation de la sortiline peut en fait être modulée car lors d'un traitement par insuline des adipocytes, on observe alors la translocation conjointe de Glut4 ou «GLUcose Transporter 4» et de la sortiline vers la membrane (Lin *et al.*, 1997). On retrouve ce type de translocation suite à une activation via la neurotensine (NT). La sortiline/NTR3 va agir pour éliminer par endocytose le LpL ou la NT du milieu extracellulaire et conduire à leur dégradation.

La sortiline/NTR3 est également impliquée dans le tri et l'excrétion de son propeptide et d'autres protéines. Les convertases (PC) étant localisées dans le compartiment post-TGN (Trans-Golgi-Network), la sortiline mature va alors pouvoir se lier au précurseur et assurer son trafic via les voies de sécrétion.

2. Structure de la sortiline

a. Le prodomaine

Toutes les protéines à domaine Vps10p des mammifères contiennent un site de clivage consensus RXXR (Seidah et Chretien, 1997). Ce clivage est nécessaire, dans le TGN, à la meilleure conformation du récepteur pour permettre la liaison du ligand et l'activité fonctionnelle de la sortiline (Munck Petersen *et al.*, 1999). Ce propeptide aurait deux fonctions : tout d'abord prévenir la fixation du ligand sur le récepteur dans la voie de synthèse protéique (rôle de chaperone) et faciliter le transport de la sortiline dans les compartiments précoces de l'appareil de Golgi (Westergaard *et al.*,

2004). Le transport de la sortiline dépourvue du propeptide est bloqué entre le cis et le trans-golgi (Westergaard et al., 2004)

b. Les «10 bladed beta-propeller » : un tunnel pour des ligands

L'étude de l'implication de la sortiline dans la mort/survie neuronale ont permis de comprendre certains mécanismes de reconnaissance récepteur-ligand. En effet, la sortiline lie les formes non matures du NGF et d'autres neurotrophines (proNTs). La structure moléculaire de la sortiline et notamment le site de liaison du proNGF ont été déterminés par cristallographie (Quistgaard et al., 2009 ; Feng et al., 2010). Les « 10-bladed propellers » présents dans le domaine Vps10p forment un large tunnel (diamètre de 25 à 37 Å) (Figure 23) dans lequel vient se «loger» le ligand. Une expérience de co-cristallisation de la sortiline avec la NT3 (NeuroTrophine 3) a identifié un site de liaison au sein de la cavité formée par la sortiline. Par ailleurs, les interactions ligand/récepteur entre les proNTs et la sortiline doivent relever d'un mécanisme plus fin et plus complexe. En effet, une étude récente a permis de démontrer qu'un motif linéaire présent sur la surface des «beta-propellers» de la sortiline participerait à la liaison des proNTs (Serup Andersen et al., 2010).

c. Les domaines riches en cystéines : les 10CC

Il existe 2 segments 10CC (a et b) situés dans la partie C-terminal du domaine Vps10p.

Les 10 résidus cystéines et leur distance les uns par rapport aux autres permettent de former des ponts disulfures. Ces domaines très conservés au sein de la famille des récepteurs à domaine Vps10p sont ainsi impliqués dans la conformation du récepteur et dans l'affinité et capacité à interagir avec les ligands (Westergaard et al., 2004). En effet, les deux domaines 10CC-a et 10CC-b interagissent avec les hélices beta et vont moduler la conformation tridimensionnelle du récepteur. Il a ainsi été démontré que ces domaines jouent un rôle capital pour l'affinité de fixation du proNGF au récepteur sortiline (Westergaard et al., 2004). Par ailleurs, des interactions *in vitro* utilisant une version tronquée de SorLA dépourvue des 10CC a permis de déterminer que ces motifs étaient requis pour la liaison de la protéine RAP au récepteur.

d. Le domaine C-terminal

Le domaine cytosolique de la sortiline et de SorLA contient des motifs spécifiques qui vont être responsables du recrutement de partenaires et de l'adressage du récepteur. De manière proximale par rapport au domaine transmembranaire, on retrouve un motif YXX ϕ . A l'extrémité C-terminale du domaine, on note la présence d'un motif dileucine précédé d'acides aminés acides (Figure 24).

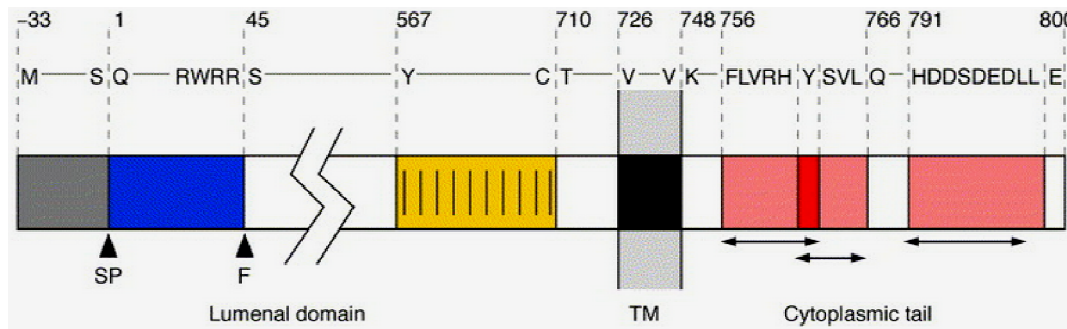


Figure 24. Motifs et domaines présents dans la sortiline humaine (Vincent et al., 1999). Le peptide signal (gris) est situé en aval du pro-domaine (bleu) clivé par la furine (F) après la reconnaissance du motif RWRR. Le motif 10CC ou di-cystéines est situé juste avant le domaine transmembranaire (TM). Dans la queue cytoplasmique, on retrouve trois signaux de transport dont le site YSLV (YXX ϕ) et le motif dileucine (LL).

Le domaine C-terminal contient un résidu de serine qui peut être phosphorylé et soumis à diverses modifications post-traductionnelles intervenant dans les interactions protéiques (Hermey, 2009).

3. Trafic intracellulaire de la sortiline et du MPR

La sortiline est synthétisée sous forme de précurseur avec un propeptide de 44 acides aminés qui joue un rôle dans la conformation de la protéine et dans son transport (Westergaard et al., 2004). Le propeptide est ensuite clivé par une protéase de type subtilisine dans le trans-golgi. La protéine mature active va alors pouvoir emprunter diverses voies du trafic subcellulaire : vers la membrane plasmique (voie constitutive) où elle pourra subir une endocytose dépendante de la clathrine avec le concours du complexe AP2. La sortiline peut également être sécrétée de manière régulée par l'intermédiaire des granules de sécrétion ou vers les endosomes avec dans ce dernier cas l'intervention de la clathrine et des adaptateurs GGA et AP1 (Nykjaer et Willnow, 2012). Le recyclage

de la sortiline des endosomes vers le TGN est réalisé principalement (du moins à partir des EE) par l'action des complexes retromer et AP-1 (Figure 25).

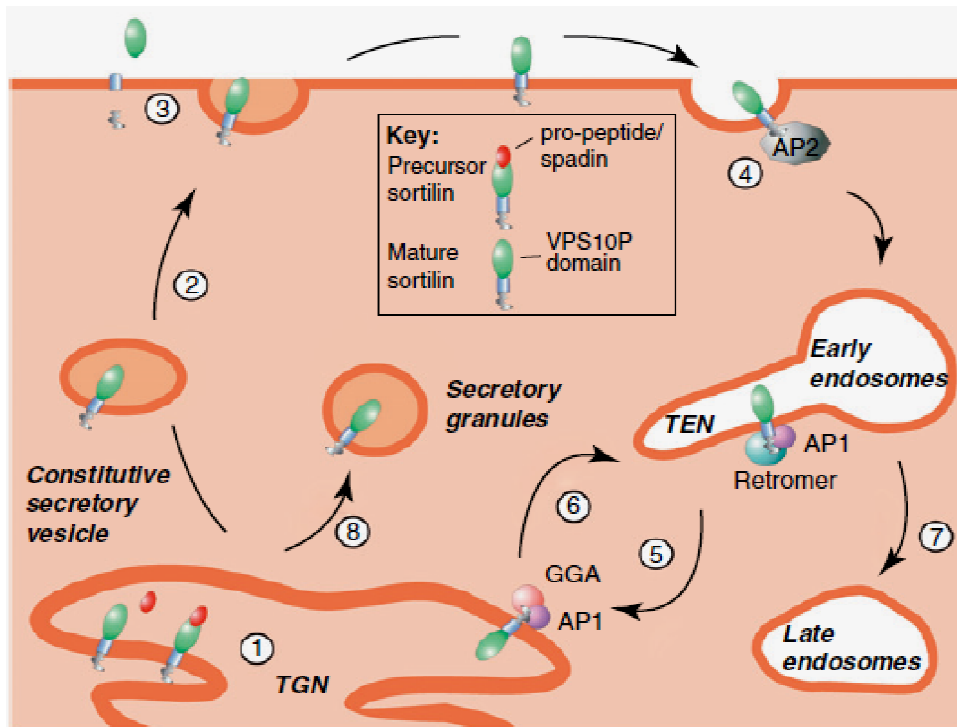


Figure 25. Vue d'ensemble du trafic intracellulaire de la sortiline (d'après Nikjaer et Willnow, 2012).

Les résidus de mannose sur les protéines lysosomales peuvent être reconnus par les MPRs (Mannose-6-phosphate receptor) dans les compartiments trans du golgi. Il existe chez l'Homme deux M6P-R : MPR46 («46 kDa cation dépendant») et MPR300 («300 kDa cation indépendant»). On les retrouve dans le TGN, les endosomes, à la membrane plasmique mais pas dans les lysosomes (Ghosh et al., 2003). Il s'agit de glycoprotéines de type I et les MPR avec leurs ligands vont quitter le TGN dans des vésicules de clathrine (CCVs) qui vont fusionner avec les endosomes. Suite à changement de pH, les complexes se dissocient et le récepteur est alors recyclé au TGN (Ghosh et al., 2003). Chez des patients atteints de mucopolysaccharidose de type II, les motifs M6P sont absents. Cependant, les enzymes lysosomales sont présentes, suggérant une voie alternative et indépendante à ces récepteurs (Dittmer et al., 1999). Il existe de grandes similitudes fonctionnelles et en termes de séquences entre les domaines C-terminaux des MPRs et de la sortiline. Les MPRs et la sortiline utilisent chez la levure et les mammifères les mêmes partenaires cytosoliques pour leur transport.

Chez la levure, la protéine Vps10p est localisée au niveau de l'appareil de Golgi. L'élaboration d'un mutant possédant une protéine Vps10p dépourvue de son domaine cytoplasmique a conduit à l'obtention d'une protéine non fonctionnelle et à une mauvaise localisation de celle-ci dans la vacuole démontrant bien que ce domaine carboxy-terminal soit nécessaire à la localisation et au trafic de la sortiline (Cereghino et al., 1995).

Des séquences enrichies en tyrosines présentes dans le domaine cytoplasmique C-terminal des récepteurs sont capables d'interagir avec des complexes protéiques adaptateurs de la clathrine (Glickman et al., 1989) tandis que des motifs dileucine jouent un rôle dans la sortie du TGN (Johnson et Kornfield, 1992).

Les signaux de transport des MPRs et de la sortiline sont localisés principalement au sein d'un groupe de résidus acides suivi par un motif dileucine (AC-LL) ou DXXL (D : Acide Aspartique ; X : acide aminé quelconque, L : Leucine). Les signaux DXXL sont reconnus par les GGAs et les protéines GGA ou «Golgi-localizing gamma-adaptin ear homology ARF-binding» sont des effecteurs des Arf et sont impliqués dans les transports issus du TGN (Ghosh et Kornfeld, 2004). Des travaux menés chez la levure ont démontré que les GGA interagissent avec la sortiline et le M6PR via leur domaine VHS (Vps27p/Hrs/STAM) qui reconnaît le motif dileucine présent sur ces récepteurs (Takatsu et al., 2001) (Figure 26).

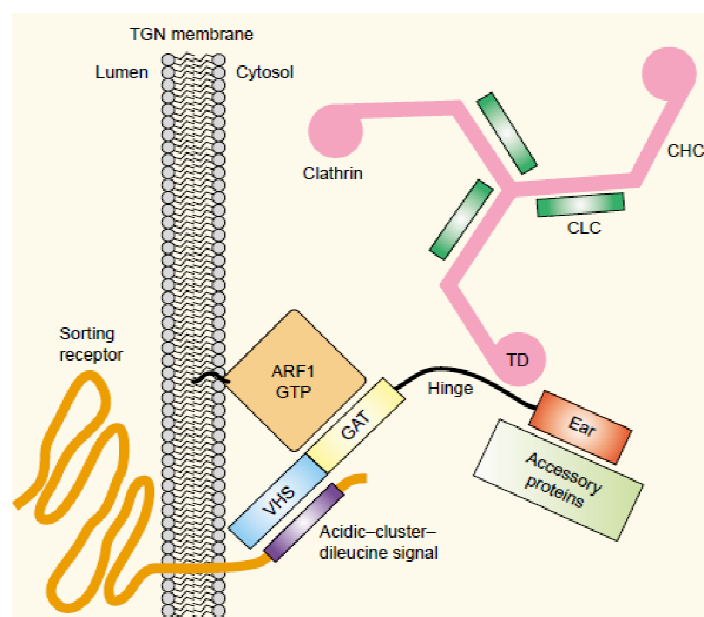


Figure 26. Structure schématique des protéines GGA (d'après Robinson et Bonifacino, 2001).

Le domaine GAT des GGAs (Figure 26) permet le recrutement à la membrane par l'interaction avec les ARF de type I et avec le PI4P (Puertollano, Randazzo et al., 2001). Le domaine GAE permet le recrutement d'une multitude de protéines accessoires permettant la formation, le déplacement et la fusion des vésicules (Figure 26) (Nakayama et Wakatsuki, 2003). Chez la levure, la délétion de GGA1 et GGA2 conduit à un défaut de transport des protéines dans la vacuole (et notamment CPY), ce qui démontre que les GGA sont impliquées dans le trafic du TGN vers les endo-lysosomes (Mullins et Bonifacino, 2001 ; Costaguta et al., 2001). Des expériences de dominant négatif des GGAs entraînent un blocage du MPR au TGN (Puertollano, Aguilar et al., 2001).

L'interaction entre les GGAs et le motifs AC-LL a été démontrée et caractérisée dans de nombreuses études (Takatsu et al., 2001 ; Jacobsen et al., 2002 pour sorLA) et également par des expériences de co-cristallographie (Shiba et al., 2002). Il a ensuite été découvert que les GGAs sont capables de lier l'ubiquitine présente sur les récepteurs cargo (Scott et al., 2004). L'ubiquitine présente sur les protéines transmembranaires agit ainsi comme un signal de routage au travers du système endosomal. Ce mécanisme permettrait aux GGAs de reconnaître et de trier les protéines.

Les protéines GGAs ne sont pas les seules protéines impliquées dans le transport de la sortiline et des MPRs. Les MPRs transitent du Golgi aux endosomes via leur interaction avec les GGAs et/ou AP-1 (Waguri et al., 2003 ; Takatsu et al., 2001 ; Puertollano, Aguilar et al., 2001 ; Zhu et al., 2001) (Figure 27).

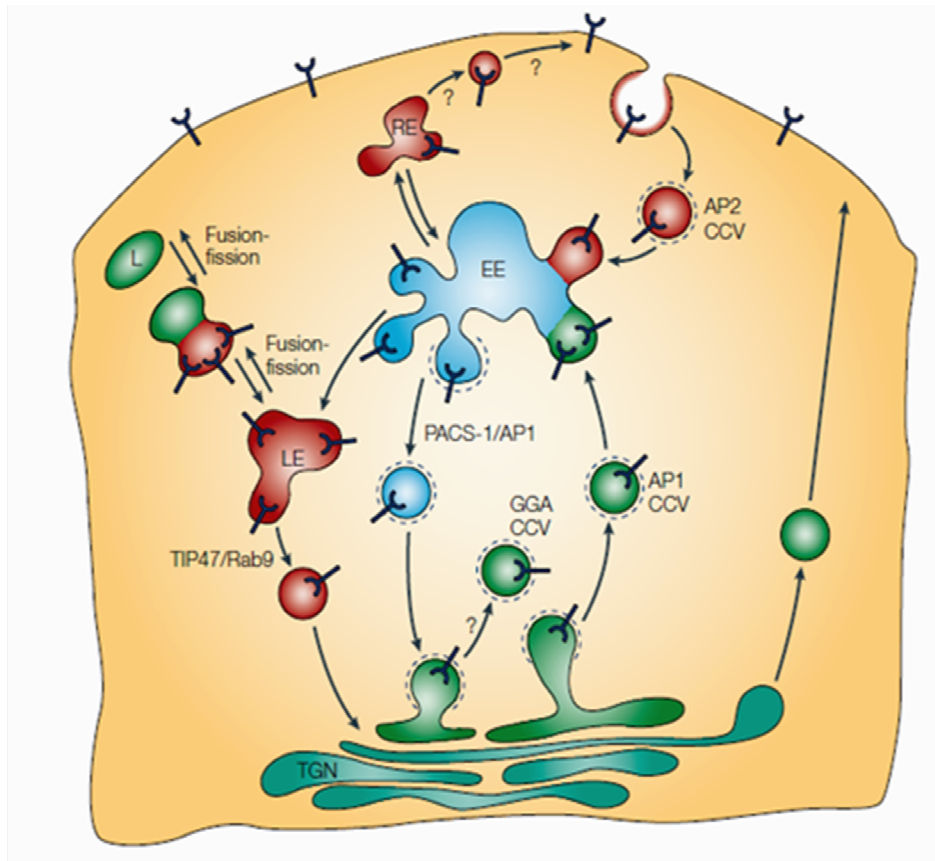


Figure 27. Le trafic intracellulaire des MPRs (d'après Ghosh et al., 2003).

En plus des sites pour les GGA, les MPR possèdent dans leur domaine C-terminal des sites de liaisons pour AP-1 (YXX ϕ ; D/EXXXLL/I). Les protéines GGA sont localisées principalement dans le TGN tandis que le complexe protéique AP-1 est localisé dans le TGN et les endosomes. Le motif YXX ϕ est reconnu par la sous-unité μ 1 (Canuel et al., 2008) et D/EXXXLL/I est reconnu par la sous-unité γ - σ . AP-1 lie également les GTPases ARF de type I et le PI4P. Le domaine γ du complexe AP-1 est similaire en termes de structure et fonction avec le domaine GAE des GGAs. Le rôle des GGAs et du complexe AP-1, leur éventuelle coopération est encore un débat à l'heure actuelle.

Des travaux ont permis d'établir le rôle des deux complexes protéiques impliqués dans le trafic. L'investigation chez la levure puis dans des cellules humaines a en outre révélé que la sortiline interagit avec Vps35 et μ 1-adaptin (Canuel et al., 2008). La sortiline est capable de se lier au complexe retromer et AP-1 avec une interaction de la protéine vps35 du retromer avec le récepteur (Arighi et al., 2004). Des expériences de mutagenèses dirigées ont montré qu'un motif YSVL (YXX ϕ) présent dans la partie N-terminale du domaine C-terminal (789-799) était responsable de l'interaction avec le retromer. Des expériences de siRNA sur Vps26 entraînent un blocage de la sortiline au niveau

des endosomes. Le siRNA de mu1 entraîne la rétention dans le TGN de la sortiline. Le « pro-saposin » ou ligand de la sortiline et cathepsine B (ligand du M6PR) sont tous les deux affectés par les siRNA, ce qui indique un mécanisme de transport commun aux deux récepteurs. Très récemment, il a été démontré que la protéine Vps26 se lie au motif FLV présent dans le domaine C-terminal de la sortiline (Fjorback et al., 2012)

Les GGA et AP-1 sont deux adaptateurs pour le trafic intracellulaire médié par la clathrine et dans le cas du complexe AP-1, c'est la sous-unité β qui interagit avec celle-ci. Des études menées sur des souris déficientes pour la sous-unité $\mu 1$ de AP-1 ont montré que ce complexe joue également un rôle dans le transport rétrograde des protéines (Meyer et al., 2000) (Figure 26)

Les relations exactes qui peuvent exister entre les deux types d'adaptateurs GGA et AP-1 restent à élucider. Toutefois, une coopération entre ces deux adaptateurs dans la formation des vésicules contenant les MPRs au niveau du TGN a été décrite (Doray et al., 2002). Par ailleurs, ces adaptateurs sont présents dans des vésicules de clathrine différentes et ils fonctionnent de manière indépendante avec un recrutement séquentiel des deux adaptateurs (Hirst et al., 2009 ; Daboussi et al., 2012).

Parmi les protéines accessoires qui vont se fixer sur les adaptateurs et permettre le trafic intracellulaire des récepteurs vers les endosomes, on peut citer Rab31 qui est requis pour le transport des MPRs du TGN aux endosomes (Rodriguez-Gabin et al., 2009). La sortiline s'associe de manière spécifique avec Rab7b et non avec Rab7 et Rab9 (Progida et al., 2012). Rab7b est localisée au niveau des endosomes et du TGN. La déplétion de cette protéine entraîne un problème de recyclage des récepteurs sortiline et M6PR. Cette GTPase permettrait donc le recyclage des récepteurs M6PR et sortiline au TGN après qu'ils aient délivré leurs partenaires (Progida et al., 2012).

Le lieu ainsi que le moment de la dissociation exact du récepteur et de son ligand est encore un sujet de débat. Ainsi, cela semble pouvoir avoir lieu dans un compartiment intermédiaire entre les endosomes précoces et tardifs ou dans les endosomes tardifs eux-mêmes.

Le recyclage du récepteur fait intervenir le retromer et AP-1 dans la phase précoce (discuté ci-dessus) et Rab9-TIP47 dans la phase tardive (Figure 27). La protéine TIP47 est essentielle au transport rétrograde du récepteur en agissant en coopération avec Rab9 (Diaz et Pfeffer, 1998 ; Hanna et al., 2002 ; Johannes et Popoff, 2008). D'autres protéines ont été impliquées dans le transport rétrograde des MPR des endosomes au TGN comme la clathrine, AP-1, des golgines, des protéines SNAREs,

etc... (Mallard et al., 2002 ; Derby et al., 2007 ; Amessou et al., 2007). Le transport rétrograde des MPRs à la membrane fait intervenir le motif YXX ϕ présent dans la séquence protéique du récepteur et ce motif est reconnu cette fois par le domaine μ d'AP-2. Le processus de recyclage des récepteurs à domaine Vps10 est conservé (Mari et al., 2008). Des relations entre le transport rétrograde des récepteurs Vps10 et des maladies ont été mises en exergue. Ainsi, un défaut dans la voie de transport rétrograde de sorLA serait impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Rogaeva et al., 2007). La clathrine et la dynamine sont impliquées dans la voie de recyclage des protéines comme le démontre les expériences menées sur la sous-unité B de la toxine de Shiga STxB (Lauvrak et al., 2004 ; Saint-Pol et al., 2004). EpsinR est requis pour le transport rétrograde des MPR et de STxB (Saint-Pol et al., 2004). Il interagit avec la clathrine, AP-1, les GGAs et le PI4P. EpsinR modulerait la dynamique post-golgienne en interagissant avec certaines protéines SNARE (Miller et al., 2007).

Le retromer formé des protéines Vps26-Vps29-Vps35 est impliqué dans le recyclage des MPRs des endosomes au TGN (Arighi et al., 2004 ; Seaman 2005). Il existe deux isoformes de Vps26 : Vps26a qui est ubiquitaire et présente au niveau des endosomes et Vps26b abondante dans le cerveau au niveau de la membrane plasmique. Des expériences menées notamment sur des souris dépourvues de Vps26b ont permis de démontrer que cette protéine et le complexe retromer sont impliqués dans le transport de la sortiline (Kim et al., 2010)

Le retromer est composé comme suit : la structure allongée de Vps35 sert d'échafaudage pour lier Vps26 et Vps29 (Hierro et al., 2007). Le retromer est constitué d'un dimère de SNX (sorting nexin) et un trimère composé de Vps35-26-29. Chez la levure les SNX sont Vps5 et Vps17 tandis que dans les cellules de mammifères le dimère de SNX peut-être composé des SNX1,2, 5 et 6 (Cullen et Korswagen, 2012 ; Dacks et al., 2008). Les protéines SNX lient les régions de courbures des endosomes précoces grâce à leurs domaines PX (Phox homology) et BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) (Bonifacino et Hurley, 2008). Vps26 possède des homologies structurales avec les arrestines, des protéines faisant le lien entre les protéines G couplées aux récepteurs et la clathrine. Vps29 est semblable à une métalloprotease mais semble dépourvue d'activité catalytique (Cullen et Korswagen, 2012 ; Dacks et al., 2008). Certaines modifications post-traductionnelles sont indispensables pour permettre le transport rétrograde. Par exemple, sans la palmitoylation, la sortiline ou le MPR ne peut interagir avec le complexe retromer (McCormick et al., 2008).

4. La sortiline, un récepteur aux multiples fonctions

a. La sortiline comme récepteur impliqué dans le métabolisme

La protéine GLUT4 est un transporteur de glucose à 12 domaines transmembranaires localisée dans les muscles et le tissu adipeux. Ce transporteur est séquestré dans la cellule dans des structures appelées les GSVs (GLUT4 storage vesicles). La sortiline est colocalisée avec le récepteur au glucose Glut4 dans les adipocytes et est présente au niveau des GSV (Shi et Kandror, 2005) qui contiennent : GLUT4, SORT1, IRAP (Insuline responsive aminopeptidase), LRP1 (lipoprotein receptor-related protein 1), SORL1, et VAMP2. Ces vésicules résultent du bourgeonnement du TGN ou d'un transport rétrograde après endocytose du récepteur. Après stimulation par l'insuline, les GSVs vont être transportées sur les microtubules (MT) et permettre l'adressage à la membrane du GLUT4 pour faciliter l'absorption du glucose. La biogenèse de ces GSV et la redistribution des GLUT4 sont dépendants de l'expression de la sortiline qui joue des fonctions essentielles dans les adipocytes (Shi et Kandror, 2005).

D'un point de vue épidémiologique, il a été démontré que les taux de sortiline sont faibles dans les tissus adipeux et les muscles squelettiques chez les patients atteints d'obésité (Strong et Rader, 2012). Par ailleurs, il existe une corrélation établie entre le taux de sortiline et les problèmes de transport du glucose dans les adipocytes et les muscles (Kaddai *et al.*, 2009). Toutes ces observations suggèrent que la sortiline jouerait un rôle capital concernant la physiopathologie du diabète et des maladies métaboliques. En effet, la sortiline interagit via son domaine Vps10p avec la première boucle luminaire de GLUT4 et il a été montré que le domaine luminal de la sortiline ainsi que la présence de la première boucle dans la protéine GLUT4 sont essentiels à la réponse à l'insuline. (Shi and Kandror, 2007 ; Kim et Kandror, 2012). Le trafic de GLUT4 résulte d'un recrutement de la protéine adaptatrice GGA2 par la sortiline au niveau du TGN et cette protéine GGA2 reconnaît donc la sortiline mais son attachement à la vésicule est ensuite favorisé par l'ubiquitination de GLUT4 avec une interaction avec ACAP1, un autre adaptateur de la clathrine qui lie ARF6 (Takatsu *et al.*, 2002). . Il existe une corrélation entre le taux d'expression de la sortiline dans le foie et la survenue d'infarctus du myocarde (Strong *et al.*, 2012). Par ailleurs, il a été démontré dans un modèle murin, qu'une

quantité élevée de sortiline présente dans le foie permet de réduire le taux de LDL-C dans le sang. La sortiline présente au niveau de l'appareil de Golgi s'associe avec les apoB et celle présente à la membrane s'associe avec les LDL. Le récepteur va ensuite amener ces ligands aux lysosomes pour dégradation. De fait, la sortiline participe à la diminution de la sécrétion en apolipoprotéine B (apoB) et augmente également le catabolisme des LDL par un adressage de ces protéines aux lysosomes (Strong et al., 2012).

Parmi les ligands métaboliques de la sortiline, on trouve aussi la lipoprotéine lipase (LpL) qui est une enzyme capable d'hydrolyser les triglycérides au niveau des muscles et du tissu adipeux. Une fois associée au récepteur, elle va être entraînée vers la dégradation (Nielsen et al., 1999).

b. La sortiline et ses fonctions associées dans le système nerveux

La sortiline est impliquée dans de multiples maladies neuro-dégénératives ou encore dans la dépression (Nykjaer et Willnow, 2012 ; Mazella et al., 2010). Les taux de proNGF (ligand de la sortiline) et de la sortiline sont corrélés à des pathologies parmi lesquelles on trouve la maladie de Parkinson et d'Alzheimer.

Les neurotrophines (NTs) sont des molécules essentielles à la survie et à la différenciation des cellules du système nerveux. On retrouve dans cette famille de protéines des facteurs tels que le NGF, le BDNF, la neurotrophine 3 (NT3) et NT4. L'activité des NTs est régulée par deux types de récepteurs : les Trk (A, B, et C Trk pour Tropomyosine-related kinase receptors) et le p75 (neurotrophine receptor). Les NTs existent sous deux formes : comme précurseur et mature après clivage protéolytique. Les deux formes ont globalement des effets antagonistes dans leurs activités. Ainsi, les formes matures du NGF et du BDNF induisent des effets anti-apoptotiques et leurs précurseurs des effets pro-apoptotiques. Dès lors, le contrôle du relargage des NTs et/ou leur clivage peut constituer la clé du devenir cellulaire dans le système nerveux.

La sortiline lie le proBDNF au niveau du TGN et conduit à sa libération via des vésicules de sécrétion (Chen et al., 2005) ou à son acheminement vers la dégradation lysosomale (Evans et al., 2011). L'orientation vers telle ou telle voie dépendrait alors de la présence d'une protéine sur le complexe

SORT/proBDNF, la protéine HAP1 (Huntington-associated protein 1) ou du propeptide libre de la sortiline (Yang et al., 2011 ; Evans et al., 2011).

Le complexe p75NTR/sortilin est crucial dans la régulation de la mort cellulaire via le proNGF/NGF. Les effets proapoptotiques du proNGF passent par une interaction directe entre le p75NTR, l'un des récepteurs du NGF, et la sortiline (Nykjaer *et al*, 2004). La sortiline est le co-récepteur du p75NTR pour l'action proapoptotique activée par le proNGF alors que l'association du NGF au complexe TrkA-p75NTR conduit à la survie cellulaire. Le prodomaine du NGF est en fait capable de lier la sortiline, ce qui permet l'interaction de la région mature au p75NTR. En absence de la sortiline, le proNGF est incapable d'interagir avec p75NTR. Le NGF mature va pouvoir interagir avec p75NTR/TrkA. La présence de la sortiline à la surface neuronale (en complexe avec p75NTR) va donc moduler l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire. En outre, le pro-NGF stimule la migration de cellules de mélanome (A875) qui expriment un niveau élevé de sortiline et de p75 (Shonukan et al., 2003).

Le complexe p75NTR/sortiline est également impliqué dans la mort cellulaire par le proBDNF et le proNT3 (Teng et al., 2005 ; Yano et al., 2009).

Le contrôle de la quantité de sortiline présente à la surface cellulaire permet les transductions des signaux concernant la mort cellulaire. Par exemple, il a été décrit que la répartition de ce récepteur joue un rôle important dans l'embryogenèse de la rétine (Nakamura et al., 2007). Ce contrôle ferait intervenir des partenaires protéiques particuliers qui orienteraient la destinée surface/lysosome de la sortiline (Kim et Hempstead 2009).

La sortiline est un co-récepteur majeur dans les dendrites. Elle peut également se lier au prodomaine de la neurotensine dans l'appareil de Golgi et serait alors en mesure de l'acheminer jusqu'à la membrane cellulaire. La sortiline forme également un complexe avec le récepteur 1 de la Neurotensine (Neurotensine receptor 1, un récepteur à sept domaines transmembranaires) dans les cellules d'adénocarcinome de côlon humain HT29 (Martin *et al.*, 2002). Dans ce cas, la sortiline module l'intensité du signal induit par la Neurotensine puisque l'interaction sortiline-NTR1 diminue l'activité de la voie de signalisation intrinsèque du NTR1, activité qui fait intervenir les MAP kinases et la phospholipase C. Dans un autre travail, les auteurs ont pu récemment démontrer que la sortiline assure le transport des récepteurs Trk dans la voie de trafic antérograde induisant ainsi la

signalisation des neurotrophines qui peuvent alors jouer leur rôle dans la survie neuronale (Vaegter et al., 2011).

D'autres activités neuronales pour la sortiline ont été relevées et sont également à l'étude comme son rôle d'amplificateur de la voie STAT3 par le CNTF (Ciliary NeuroTrophic Factor) ou sa fonction dans la voie du PGRN (ProGRaNulin) (Larsen et al., 2010 ; Hu et al., 2010).

PROBLEMATIQUE

La toxoplasmose représente l'une des infections les plus répandues et ubiquitaires dans le monde. La primo-infection chez la femme enceinte peut causer des dommages importants ou la mort *in utero* des fœtus. La réactivation d'une infection latente dans des conditions d'immunodéficiences comme chez les patients atteints du SIDA ou après des transplantations d'organes peut entraîner des encéphalites toxoplasmiques. La toxoplasmose est également une cause majeure de rétiniochorioidites. *Toxoplasma gondii* et tous les parasites Apicomplexa ont développé un arsenal d'organites de sécrétions uniques qui contiennent des facteurs essentiels pour l'invasion et la modulation des cellules hôtes (Carruthers et Boothroyd, 2007). La présence de ces organites et de leurs protéines traduisent probablement une évolution et une adaptation vers le parasitisme car l'invasion et la virulence des parasites dépendent de la sécrétion efficace, séquentielle et régulée des protéines des micronèmes et des rhoptries. Ainsi, l'adressage des protéines dans ces organites de sécrétion, leur biogenèse et fonctions sont des événements biologiques essentiels pour le parasite. Les protéines des rhoptries et des micronèmes sont transportées via des compartiments d'un système de type endolysosomal dans lequel on observe des maturations protéolytiques et des séquences motifs ont été retrouvées et pourraient expliquer le ciblage des protéines vers ces organites (Joiner et Roos, 2002 ; Sheiner et Soldati., 2008 ; Ngô et al., 2003 ; Harper et al., 2006 ; Parussini et al., 2010). Les parasites Apicomplexa se répliquent par bourgeonnement à partir de ou au sein d'une cellule mère, et les organites de sécrétion sont alors synthétisés *de novo*. Actuellement, les bases moléculaires de la biogenèse de ces organites sont peu connues. Le trafic vers ces organites dépend du « timing » de l'expression des protéines au cours du cycle de vie du parasite, ce qui établit une corrélation entre le trafic des protéines et la biogenèse des organites.

De nombreux travaux ont étudié le transport des protéines et les avancées sur la compréhension du trafic intracellulaire des parasites suggèrent une intervention d'un récepteur putatif qui serait capable de discriminer et de transporter les protéines vers les micronèmes (Gaij et al., 2011) ou les rhoptries (Richard et al., 2009). Au début de ma thèse, les récepteurs permettant de lier, de trier et d'acheminer les protéines vers les organites cibles étaient inconnus.

Dans une étude précédente du laboratoire, une protéine avec un domaine Vps10p avait été identifiée et cette protéine est apparue alors comme le candidat idéal pour assurer cette fonction d'un récepteur

de tri et d'adressage moléculaire. En effet, comme le récepteur au mannose-6-phosphate (M6PR) n'a pas été identifié chez *T. gondii* et les autres parasites Apicomplexa et que la sortiline est connue chez les eucaryotes pour être un récepteur alternatif au M6PR dans le trafic intracellulaire de protéines, nous avons décidé d'explorer les fonctions biologiques de ce récepteur chez le parasite.

RESULTATS

I. TgSORTLR est essentielle pour le transport protéique et la biogenèse des organites de sécrétion

En utilisant la chromatographie d'affinité avec de la lectine couplée à de la spectrométrie de masse, nous avons préalablement identifié une protéine orthologue aux sortilines connues chez les mammifères. Nous avons alors nommé cette protéine *T. gondii* Sortilin-Like Receptor (TgSORTLR ; Fauquenoy et al., 2008).

TgSORTLR possède un ectodomaine N-terminal très similaire aux sortilines référencées. Ce domaine a pour fonction chez les autres eucaryotes d'interagir avec les protéines que la sortiline va prendre en charge et trier. Le domaine cytoplasmique C-terminal de TgSORTLR est beaucoup plus divergent des orthologues des cellules de mammifères mais cette extrémité cytosolique est très conservée chez les parasites Apicomplexa. Ainsi l'étude de TgSORTLR peut conduire à développer les connaissances fondamentales sur les sortilines et permettre d'élucider les voies cellulaires et moléculaires spécifiques du trafic des protéines ainsi que la biogenèse des organites qui renferment des facteurs parasitaires importants pour la virulence et permettre le développement de nouvelles stratégies vaccinales et médicamenteuses antiparasitaires.

Dans la première partie de ma thèse, nous avons exploré les fonctions biologiques de TgSORTLR. Nous avons démontré que TgSORTLR est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et des vésicules post-golgiennes et se lie aux protéines de micronèmes et de rhoptries via son domaine luminal N-terminal. Le domaine cytosolique C-terminal de TgSORTLR est capable d'interagir avec divers composants de la machinerie de transport vésiculaire, ce qui permet probablement d'empaqueter les protéines de rhoptries et de micronèmes dans des vésicules à destination des organites de sécrétion apicaux. TgSORTLR assure donc les fonctions essentielles de trafic des protéines impliquées dans la virulence parasitaire et dans la biogenèse des organites apicaux chez *T. gondii*. Ces travaux ont donné lieu à la publication ci-dessous.

ARTICLE

***Toxoplasma* Sortilin-like Receptor Regulates Protein Transport and Is Essential for Apical Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection**

Pierre-Julien Sloves, Stephane Delhay, Thomas Mouveaux, Elisabeth Werkmeister, Christian Slomianny, Agnes Hovasse, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, Isabelle Callebaut, Rajshekhar Y. Gaji, Christine Schaeffer-Reiss, Alain Van Dorsselaer, Vern B. Carruthers, Stanislas Tomavo

Cell Host & Microbe - 17 May 2012 (Vol. 11, Issue 5, pp. 515-527)

Toxoplasma Sortilin-like Receptor Regulates Protein Transport and Is Essential for Apical Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection

Pierre-Julien Sloves,¹ Stephane Delhaye,¹ Thomas Mouveaux,¹ Elisabeth Werkmeister,¹ Christian Slomianny,² Agnes Hovasse,³ Tchilabalo Dilezitoko Alayi,³ Isabelle Callebaut,⁴ Rajshekhar Y. Gaji,⁵ Christine Schaeffer-Reiss,³ Alain Van Dorsselaar,³ Vern B. Carruthers,⁵ and Stanislas Tomavo^{1,*}

¹Center for Infection and Immunity of Lille, CNRS UMR 8204, INSERM U 1019, Institut Pasteur de Lille, Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

²Laboratory of Cell Physiology, INSERM U 1003, Université Lille Nord de France, Villeneuve d'Ascq, France

³Laboratory of Mass Spectrometry, IPHC, CNRS UMR 7178, Université de Strasbourg, 67087 Strasbourg, France

⁴Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés, CNRS UMR 7590, Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

⁵Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109, USA

*Correspondence: stan.tomavo@pasteur-lille.fr

DOI 10.1016/j.chom.2012.03.006

SUMMARY

Apicomplexan parasites have an assortment of unique apical secretory organelles (rhoptries and micronemes), which have crucial functions in host infection. Here, we show that a *Toxoplasma gondii* sortilin-like receptor (TgSORTLR) is required for the subcellular localization and formation of apical secretory organelles. TgSORTLR is a transmembrane protein that resides within Golgi-endosomal related compartments. The luminal domain specifically interacts with rhoptry and microneme proteins, while the cytoplasmic tail of TgSORTLR recruits cytosolic sorting machinery involved in anterograde and retrograde protein transport. Ectopic expression of the N-terminal TgSORTLR luminal domain results in dominant negative effects with the mislocalization of both endogenous TgSORTLR as well as rhoptry and microneme proteins. Conditional ablation of TgSORTLR disrupts rhoptry and microneme biogenesis, inhibits parasite motility, and blocks both invasion into and egress from host cells. Thus, the sortilin-like receptor is essential for protein trafficking and the biogenesis of key secretory organelles in *Toxoplasma*.

INTRODUCTION

The phylum Apicomplexa contains some of the most deadly pathogens of medical and veterinary importance, including *Plasmodium* (malaria), *Eimeria* (coccidiosis), and *Toxoplasma gondii*, which pervasively infects humans. As an obligate intracellular pathogen, *T. gondii* is capable of actively invading a wide range of nucleated host cells, wherein it replicates in a parasitophorous vacuole (PV). In addition to the canonical eukaryotic organelles, such as a central nucleus surrounded by an

extensive endoplasmic reticulum (ER) and a single Golgi situated in the proximal anterior region, *T. gondii* has three other morphologically distinct, specialized secretory organelles called micronemes, rhoptries, and dense granules that typify apicomplexan parasites (Pelletier et al., 2002; Boothroyd and Dubremetz, 2008). Whereas dense granule proteins are secreted constitutively, rhoptry (ROP) and microneme (MIC) contents are sequentially released upon binding to the host-cell surface and during the subsequent invasion phase in a highly regulated manner. Microneme proteins are not only crucial for binding to the host cell prior to entry, but are also essential for parasite gliding motility that drives active invasion (Huynh and Carruthers, 2006). Rhoptry secretion establishes the PV and delivers key virulence factors that modulate immune responses and other vital cellular functions (Boothroyd and Dubremetz, 2008).

T. gondii ROP and MIC proteins navigate through the ER, Golgi, and endosome-like organelles prior to being packaged into their respective apical secretory organelles (Ngô et al., 2003; Harper et al., 2006). A few components of the *T. gondii* vesicle budding, transport, and fusion machinery have been partially characterized (Chaturvedi et al., 1999; Hager et al., 1999; Stedman et al., 2003), and tyrosine-based endosomal sorting signals and associated adaptor complexes have been described (Hoppe et al., 2000). Also, a large dynamin-like GTPase, DrpB, expressed in the cytoplasm near the Golgi is required for the biogenesis of secretory organelles of *T. gondii* (Breinich et al., 2009). While these studies suggest that *T. gondii* possesses machinery involved in vesicular trafficking through the Golgi, endosomal system, and the secretory system, precisely how proteins are guided through these endomembranous structures remains poorly understood. Similar to virtually all other unicellular eukaryotes, *T. gondii* and other apicomplexans lack a mannose-6-phosphate receptor for sorting to the endosomal pathway. Although *T. gondii* possesses two putative plant-like vacuolar sorting receptors (TgVSR1 and TgVSR2), neither appear to be necessary for the protein trafficking to apical organelles based on expression and knockout experiments (R.Y.G. and VBC, unpublished data). Sortilin, also known as VPS10 in yeast, is a type I single pass transmembrane cargo

receptor that functions in mannose-6-phosphate independent sorting to the endolysosomal system. Expressed in a number of vertebrate tissues, notably brain, spinal cord, testis, and skeletal muscle, sortilin also functions as a surface coreceptor for induction of neural apoptosis in the brain (Kim and Hempstead, 2009) and is linked to type 2 diabetes (Clee et al., 2006) and Alzheimer's disease (Rogaeva et al., 2007). However, mice or yeast deficient in sortilin/VPS10 are viable and show relatively mild phenotypes (Marcusson et al., 1994; Jansen et al., 2007). Here, we demonstrate that a *Toxoplasma gondii* sortilin-like receptor, TgSORTLR is a major cargo receptor that is essential for protein trafficking, the biogenesis of apical secretory organelles, and the development of host infection and pathogenicity. Our findings illustrate a key role for an endolysosomal cargo receptor in protein shepherding through the exocytic system and also point toward the indication that, unlike yeast and higher eukaryotes, lower branching eukaryotes, including pathogenic species, lack redundant mechanisms for protein trafficking.

RESULTS

T. gondii Sortilin-like Receptor Resides in the Golgi and Endosomal-Related Compartments

Using concanavalin-A lectin affinity purification and mass spectrometry, we previously identified a *T. gondii* ortholog of mammalian sortilin (TgSORTLR), which copurified with several ROP and MIC proteins involved in host cell invasion (Fauquenoy et al., 2008). Cloning and sequencing the full-length cDNA revealed a 962 amino acid protein with predicted molecular mass of 105 kDa. Interestingly, TgSORTLR itself is not *N*-glycosylated (Fauquenoy et al., 2008, 2011), suggesting that it bound to the lectin column via interactions with ROP and MIC glycoproteins. This notion is also supported by the high degree of similarity of TgSORTLR to mammalian sortilins (Figures 1A and S1A), which are well known for their protein-binding capabilities. The luminal domain of TgSORTLR exhibits conserved ten-bladed propellers (blades A to J) and two small 10-cysteine domains (10CCa and 10CCb), which interact with the β -propeller and influence ligand binding (Figures 1A and S1A; Quistgaard et al., 2009). Modeling of the 3D structure of TgSORTLR luminal domain also showed striking specific structural features that are shared by sortilin homologs of other apicomplexans (Figures S1B and S1C). These unique features include sequence insertions organized as three large loops in the luminal cargo-binding domain (inserts 1 to 3, Figures 1A and S1A). Additionally, the C-terminal tail of TgSORTLR contains an acidic cluster and a dileucine motif (Figures 1A and S1D), which in mammalian sortilin are crucial for intracellular sorting (Hermey, 2009).

Antibodies to recombinant TgSORTLR recognized a ~105 kDa protein in *T. gondii* lysate (Figure 1B). Confocal imaging of intracellular parasites stained with anti-TgSORTLR revealed labeling in the Golgi region (Figures 1C and 1D). Indeed, analysis of confocal images showed that $73 \pm 6\%$ of TgSORTLR colocalizes with GRASP-RFP, a marker of *T. gondii* cis-medial Golgi (Figures 1D and 1E; Pelletier et al., 2002). Three-dimensional reconstructions from confocal images confirmed the presence of TgSORTLR in the Golgi (Movie S1). In addition, we showed that TgSORTLR also colocalized significantly with markers of the TGN (GalNAcT), early endosomes (Rab5a), late

endosomes (VP1 and Rab7), and a lysosomal-related compartment (CPL), with colocalization estimated at 70%, 65%, 62%, and 40%, respectively (Figures 1D and 1E). In contrast, TgSORTLR showed little colocalization with the ER marker HDEL-RFP (10%) or the dynamin DrpB (3%) (Figures 1D and 1E). Cryoimmuno-electron microscopy (cryo-IEM) of TgSORTLR in intracellular parasites ectopically expressing TgSORTLR-cMyc (Figure 1F, left panel) or endogenous wild-type protein (Figure 1F, middle panel) confirmed Golgi cisternae. Some of the labeled components seen by cryo-IEM (e.g., Figure 1F, middle panel) resembled the tubular post-Golgi structures noted by Harper and colleagues (Harper et al., 2006). TgSORTLR was also seen by cryo-IEM in membrane vesicles in the central anterior region (Figure 1F, right panel), suggesting that a significant proportion of TgSORTLR may localize beyond the Golgi, likely in the *trans*-Golgi Network (TGN) and/or endosome-like compartments. We therefore conclude that the Golgi and endosomal localization of TgSORTLR defines it as a plausible candidate type I transmembrane receptor for protein sorting and trafficking through the endocytic/exocytic system of *T. gondii*.

TgSORTLR Is a Cargo Receptor that Binds ROP and MIC Proteins

The localization of TgSORTLR in Golgi and endosome-like compartments prompted us to identify its protein ligands. Live parasites were crosslinked with the reduction sensitive, cell-permeable crosslinker dithiobis succinimidyl propionate (DSP) (Fauquenoy et al., 2011). A detergent extract was immunoprecipitated with anti-TgSORTLR beads, and the eluted protein complexes (Figure S2A) were identified by mass spectrometry as microneme MIC1, MIC4, and rhoptry ROP1, ROP2, ROP4 and ROP5 proteins (Table S1). Our analysis revealed seven TgSORTLR peptides (Table S1), including two that were modified by DSP (Figures S2B and S2C). One DSP-modified peptide from ROP5 was also identified (Figure S2D). Furthermore, incubation of parasite extracts with recombinant luminal domain rTgSORTLR₃₇₋₇₈₉ fused to GST confirmed binding to MIC4, ROP2, and ROP4 proteins and further revealed interactions with microneme proteins MIC5 and MA2P (Figure S2E). In contrast, rTgSORTLR₃₇₋₇₈₉ did not bind GRA3. GST alone also failed to bind any of the MIC or ROP proteins examined. Furthermore, we showed that TgSORTLR colocalizes partially with MIC5 (Figure 2B, merge), ROP1 (Figure 2C, merge), and ROP5 (Figure S2F) using confocal microscopy. Rhoptries and micronemes are made de novo in daughter parasites undergoing replication, and their resident proproteins are subjected to proteolytic processing within endosomal compartments (Carey et al., 2004; Harper et al., 2006; Parussini et al., 2010). Using antibodies specific to propeptides of ROP4 and MIC5 proteins, we also found that TgSORTLR partially colocalizes with the pro-ROP4 and proMIC5, respectively, within the proximal anterior region (Figures S2G and S2H). However, the level of colocalization between TgSORTLR and proROP4 or proMIC5 varies considerably from one vacuole to another (Figures S2G and S2H), suggesting potential transient interactions that may occur in a cell-cycle dependent manner. Collectively, these data suggest TgSORTLR is a cargo receptor that interacts physically with ROP and MIC proteins in the Golgi-endosomal compartments of *T. gondii*.

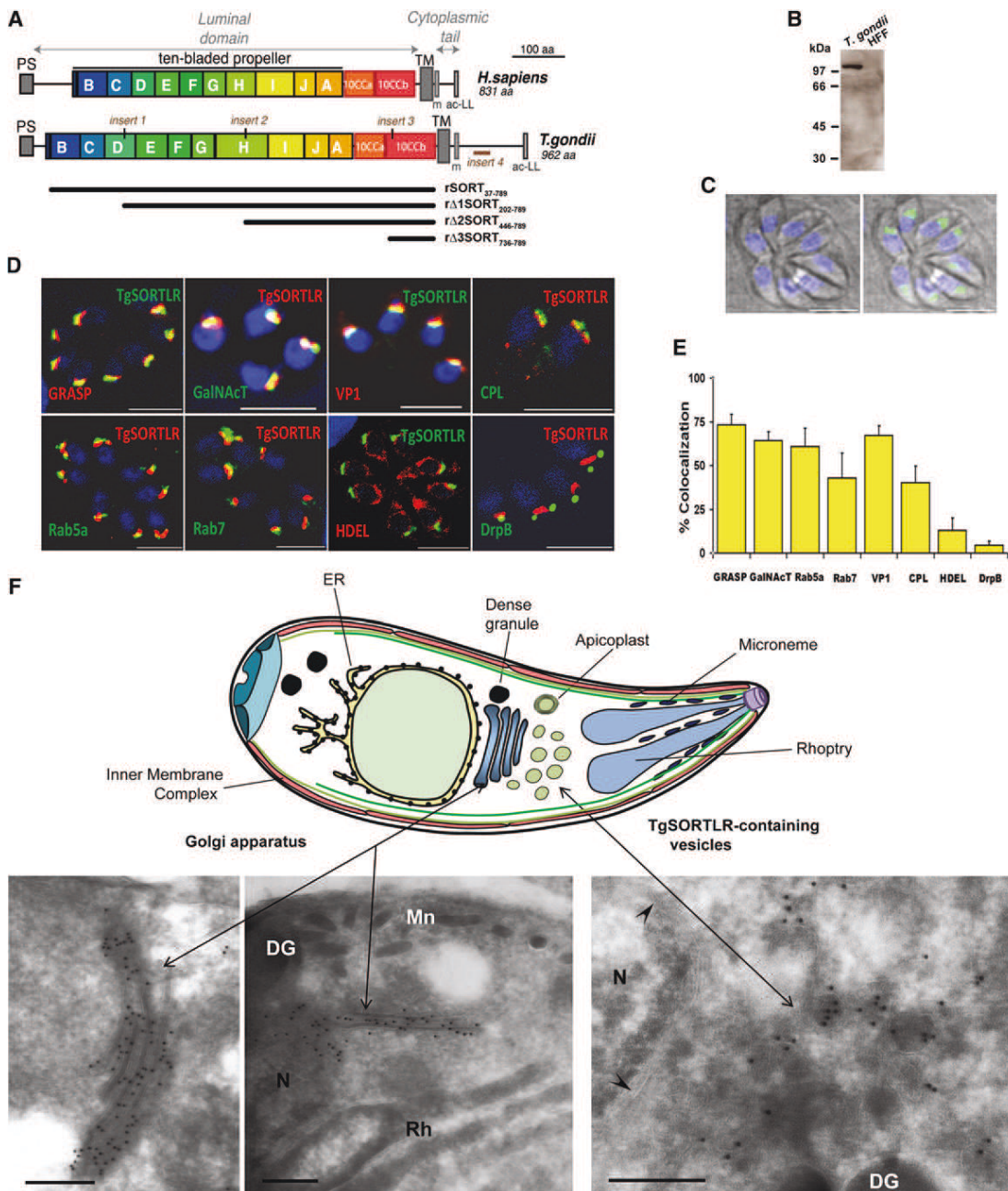


Figure 1. *T. gondii* Sortilin-like Receptor Resides in the Golgi and Endosome-Related Structures

(A) Schematic representations of key domains of human sortilin, TgSORTLR, the luminal domain of TgSORTLR, and its truncated versions fused to GST. PS, peptide signal; TM, transmembrane; m, membrane-adjacent motif; ac-LL, acidic cluster-dileucine motif. See also Figure S1.

(B) Immunoblot probed with mouse polyclonal anti-TgSORTLR antibodies reveals a single protein of ~105 kDa in *T. gondii* whereas no protein was detected in human foreskin fibroblast (HFF) cell extract.

(C) Localization of TgSORTLR by confocal images using the mouse polyclonal anti-TgSORTLR antibodies. Bars, 5 μ m.

(D) TgSORTLR colocalized with Golgi-endosomal and trafficking markers (see also Movie S1). Intracellular *T. gondii* tachyzoites stably expressing GRASP-RFP (*cis*-Golgi and medial Golgi), HDEL-RFP (endoplasmic reticulum), and DrpB-YFP (Golgi proximal cytoplasmic inclusion) or transiently expressing GalNAcT-GFP (*trans*-Golgi network), Rab5a (early endosome), and Rab7 (late endosome), or rabbit polyclonal anti-VP1 (late endosome and lysosome-related compartment) antibodies were used. Bars, 5 μ m.

(E) Quantification of TgSORTLR colocalization Golgi-endosomal markers. Bars represent mean values of $n = 3$ independent experiments \pm standard deviation.

(F) Schematic representation of *T. gondii* showing its different compartments and organelles. Cryo-IEM of TgSORTLR localized in the Golgi apparatus of transgenic TgSORTLR-cMyc parasite (left panel), wild-type parasite (middle panel), and Golgi-proximal vesicles of transgenic TgSORTLR-cMyc strain (right panel). Black arrowheads indicate the nuclear envelope. Mn, microneme; Rh, rhoptry; DG, dense granule; N, nuclei. Bars, 200 nm.

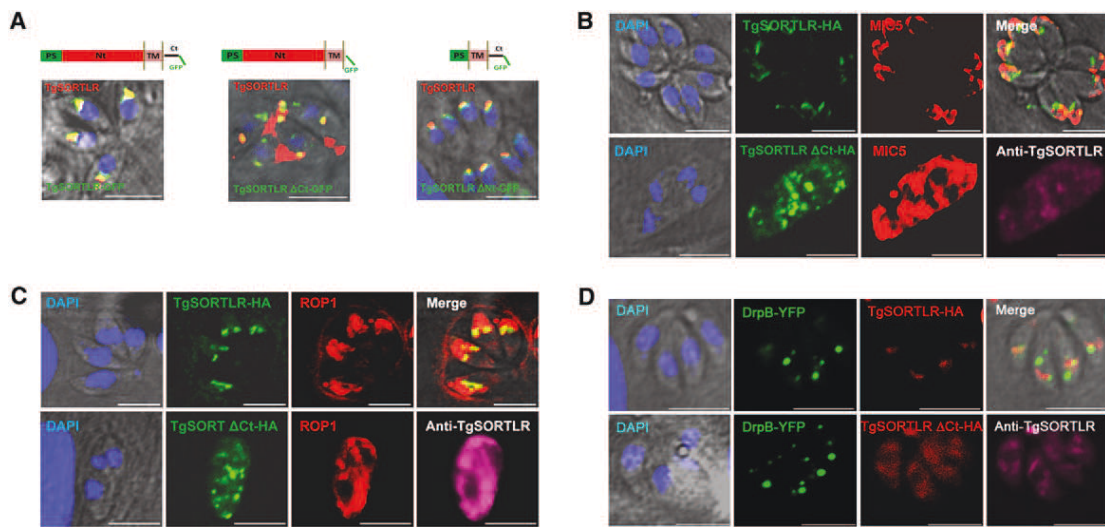


Figure 2. The Cytoplasmic Tail of TgSORTLR Is Essential for Correct Subcellular Localization of Endogenous TgSORTLR, Rhopty, and Microneme Proteins

(A) Expression of TgSORTLR protein lacking its C-terminal tail (TgSORTLRΔCt-GFP, green) resulted in the mislocalization of endogenous TgSORTLR stained with the anti-TgSORTLR antibodies (middle panel, red). TgSORTLRΔNt-GFP (right panel) and the full-length TgSORTLR-GFP (left panel) mediate the correct localization in the Golgi-endosomal structures. The endogenous TgSORTLR was labeled with the mouse anti-TgSORTLR and goat secondary antibodies.

(B) Expression of TgSORTLRΔCt-HA (rat polyclonal anti-HA9 and 488 nm-Alexa goat secondary antibodies, green) resulted in the mislocalization of MIC5 (rabbit anti-MIC5 and 594 nm-Alexa goat secondary antibodies, red). Endogenous TgSORTLR was stained with the mouse polyclonal anti-TgSORTLR and 633 nm-Alexa goat secondary antibodies.

(C) Expression of TgSORTLRΔCt-HA resulted in the mislocalization of ROP1. TgSORTLRΔCt-HA, endogenous TgSORTLR, and ROP1 were labeled as above.

(D) Expression of TgSORTLRΔCt-HA has no effect in the Golgi proximal localization of DrpB-YFP. These data indicate that rhopty and microneme proteins are present in the Golgi-endosomal associated structures in which TgSORTLR resides (see also Figure S2). Bars, 5 μm for all panels.

Ectopic Expression of a C-Terminally Truncated Mutant of TgSORTLR Abolishes the Transport to Rhopty and Micronemes

To substantiate that *T. gondii* uses a sortilin-like receptor to traffic invasion-related proteins to the apical organelles, wild-type parasites were transiently transfected with full-length or truncated mutants of TgSORTLR fused to either GFP or an HA epitope tag. Whereas full-length TgSORTLR-GFP showed the expected proximal anterior localization (Figure 2A, left panel), C-terminally truncated TgSORTLR fused to GFP (TgSORTLRΔCt-GFP) displayed multiple puncta both anterior and posterior to the parasite nucleus (Figure 2A, middle panel). These data suggest an essential role for the C-terminal tail in the proper localization of TgSORTLR. Furthermore, truncation of the luminal domain demonstrated that the C-terminal tail alone is sufficient for Golgi-endosomal localization (Figure 2A, right panel). Interestingly, transient expression of C-terminally truncated TgSORTLR-HA (Figures 2B and 2C, TgSORTLRΔCt-HA, green signal and lower panels) appeared to exert a dominant negative effect, causing the mislocalization of endogenous TgSORTLR (Figures 2B and 2C, anti-TgSORTLR, lower and right panels) along with ROP1 and MIC5, which accumulated throughout the cytoplasm of transfected parasites (Figures 2B and 2C, red signal and lower panels). In contrast, no effect on the Golgi proximal localization of the DrpB was noted (Figure 2D). Transient expression of TgSORTLRΔCt-HA in *T. gondii* tachyzoites also led to a severe defect in intracellular parasite division, which is consistent with our repeated failure to generate *Toxoplasma* lines stably expressing this mutant. These findings

suggest that the dominant negative effect of expressing TgSORTLRΔCt compromises parasite replication.

Conditional Ablation of TgSORTLR Disrupts Protein Trafficking and Biogenesis of Rhopty and Micronemes

Since dominant negative effects can be problematic to interpret, we conditionally ablated TgSORTLR expression in anhydrotetracycline (ATc)-inducible TgSORTLR knockout (iKO) parasites (Figures 3A and 3B). ATc treatment resulted in the loss of TgSORTLR protein in iKO parasites but had no effect on expression in wild-type parasites (Figure 3C). Confocal imaging confirmed the absence of TgSORTLR after ATc treatment (Figure 3D). ROP2–4 and MIC1 coimmunoprecipitated with TgSORTLR in wild-type and cMyc-tagged transgenic parasites, even in the absence of DSP (Figure 3E), but failed to do so in iKO mutants grown with ATc (Figure 3F). These findings confirm the specificity of the interactions, which is also supported by the failure of TgSORTLR to coimmunoprecipitate with DrpB-YFP (Figure S2I). To decipher the molecular basis of ROP and MIC protein binding to TgSORTLR, we tested the complete luminal domain of TgSORTLR along with a series of truncation mutants (see schematic representations in Figure 1A) for binding to either native or recombinant ROP and MIC proteins. Figure 3G shows that the recombinant TgSORTLR proteins were purified to homogeneity with similar yields. The recombinant complete luminal domain of TgSORTLR (rSORT₃₇₋₇₈₉-GST) bound to MIC5 and ROP1 (Figure 3I) in total protein extracts from the iKO depleted of endogenous TgSORTLR by ATc treatment (Figure 3H,

compare lanes 5 and 6). Similarly, the first two truncation mutants, rSORT₂₀₂₋₇₈₉-GST and rSORT₄₄₄₋₇₈₉-GST, also bound to MIC5 and ROP1, with the latter mutant showing enhanced binding to ROP1 (Figure 3I). Neither the third recombinant mutant rTgSORT₇₃₆₋₇₈₉-GST nor GST protein alone bound to MIC5 and ROP1, confirming that the bladed propeller domains of TgSORTLR are necessary for cargo binding. To test for direct binding, recombinant MIC5-HA and ROP1-HA proteins expressed in wheat germ extracts (Figure 3H, lanes 2 and 4) were incubated with the series of recombinant TgSORTLR proteins. No binding was seen between MIC5-HA or ROP1-HA and any of the recombinant TgSORTLR proteins (Figure 3J). *E. coli*-derived recombinant MIC5 and MIC10 also failed to bind recombinant TgSORTLR. These findings suggest that the binding of MIC and ROP proteins to TgSORTLR is indirect or requires features of the native MIC and ROP proteins that are not present in recombinant forms of these proteins.

Next, we treated iKO parasites with ATc to ablate expression of TgSORTLR and examine the effect on ROP and MIC protein localization. TgSORTLR deficiency strikingly altered the apical distribution of all ROP and MIC markers tested. Figure 4 illustrates the mislocalization of ROP1, ROP2-4, ROP5, ROP7, and RON1 proteins (Figure 4A) and MIC2, MIC3, MIC4, and M2AP proteins (Figure 4B). We also noticed that in some vacuoles of the TgSORTLR-deficient mutant, ROP1 and MIC4 appear as residual cytoplasmic puncta whereas other vacuoles showed the complete absence of ROP1 and MIC4 (Figures 4A and 4B). In addition, ROP7 (Figure 4A), MIC3, and ROP2-4 (data not shown) were detected in the host cytoplasm and localized around the nucleus, consistent with leaking of the PV contents into the host cell cytosol. In contrast, no morphological changes were observed for dense granules (GRA3), inner membrane complex (GAP45), the remnant plastid (Api, Atrx2; DeRocher et al. [2008]), the endoplasmic reticulum (SERCA; Nagamune et al. [2007]), or the mitochondrion (Mito, HSP60; Toursel et al. [2000]) (Figure 4C). Finally, complementation of iKO mutants by transient transfection of TgSORTLR-GFP restored the classical microneme and rhoptry apical patterns, while the TgSORTLR luminal domain (TgSORTLR Δ Ct-GFP) failed to rescue the defect localizations (Figure S3), confirming a functional requirement of the C-terminal cytosolic domain.

TgSORTLR Is Essential for the Formation of Rhoptries and Micronemes in *T. gondii*

Following 72 hr of ATc treatment, we observed that TgSORTLR-deficient parasites were devoid of the typical electron-dense club-shaped rhoptry and flattened microneme organelles (Figures 5B and 5C) compared to wild-type parasites (Figure 5A). Five serial ultrathin sections spaced 100 nm apart through five adjacent TgSORTLR-deficient parasites confirmed the absence of typical and morphologically defined rhoptries in 23 out of the 25 serial electron micrographs (Figure S4). Furthermore, no typical micronemes were seen in these 25 serial ultrathin sections of TgSORTLR-deficient parasites, whereas numerous dense granules (DG) were still present (Figures 5C and S6). We also observed by cryo-IEM that ROP2-4 and MIC5 proteins were diverted to the PV (Figures 5E and 5G), while these proteins correctly resided in their respective apical organ-

elles in the absence of ATc (Figures 5D and 5F). Finally, MIC5 was detected in the dense granules after ATc treatment (Figure 5H, inset), suggesting that it and possibly the other mislocalized secretory proteins are rerouted to this default, constitutive secretory pathway in the absence of regulated secretory organelles.

TgSORTLR Cytoplasmic Tail Binds to Cargo Proteins that Mediate Both Anterograde and Retrograde Golgi-Endosome Trafficking

To further substantiate the function of TgSORTLR as cargo receptor for sorting microneme and rhoptry proteins, we fused the cytoplasmic tail of TgSORTLR to GST and incubated it with parasite extracts to test for interactions with components of the cytosolic sorting machinery. As shown in Table S2, the TgSORTLR cytoplasmic tail bound to parasite homologs of clathrin heavy chain, clathrin-associated adaptor complex small chain, β , γ , and μ 1 adaptins, three components of the AP1 and AP2 adaptor complexes known for clathrin-mediated endocytosis (Sosa et al., 2012). Interestingly, we also identified homologs of the coat complex transport proteins Sec23/Sec24 that ensure the directionality of anterograde membrane flow from the ER to the Golgi apparatus (Lord et al., 2011). Finally, the C terminus of TgSORTLR also pulled down three homologs of retromer-associated vacuolar sorting proteins Vsp9, Vsp26, and Vsp35. This is consistent with TgSORTLR binding to the retromer complex that mediates retrograde transport from endosomes to the *trans*-Golgi network (Kim et al., 2010). To further investigate if these cytosolic cargo-sorting proteins are similarly present in the Golgi-endosomal compartment, we determined the subcellular localization of endogenous Vps26 protein in *T. gondii* by chromosomally appending an encoded HA epitope tag. TgVps26-HA displayed better colocalization with TgSORTLR than any of the previously tested markers (Figure 6A compared to Figure 1D). Altogether, these findings suggest that TgSORTLR functions as a cargo transport protein by coordinating with cytosolic proteins involved in Golgi-endosomal trafficking including TgVsp26. Furthermore, we showed that the Golgi-endosomal localization of TgVps26-HA transiently expressed in the iKO mutant (Figure 6B, left panels) was abolished upon treatment with ATc (Figure 6B, right panels). Similarly, the Golgi-endosomal localization of TgVps26-HA stably expressed in the wild-type parasites (Figure 6C, left panels) was disrupted upon transiently expressing the dominant negative TgSORTLR Δ Ct protein (Figure 6C, right panels). Instead, only cytoplasmic signal was observed. Taken together, these data indicate that endosomal compartments might not form correctly in the absence of TgSORTLR.

Host Infection by *T. gondii* Is Crippled by the Absence of TgSORTLR

As a first assessment of the essentiality of TgSORTLR, we tested the ability of parasites to form plaques on host cell monolayers. Whereas the wild-type parasites grew normally and developed equal sized plaques in the absence or presence of ATc (Figure 7A, yellow arrows), growth of iKO lines gave rise to normal plaque sizes only in the absence of ATc (Figure 7B, left panel). The presence of ATc led to a complete block in plaque formation in TgSORTLR-deficient parasites (Figure 7B, right panel). To

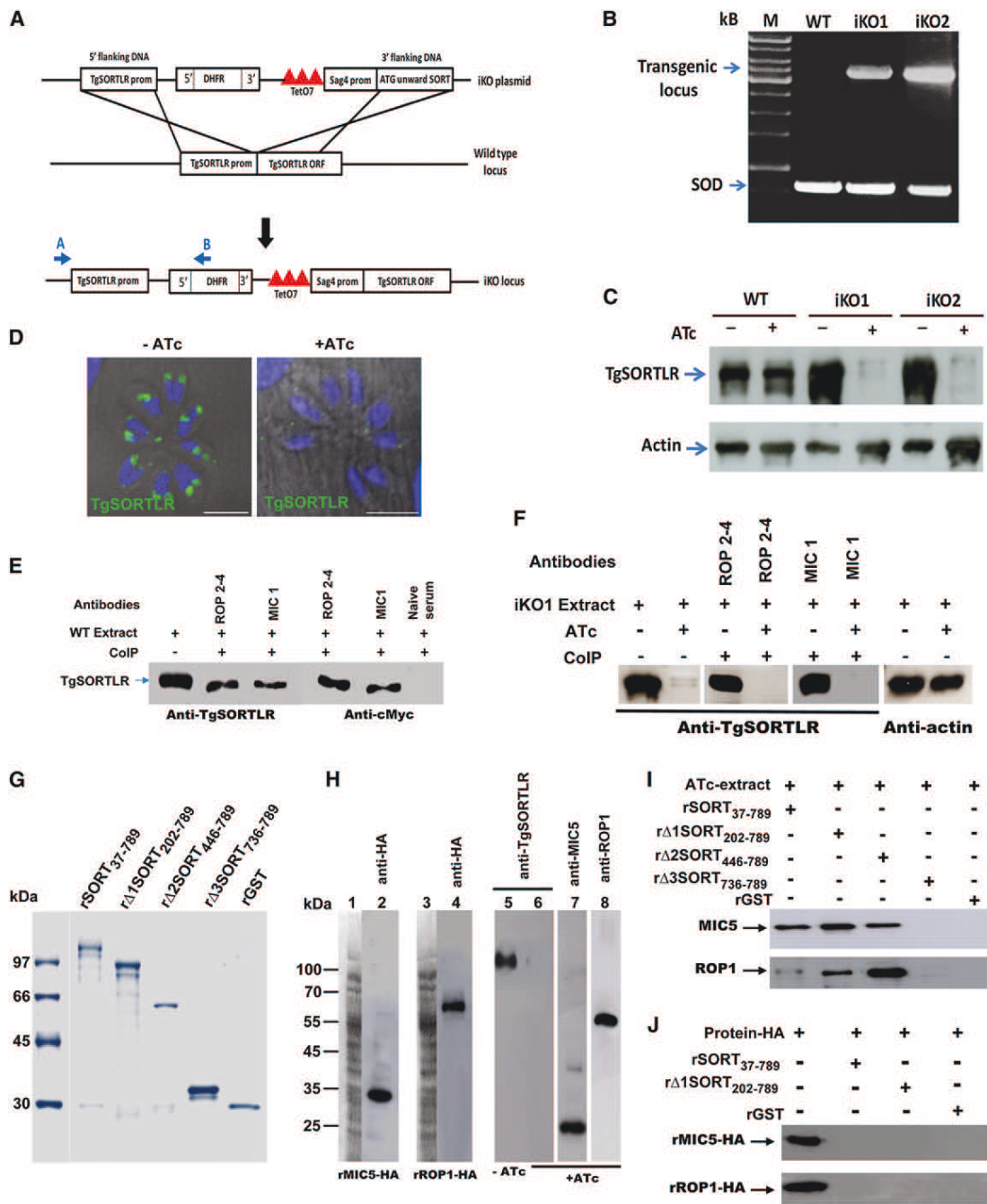


Figure 3. Conditional Ablation of TgSORTLR Gene and Phenotypic Studies

(A) Schematic of the approach used for the conditional ablation of TgSORTLR gene.

(B) PCR analysis using the primers indicated in (A) confirms the conditional ablation *TgSORTLR*. Superoxide dismutase (SOD), positive control.

(C) Immunoblots of wild-type and TgSORTLR-deficient lines grown in the presence or absence of ATc for 48 hr and probed with anti-TgSORTLR antibodies. Actin was detected as a loading control.

(D) Confirmation of TgSORTLR conditional depletion by confocal imaging using anti-TgSORTLR antibodies after 48 hr ATc treatment.

(E) Immunoblots of wild-type TgSORTLR or ectopic TgSORTLR-cMyc coimmunoprecipitated with monoclonal anti-ROP2-4 or anti-MIC1 antibodies. See also Table S1.

(F) TgSORTLR does not coimmunoprecipitate with ROP2-4 or MIC1 after conditional depletion with ATc for 48 hr.

(G) Coomassie blue staining of the purified recombinant luminal domain of TgSORTLR, its different truncations or GST alone.

(H) Expression of recombinant rMIC5-HA (lane 2) and rROP1-HA (lane 4) proteins by wheat germ in vitro transcription/translation. Immunoblots were probed with rabbit polyclonal anti-HA9 antibodies. Lanes 1 and 3, total protein extracts stained with Ponceau red. Immunoblots of TgSORTLR-deficient mutants grown without (lane 5) or with ATc for 48 hr (lane 6) incubated with anti-TgSORTLR, rabbit polyclonal anti-MIC5 (lane 7), or monoclonal anti-ROP1 (lane 8) antibodies.

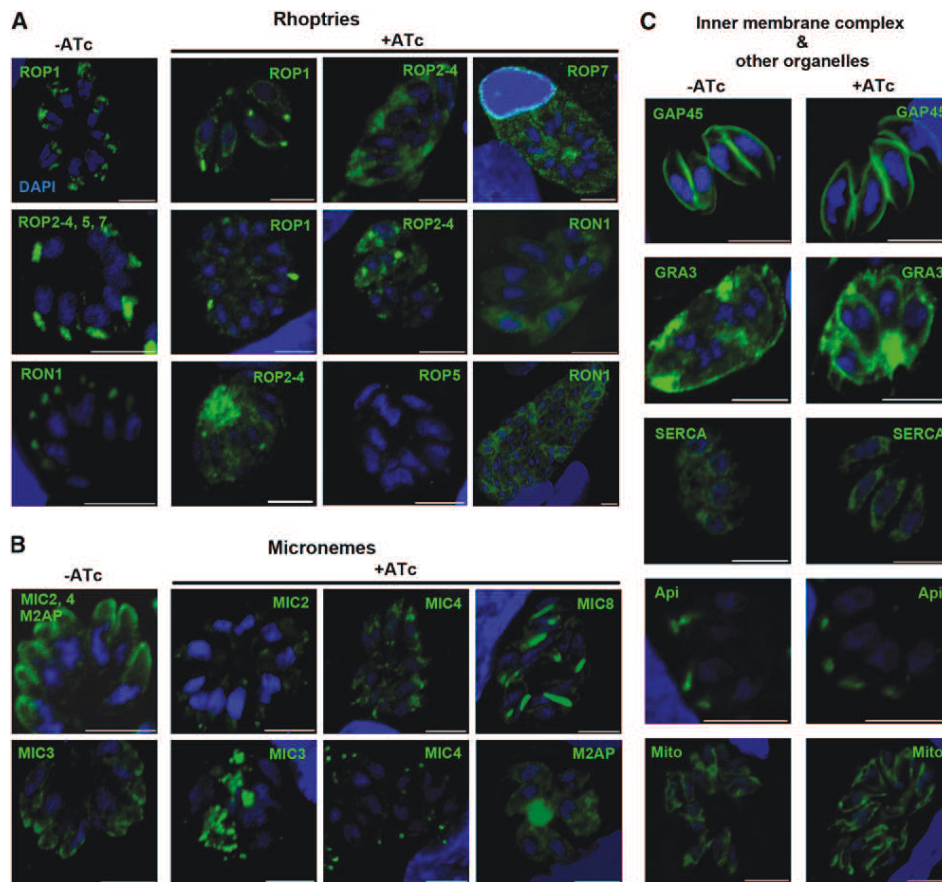


Figure 4. The Conditional Depletion of TgSORTLR Mislocalizes Microneme and Rhoptry Proteins

(A) In the presence of ATc for 48 hr, several rhoptry ROP1, ROP2–4, ROP5, ROP7, and RON1 proteins were mislocalized in TgSORTLR-deficient mutant, whereas the apical localization was observed in the absence of ATc, as expected. Only one confocal image of wild-type parasite corresponding to the first anti-ROP antibody is shown when several proteins have an identical pattern.

(B) Several microneme proteins including MIC2, MIC3, MIC4, and MA2P were mislocalized in TgSORTLR-deficient mutant after 48 hr ATc treatment. Only one confocal image of wild-type parasite was shown as above.

(C) Subcellular localizations of the inner membrane complex (GAP45), dense granules (GRA3), endoplasmic reticulum (SERCA), apicoplast (Atrx2; Api), or mitochondrial (HSP60; Mito) markers were unchanged in the TgSORTLR deficient mutant. These data indicate that TgSORTLR regulates ROP and MIC protein transport during rhoptry and microneme biogenesis (see also Figure S3).

assess egress, live video microscopy was used to visualize parasite exit in response to induction with the calcium ionophore A23187. The iKO parasites efficiently egressed from host cells when grown without ATc (Movie S2, left), yet it failed to egress upon ionophore stimulation after growth in ATc (Movie S2, right). To monitor if the parasites depleted for TgSORTLR can still glide, iKO mutants grown in ATc were mechanically released from infected host cells, and trail deposition assays performed. Figure 7C shows that the iKO line grown in the absence of ATc showed a significant number of circular trails (yellow arrows, left panel). In contrast, conditional ablation of TgSORTLR paralyzed the parasite (Figure 7C, right panel). As expected based on the absence of gliding, mechanically released iKO mutants

grown in ATc were also severely impaired in their ability to invade host cells (Figure 7D).

To examine the role of the TgSORTLR in *Toxoplasma* infection, mice were infected with iKO parasites that were cultured without ATc, and TgSORTLR expression levels were suppressed in vivo by providing ATc in the drinking water. Strikingly, all mice inoculated with iKO parasites in the absence of ATc treatment succumbed to the infection by day 9, whereas ATc-treated infected mice survived regardless of whether treatment was initiated on day 0 postinfection or day 5 postinfection, when the mice exhibit symptomatic acute toxoplasmosis (Figure 7E). This demonstrates that mice can be cured of acute toxoplasmosis by suppression of TgSORTLR expression. Similarly,

(I) Pull-down assays using the protein extracts from TgSORTLR-deficient mutant and rSORT₃₇₋₇₈₉-GST, rΔ1SORT₂₀₂₋₇₈₉-GST, rΔ2SORT₄₄₆₋₇₈₉-GST, or rΔ3SORT₇₃₆₋₇₈₉-GST (see schematic representations in Figure 1A). Blots were incubated with rabbit polyclonal anti-MIC5 or anti-ROP1 antibodies.

(J) Pull-down assays using protein extracts containing rMIC5-HA or rROP1-HA protein incubated with rSORT₃₇₋₇₈₉-GST or rΔ1SORT₂₀₂₋₇₈₉-GST beads (upper panel). Blots were stained with rabbit anti-HA antibodies.

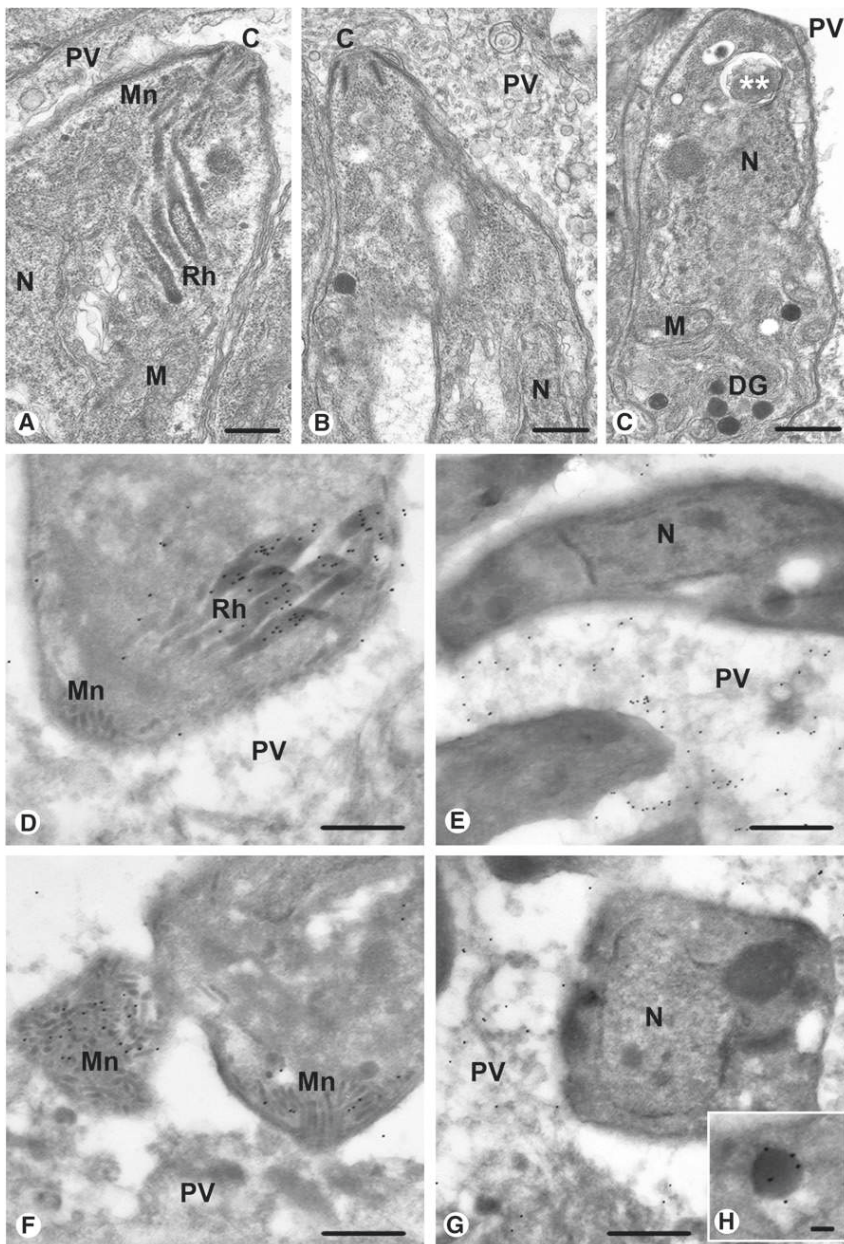


Figure 5. TgSORTLR Is Crucial for the Biogenesis of Micronemes and Rhoptries

(A) Transmission electron micrograph showing rhoptries (Rh) and micronemes (Mn) in the wild-type parasite.

(B) Ultrathin section of a TgSORTLR-deficient parasite lacking typical micronemes and rhoptries after ATc treatment for 72 hr.

(C) Longitudinal ultrathin section of TgSORTLR-deficient parasite lacking typical micronemes and rhoptries but accumulating unknown vesicles (asterisks) after ATc treatment for 72 hr. See also Figure S4.

(D) Cryo-IEM of rhoptries in the wild-type parasite using anti-ROP1 antibodies.

(E) In the TgSORTLR-deficient parasites, gold-labeled ROP1 was only detected in the vacuole after ATc treatment for 48 hr.

(F) Cross-sections through the anterior end of wild-type parasite showing numerous gold-labeled micronemes using anti-MIC5 antibodies.

(G) TgSORTLR-deficient parasites showed gold-labeled MIC5 mainly in the PV after ATc treatment for 48 hr as a result of mistargeting from the microneme pathway. The remaining gold-labeled MIC5 was detected in the dense granules (DG, see the inset (H)). N, nucleus; PV, parasitophorous vacuole; M, mitochondrion. Bars, 500 nm for all panels.

not confer sterile immunity, perhaps because of the rapid clearance of iKO parasites.

DISCUSSION

We showed that TgSORTLR localizes to the Golgi cisternae and proximal vesicles and acts as a cargo receptor that is necessary for the biogenesis of secretory organelles. Further, TgSORTLR is essential for host cell egress, gliding motility, cell invasion, and in vivo infection by *T. gondii*, likely because of the crucial roles for apical secretory organelles in all events. Despite its high conservation throughout the tree of life, sortilin has not been reported to be essential in any

mice infected with the TgSORTLR iKO at higher doses survived the acute infection when treated with ATc beginning at day 0 postinfection (Figure 7F). Moreover, all mice survived the iKO infection when ATc treatment was stopped at day 15, suggesting complete clearance of infection (Figure 7F, black arrow). We conclude that the conditional ablation of TgSORTLR transformed a *T. gondii* virulent strain into nonlethal parasites. Mice that survived the primary infection with iKO parasites were challenged with a lethal dose of virulent wild-type RH parasites. Unexpectedly, all of the mice previously infected with iKO parasites succumbed to the challenge infection, albeit with a modest delay that was dependent upon the dose of the primary infection (Figure 7G). This suggests that infection with iKO parasites does

other biological system (Marcusson et al., 1994; Jansen et al., 2007). In contrast, our findings reveal an indispensable role for *T. gondii* sortilin, which is the indication that, unlike yeast and higher eukaryotes, lower branching eukaryotes such as apicomplexan parasites do not have redundant mechanisms of protein trafficking. This provides a unique glimpse into a “simplified” sorting system in lower eukaryotes. We suggest that TgSORTLR guides ROP and MIC proteins through the Golgi for packaging into vesicles at the *trans*-Golgi network. Supporting this notion, we observed Golgi proximal, proROP4, and TgSORTLR-positive structures that could be transport vesicles destined for the endolysosomal system. Regardless, TgSORTLR likely plays a role in the formation and packaging of these vesicles based on the

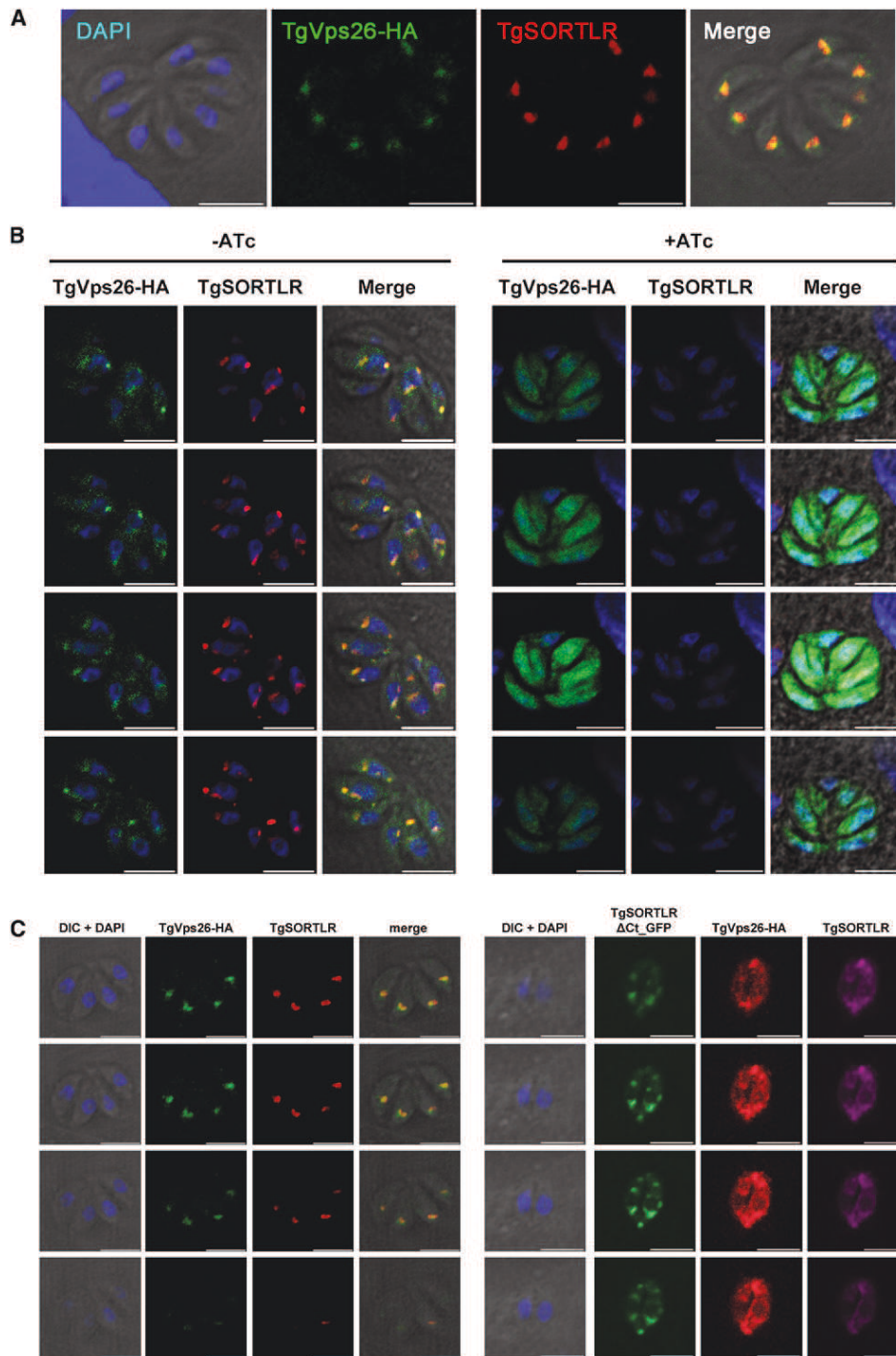


Figure 6. TgSORTLR Colocalizes with TgVsp26 and Dictates Its Membrane Association

(A) Extensive colocalization between TgSORTLR (mouse polyclonal antibody, red) and endogenously tagged TgVps26-HA (rabbit polyclonal antibody, green). (B) Z stack acquisitions by confocal microscopy of transiently transfected iKO tachyzoites expressing TgVSP26-HA under the control of the GRA1 and grown in the absence (left panels) or presence (right panels) of ATc for 48 hr. Antibodies used are the same as in (A). (C) Z stack confocal acquisitions of tachyzoites stably expressing endogenously tagged TgVps26-HA in RH Δ ku80 strain before (left panels) or after (right panels) transient transfection with TgSORTLR lacking its C-terminal tail. These data indicate that the C-terminal tail of TgSORTLR recruits cytoplasmic sorting proteins (see also Table S2). The confocal images were captured in increments of 0.37 or 0.43 μ m for (B) and (C), respectively. Bars, 5 μ m for all panels.

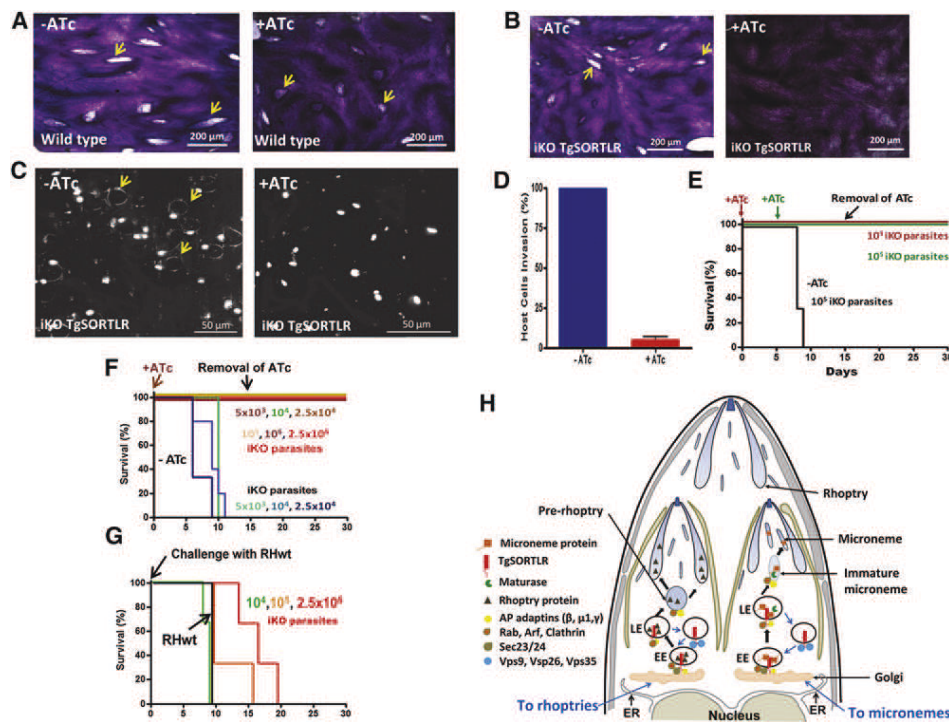


Figure 7. TgSORTLR Is Essential for Gliding Motility, Host Infection, and Parasite Virulence

(A) The wild-type parasites grown in the presence or absence of ATc after 48 hr.
 (B) The conditional TgSORTLR depletion dramatically prevents the lytic and invasion cycles, thus affecting plaque formation in the presence of ATc for 48 hr. Bars, 200 μm .
 (C) Motility was impaired in the conditional TgSORTLR-deficient line after it was grown in ATc for 48 hr (see also Movie S2). Bars, 50 μm .
 (D) Host cell invasion was severely impaired in TgSORTLR deficient parasites after ATc treatment for 48 hr. Bars represent means \pm standard deviations ($n = 3$, $p < 0.001$ by Student's t test).
 (E) TgSORTLR depletion abrogates virulence in mice. A group of mice infected with TgSORTLR-deficient mutants for 5 days (green) prior to the addition of ATc to drinking water.
 (F) A group of six mice inoculated with doses ranging from 5×10^3 up to 2.5×10^6 iKO parasites survived with ATc treatment.
 (G) TgSORTLR-depleted parasites are avirulent in mice but do not confer protective immunity to reinfection with 1×10^3 of wild-type RH tachyzoites.
 (H) Model of TgSORTLR function in protein sorting and the biogenesis of apical secretory organelles.

properties of sortilin through its cytoplasmic tail known to specifically interact with the monomeric adaptor protein, Golgi-associated gamma-adaptin homologous and ARF-interacting proteins (Hermeijer, 2009). We provide evidence that the cytoplasmic tail of TgSORTLR specifically interacts with AP adaptins (β , γ , and $\mu 1$ adaptins), clathrin, and one of its associated factors and three vesicular sorting proteins (Vsp9, Vsp26, and Vsp35). Moreover, expression of C-terminal tail mutant in *T. gondii* disrupted the subcellular distribution of endogenous TgSORTLR and that of ROP and MIC proteins, suggesting that the TgSORTLR cytoplasmic tail contains potent signals for Golgi-endosome sorting.

Whereas regulated secretory granules of higher eukaryotes are derived directly from the *trans*-Golgi network (Sossin et al., 1990), *T. gondii* and possibly other apicomplexan parasites appear to use their endolysosomal system as an intermediate conduit for trafficking of proteins destined for regulated secretion. While Joiner and colleagues proposed this for the rhoptries (Ngô et al., 2004), more recent studies suggest that microneme proteins also traffic through the endolysosomal system. Microneme proproteins reside in late endosomes (Harper et al., 2006), and at least two such proteins are proteolytically

processed by an endolysosomal cathepsin L protease (Parussini et al., 2010). Thus, one advantage of merging the endocytic and exocytic pathways is that it allows convenient access to proteases necessary for the activation of secretory proteins. A second advantage revealed by the current study is that the parasite utilizes an endosomal cargo receptor, TgSORTLR, for sorting proteins to the regulated secretory organelles. Our work further suggests that, likely due to the lack of a mannose-6-phosphate sorting system, *T. gondii* appears to critically rely on TgSORTLR for shuttling secretory proteins through the hybrid endocytic/exocytic system. Thus, the identification of TgSORTLR promises to provide insights into the evolutionary development and relationships of basic cellular functions in protists. The biogenesis of these parasite-specific organelles, their evolutionary origins and relationships to organelles of higher eukaryotes, as well as the precise sorting events that endow them with distinctive sets of proteins are poorly understood. Despite being touted as a multiprotein receptor, precisely how sortilin recognizes different cargo proteins from rhoptries and micronemes remains to be precisely elucidated. Rhoptries are formed prior to micronemes during daughter cell formation (Nishi et al., 2008),

suggesting that TgSORTLR sorts ROP proteins prior to attending to MIC proteins. We showed that TgSORTLR binding to ROP and MIC proteins requires the presence of the N-terminal bladed propeller domains. This observation is consistent with TgSORTLR being a receptor that binds to multiple ligands, a property shared with mammalian sortilin. For example, the neurotensin C terminus binds to mammalian sortilin in a tunnel formed by the β -propeller domains (Quistgaard et al., 2009), whereas proneurotrophin binds to a linear surface-exposed sequence (Serup Andersen et al., 2010). Rhoptry and microneme proteins may bind to TgSORTLR in a similar manner. Finally, we found that recombinant ROP and MIC proteins do not interact with the recombinant TgSORTLR, suggesting that posttranslational modifications are required for proper binding to this cargo receptor. These putative posttranslational modifications may allow discrimination in binding of ROP and MIC proteins to TgSORTLR. Alternatively, ROP and MIC proteins might bind to TgSORTLR in multiprotein complexes with only a subset of proteins forming direct contacts with the cargo receptor. We propose a model that during daughter parasite formation, TgSORTLR binds to rhoptry (Figure 7H, left panel) or microneme (Figure 7H, right panel) proteins in the Golgi lumen and recruits cytosolic cargo sorting proteins such as AP adaptins, clathrin, and vacuolar sorting proteins. This leads to the formation of a sorting complex, which is presumably associated with vesicles that exit from the external Golgi cisternae. TgSORTLR then guides its cargo through the early endosomes (EE), possibly the late endosomes (LE), prerhoptries, or immature micronemes before releasing its payload. The “empty” cargo receptor then recruits components of the retromer complex for retrograde translocation and recycling to the Golgi to reload with new cargo. Our ability to conditionally extinguish sortilin expression will allow functional dissection that should reveal valuable insights into basic mechanisms of sortilin function and protein-protein interactions. The TgSORTLR-deficient parasites described herein underscore its key role and suggest that TgSORTLR plays a crucial role as a type I transmembrane cargo receptor regulating a common sorting mechanism that is important for the biogenesis of apical secretory organelles in *T. gondii*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Growth of Host Cells and Parasite Strains

T. gondii RH strain, RHTaTi (a Δ Trans-activator Δ trap-identified inducible anhydrotetracycline [ATc] strain; Meissner et al. [2002]), RH Δ ku80 (a strain with high homologous integration of transfected DNA; Huynh and Carruthers [2009]), RH Δ ku80TaTi (a strain with ATc inducible system and high homologous recombination; Sheiner et al. [2011]), RH strain expressing GRASP-RFP, or HDEL-RFP were also used.

Generation of Transgenic *T. gondii* Strains

The RH tachyzoites (5×10^6) were transfected with 50 μ g of the full-length TgSORTLR or truncated TgSORTLR Δ Ct or TgSORTLR Δ Nt genes amplified by PCR and fused to GFP or HA epitope tag. All primers used for PCR during this study are listed in Supplemental Experimental Procedures. Ectopic expression of TgSORTLR-cMyc driven by TetO7SAG1 promoter and stable lines were obtained in RHTaTi strain using 5 μ g/ml of phleomycin. The TgSORTLR iKO lines were generated using RH Δ ku80TaTi and pG13-D-T7S4 plasmid containing 2 kb 5' and 3' noncoding genomic DNA, respectively (Sheiner et al., 2011). For HA-tagged TgVps26 protein by knockin strategy, a DNA fragment of 2 kb upstream of the stop codon from the TGME49_063500 genomic sequence was cloned in the pLIC-HA-DHFR plasmid (Huynh and

Carruthers, 2009). The plasmid (25 μ g) was linearized with EcoRV and transfected in 5×10^6 Ku80 tachyzoites followed by pyrimethamine selection. The full-length cDNA encoding TgVps26 protein was PCR amplified. The amplified cDNA was cloned in frame with GFP in pMAH14 vector containing GRA1 promoter as previously described (Fauquenoy et al., 2011).

Immunofluorescence Assay, Electron and Live Video Microscopy

Paraformaldehyde-fixed intracellular parasites were used for IFA and confocal microscopy as previously described (Olguin-Lamas et al., 2011). Ultrastructural morphology was performed using conventional and immuno-gold electron microscopy (Olguin-Lamas et al., 2011), except that 8% paraformaldehyde containing 0.01% glutaraldehyde was used for cryo-IEM. Egress was induced with 4 μ M A23187 (Sigma) at 37°C under CO₂ chamber, and videos were recorded with a Zeiss AxioObserver Z1 microscope. The list of monoclonal and polyclonal antibodies used during this study is shown in Supplemental Experimental Procedures. Confocal images were analyzed by ImageJ (NIH) software, and colocalization between green and red confocal images was determined by Pearson's coefficient using 4–7 vacuoles containing at least 4–8 parasites per vacuole.

Coimmunoprecipitation, Proteomic, and Immunoblot Analyses

TgSORTLR and binding partners were coimmunoprecipitated after crosslinking 2×10^9 live tachyzoites with dithiobis-[succinimidyl-propionate] (DSP) followed by extraction with Triton X-100 (Fauquenoy et al., 2011). Binding protein complexes were reduced by dithiothreitol before SDS-PAGE followed by silver staining. The gel lane was cut into slices, in-gel tryptic digested, and then processed for mass spectrometry as described in Supplemental Experimental Procedures.

Synthesis of Recombinant Proteins in *E. coli* and Wheat Germ In Vitro Translation

For expression in *E. coli*, TgSORTLR DNA fragments corresponding to amino acids 37–714 or 37–789 termed rSORT₃₇₋₇₁₄ or rSORT₃₇₋₇₈₉ were amplified by PCR. The amplified DNA was cloned in frame with GST in pGEX-6P (Pharmacia). Three N terminus TgSORTLR mutants, rSORT₂₀₂₋₇₈₉-GST, rSORT₄₄₆₋₇₈₉-GST, or rSORT₇₃₆₋₇₈₉-GST, corresponding to the respective deletion of bladed propeller domains B–D, B–H or B–10CCb, were also produced. The recombinant rSORT₈₀₈₋₉₆₂-GST fusion protein corresponding to TgSORTLR cytoplasmic tail was also generated as above. Production of fusion proteins in BL21 (DE3) bacteria and purification were performed by standard techniques. The full-length recombinant rROP1-HA and rMIC5-HA proteins were synthesized using the wheat germ in vitro transcription/translation kit (Promega). Five Balb/C mice were intraperitoneally (IP) immunized with 50 μ g of purified recombinant N-terminal TgSORTLR₃₇₋₇₈₉-GST protein per mouse in complete Freund's adjuvant (Sigma). Two boosts were performed by IP with 50 μ g of recombinant protein per mouse in incomplete Freund's adjuvant (Sigma).

GST Pull-Down Experiments

Total parasite extract from 10^8 tachyzoites or 20 μ l of in vitro translation reaction were resuspended in GST binding buffer (Tris.HCl 10 mM, NaCl 150 mM, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, Triton X-100 1%, and protease inhibitors) and incubated with 10–40 μ l of beads containing 3–6 μ g of rSORT₃₇₋₇₈₉-GST, rSORT₂₀₂₋₇₈₉-GST, rSORT₄₄₆₋₇₈₉-GST, and rSORT₇₃₆₋₇₈₉-GST or GST beads alone for overnight at 4°C. Precipitants were washed with the same buffer, eluted by SDS buffer and analyzed by western blots. For the pull-down of TgSORTLR C-terminal tail partners, cytoplasmic extracts from 4×10^9 tachyzoites were incubated with 100 μ l of rSORT₈₀₈₋₉₆₂-GST or to GST beads alone containing about 200 μ g of each protein. The bound partners were silver stained and processed for proteomics analyses.

Phenotypic Assays

Plaque assays were performed using 8-well Labtek slides containing human fibroblast cells infected with 100 parasites per well in media with or without 1 μ g/ml ATc, fixed after 7 days post infection and stained with crystal violet. Experiments were repeated thrice in triplicate wells. Intracellular TgSORTLR iKO parasites grown with or without ATc were released mechanically and used in three independent experiments each for gliding motility and invasion

assays as previously described (Supplemental Experimental Procedures; Fauquenoy et al., 2008, 2011).

Mouse Infectivity Studies

Six female Balb/C mice (6–8 weeks old) were injected intraperitoneally with 5×10^3 to 2×10^6 iKO parasites that were cultured without ATc. To suppress TgSORTLR expression in vivo, the drinking water was supplemented with 0.2 mg/ml of ATc and 5% of sucrose. A second group of six mice were also infected with 5×10^3 to 2.5×10^4 of iKO tachyzoites without ATc. As control, 5×10^3 to 2.5×10^4 of the parental line (RHΔku80TaTi strain) was used to infect groups of six mice with or without ATc. Survival was monitored over a period of 4 weeks. All experiments were repeated at least three times.

Statistics

Student's t test was used for statistical analysis. The Mann-Whitney test was used for analysis of mice survival curves.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes four figures, two tables, Supplemental Experimental Procedures, and two movies and can be found with this article online at doi:10.1016/j.chom.2012.03.006.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J.-F. Dubremetz for the anti-ROP, anti-MIC antibodies; B. Striepen and L. Sheiner for RHΔku80TaTi and the pG13-D-T7S4 plasmid; M. Meissner for DrpB-YFP strain; G. Ward for anti-proROP4 antibodies; D. Soldati for anti-GAP45 antibodies; D. Sibley for SERCA antibodies; and P. Bradley for the Atrx2 antibody. We are grateful to Gordon Langsley and Steven Ball for critical reading of this manuscript. This work was supported by a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Research and Technology to P.J.S., by financial supports from the CNRS, INSERM, Pasteur Institute of Lille to S.T., and from the NIH (AI063263) to V.B.C.

Received: October 27, 2011

Revised: February 2, 2012

Accepted: March 28, 2012

Published: May 16, 2012

REFERENCES

- Boothroyd, J.C., and Dubremetz, J.F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 79–88.
- Breinich, M.S., Ferguson, D.J., Foth, B.J., van Dooren, G.G., Lebrun, M., Quon, D.V., Striepen, B., Bradley, P.J., Frischknecht, F., Carruthers, V.B., and Meissner, M. (2009). A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. *Curr. Biol.* 19, 277–286.
- Carey, K.L., Jongco, A.M., Kim, K., and Ward, G.E. (2004). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryot. Cell* 3, 1320–1330.
- Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P.I., Striepen, B., Roos, D.S., and Joiner, K.A. (1999). Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J. Biol. Chem.* 274, 2424–2431.
- Clee, S.M., Yandell, B.S., Schueler, K.M., Rabaglia, M.E., Richards, O.C., Raines, S.M., Kabara, E.A., Klass, D.M., Mui, E.T., Stapleton, D.S., et al. (2006). Positional cloning of Sorcs1, a type 2 diabetes quantitative trait locus. *Nat. Genet.* 38, 688–693.
- DeRocher, A.E., Coppens, I., Karnataki, A., Gilbert, L.A., Rome, M.E., Feagin, J.E., Bradley, P.J., and Parsons, M. (2008). A thioredoxin family protein of the apicoplast periphery identifies abundant candidate transport vesicles in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell* 7, 1518–1529.
- Fauquenoy, S., Morelle, W., Hovasse, A., Bednarczyk, A., Slomianny, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Tomavo, S. (2008). Proteomics and glycomics analyses of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*–host cell interactions. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 891–910.
- Fauquenoy, S., Hovasse, A., Sloves, P.J., Morelle, W., Dilezitoko Alayi, T., Slomianny, C., Werkmeister, E., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Tomavo, S. (2011). Unusual N-glycan structures required for trafficking *Toxoplasma gondii* GAP50 to the inner membrane complex regulate host cell entry through parasite motility. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M111.008953.
- Hager, K.M., Striepen, B., Tilney, L.G., and Roos, D.S. (1999). The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 112, 2631–2638.
- Harper, J.M., Huynh, M.H., Coppens, I., Parussini, F., Moreno, S., and Carruthers, V.B. (2006). A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Mol. Biol. Cell* 17, 4551–4563.
- Hermey, G. (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2677–2689.
- Hoppe, H.C., Ngô, H.M., Yang, M., and Joiner, K.A. (2000). Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nat. Cell Biol.* 2, 449–456.
- Huynh, M.H., and Carruthers, V.B. (2006). *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog.* 2, e84.
- Huynh, M.H., and Carruthers, V.B. (2009). Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot. Cell* 8, 530–539.
- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J.R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S.S., Breiderhoff, T., Gotthardt, M., Lin, F., Eilers, A., et al. (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat. Neurosci.* 10, 1449–1457.
- Kim, T., and Hempstead, B.L. (2009). NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *EMBO J.* 28, 1612–1623.
- Kim, E., Lee, Y., Lee, H.J., Kim, J.S., Song, B.S., Huh, J.W., Lee, S.R., Kim, S.U., Kim, S.H., Hong, Y., et al. (2010). Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403, 167–171.
- Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., Ghassemian, M., Nycz, D., Hay, J., Ghosh, P., and Ferro-Novick, S. (2011). Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature* 473, 181–186.
- Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E., and Emr, S.D. (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 77, 579–586.
- Meissner, M., Schlüter, D., and Soldati, D. (2002). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* 298, 837–840.
- Nagamune, K., Beatty, W.L., and Sibley, L.D. (2007). Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell* 6, 2147–2156.
- Ngô, H.M., Yang, M., Paprotka, K., Pypaert, M., Hoppe, H., and Joiner, K.A. (2003). AP-1 in *Toxoplasma gondii* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* 278, 5343–5352.
- Ngô, H.M., Yang, M., and Joiner, K.A. (2004). Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? *Mol. Microbiol.* 52, 1531–1541.
- Nishi, M., Hu, K., Murray, J.M., and Roos, D.S. (2008). Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 121, 1559–1568.
- Olguin-Lamas, A., Madec, E., Hovasse, A., Werkmeister, E., Callebaut, I., Slomianny, C., Delhaye, S., Mouveaux, T., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., and Tomavo, S. (2011). A novel *Toxoplasma gondii* nuclear factor TgNF3 is a dynamic chromatin-associated component, modulator of nucleolar architecture and parasite virulence. *PLoS Pathog.* 7, e1001328.
- Parussini, F., Coppens, I., Shah, P.P., Diamond, S.L., and Carruthers, V.B. (2010). Cathepsin L occupies a vacuolar compartment and is a protein maturase within the endo/exocytic system of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 76, 1340–1357.

- Pelletier, L., Stern, C.A., Pypaert, M., Sheff, D., Ngô, H.M., Roper, N., He, C.Y., Hu, K., Toomre, D., Coppens, I., et al. (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature* **418**, 548–552.
- Quistgaard, E.M., Madsen, P., Grøftehauge, M.K., Nissen, P., Petersen, C.M., and Thirup, S.S. (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 96–98.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J.H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C.T., Cheng, R., Hasegawa, H., et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* **39**, 168–177.
- Serup Andersen, O., Boisguerin, P., Glerup, S., Skeldal, S., Volkmer, R., Willnow, T.E., Nykjaer, A., and Andersen, O.M. (2010). Identification of a linear epitope in sortilin that partakes in pro-neurotrophin binding. *J. Biol. Chem.* **285**, 12210–12222.
- Sheiner, L., Demerly, J.L., Poulsen, N., Beatty, W.L., Lucas, O., Behnke, M.S., White, M.W., and Striepen, B. (2011). A systematic screen to discover and analyze apicoplast proteins identifies a conserved and essential protein import factor. *PLoS Pathog.* **7**, e1002392.
- Sosa, R.T., Weber, M.M., Wen, Y., and O'Halloran, T.J. (2012). A single β adaptin contributes to AP1 and AP2 complexes and clathrin function in *Dictyostelium*. *Traffic* **13**, 305–316. Published online December 4, 2011. 10.1111/j.1600-0854.2011.01310.x.
- Sossin, W.S., Fisher, J.M., and Scheller, R.H. (1990). Sorting within the regulated secretory pathway occurs in the *trans*-Golgi network. *J. Cell Biol.* **110**, 1–12.
- Stedman, T.T., Sussmann, A.R., and Joiner, K.A. (2003). *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 5433–5443.
- Toursel, C., Dzierszynski, F., Bernigaud, A., Mortuaire, M., and Tomavo, S. (2000). Molecular cloning, organellar targeting and developmental expression of mitochondrial chaperone HSP60 in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**, 319–332.

Cell Host & Microbe, Volume 11

Supplemental Information

***Toxoplasma* Sortilin-like Receptor Regulates
Protein Transport and Is Essential for Apical
Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection**

**Pierre-Julien Sloves, Stephane Delhay, Thomas Mouveaux, Elisabeth Werkmeister, Christian Slomianny,
Agnes Hovasse, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, Isabelle Callebaut, Rajshekhar Y. Gaji, Christine Schaeffer-
Reiss, Alain Van Dorsselear, Vern B. Carruthers, and Stanislas Tomavo**

Supplemental Figures

Figure S1

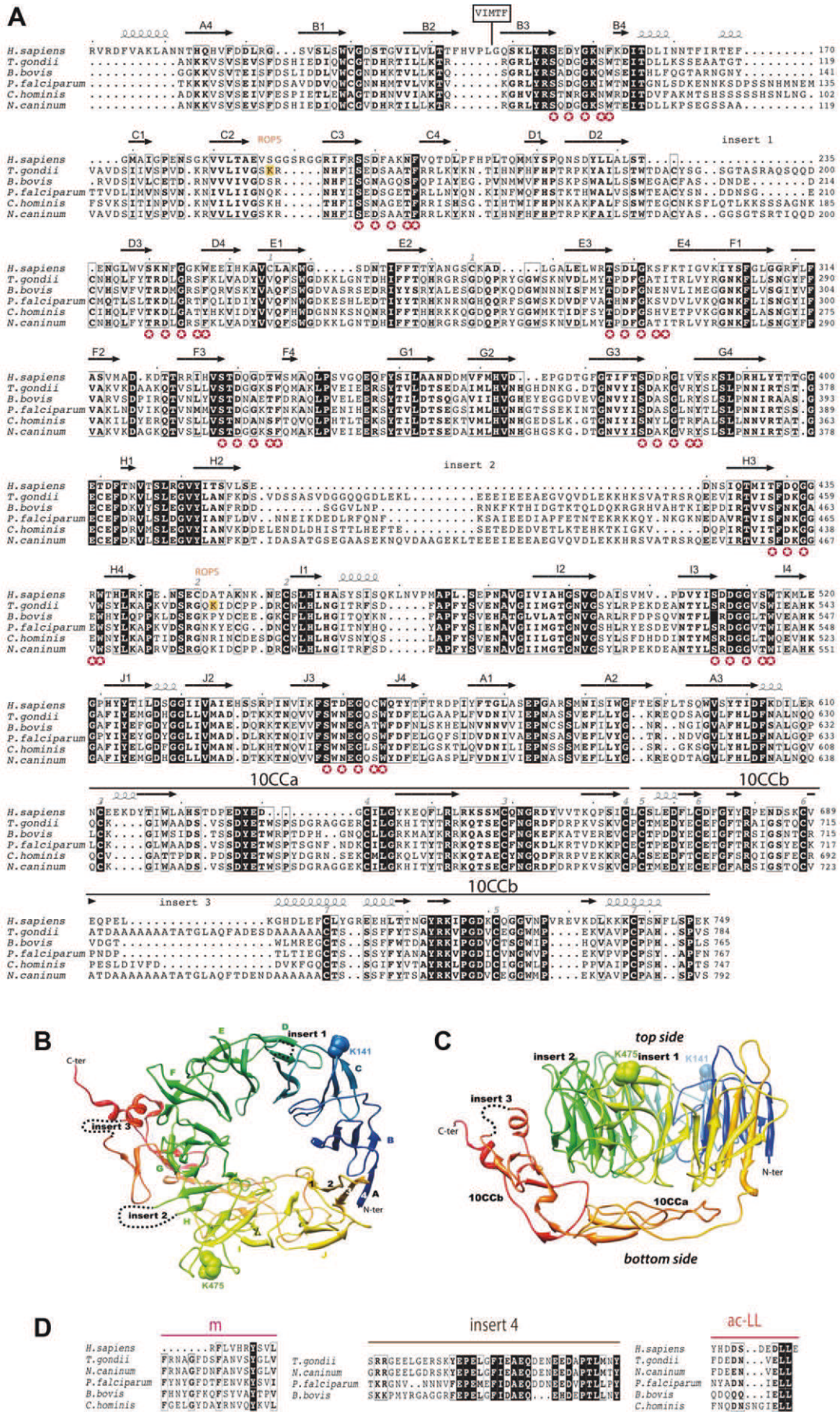


Figure S1. Multiple alignment of the sequence of human sortilin luminal domain with those of sortilins from Apicomplexa, related to Figure 1.

(A) The luminal domain of the deduced amino acid sequence of TgSORTLR after full length cDNA sequencing comprises a ten-bladed β -propeller corresponding to BNR (bacterial neuraminidase repeats) followed by two small domains, designated as 10CCa and 10CCb and interacting extensively with the β -propeller. Secondary structures, as observed in the crystal structure of human sortilin (pdb 3f6k) are reported above of the alignment. β -strands are designated following the blades (A to J) and the position of the strand within the blades. Blade A includes β -strands belonging to the extreme N- and C-termini of the domain (A4 and A1-A2-A3, respectively). Amino acids of human sortilin are indicated within a box (loop B2-B3). Groups of five stars (red and white) correspond to the Asp-box consensus sequences ((S/t)-X-(D/n)-X-G-X-(T/s)-(W/f/y)-X, wherein capital letters represent the most conserved residue in a given positions, lowercase letters indicate the more or less commonly seen alternatives and X represents a variable position. Large insertions are observed in apicomplexan sequences within the D2-D3 loop (insert 1) and the H2-H3 loop (insert 2) in the BNRs, as well as in the 10CCb domain (insert 3). Sortilin sequences are from human (UniProt Q99523), *T. gondii* (UniProt B6KKQ8), *B. bovis* (UniProt A7AWC7), *P. falciparum* (isolate 3D7) (UniProt Q8IKV8), *C. hominis* (UniProt Q5CMB4), *N. caninum* (gi 325115619). The DSP-modified lysine residues that could be involved in interacting with ROP5 are indicated in yellow highlighting. (B, C) Ribbon representation of a TgSORTLR three-dimensional structural model made using as template the experimental structure of human sortilin (pdb 3f6k) and the alignment provided in panel A. The ten-bladed propeller, 10CC modules and the three apicomplexan-specific insertions of the luminal domain are shown. Blades are labeled A to J, and strands within blades are labeled from 1 (inner strand) to 4 (outer strand), as shown on blade A. The DSP modified lysine residues (K141 and K475) are indicated in blue and green space filling balls, respectively. (D) Multiple alignments of sequences from conserved regions in the C-terminal tail; m, membrane-adjacent motif; insert 4, an intermediate motif; ac-LL, acidic cluster-di-leucine motif.

Figure S2

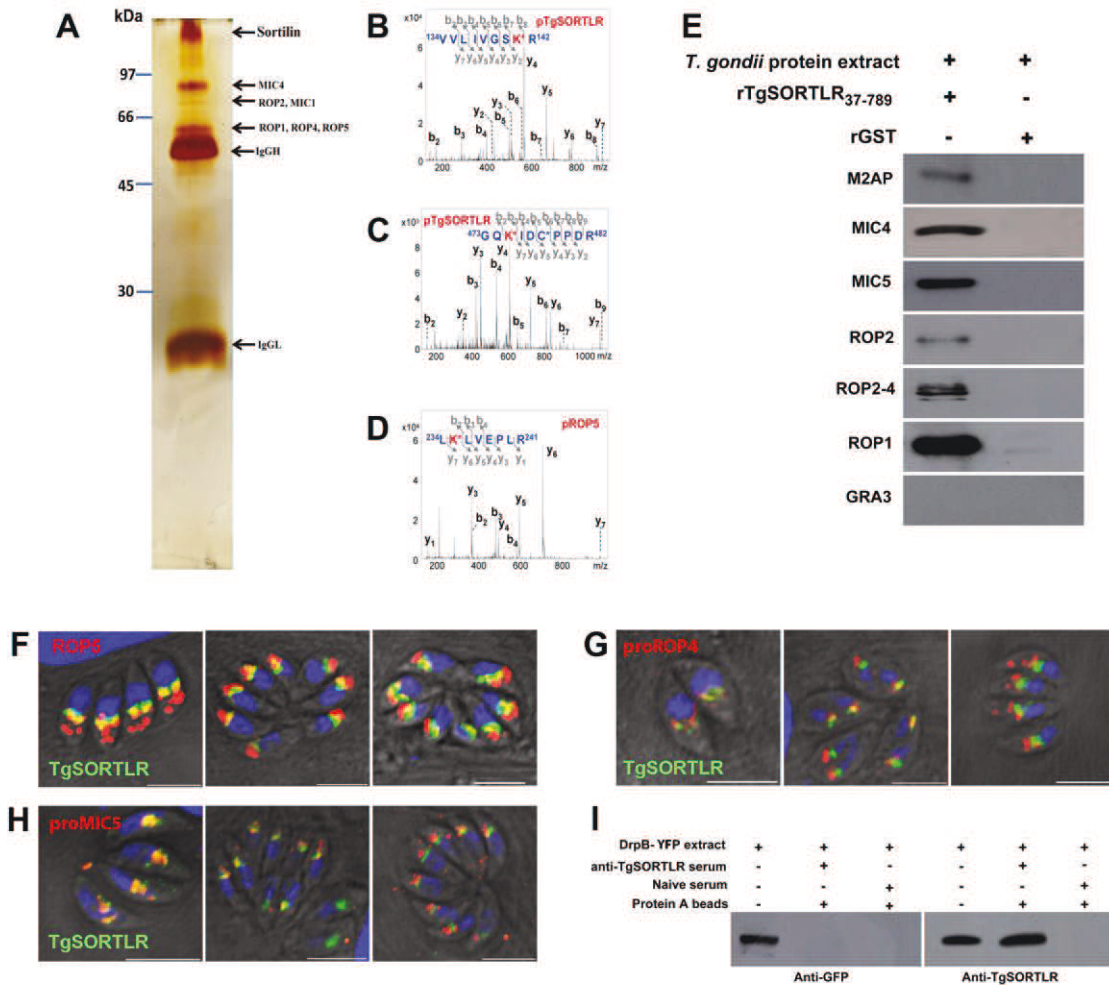


Figure S2. Immunoprecipitation of TgSORTLR partners and proteomic analyses demonstrate that rhoptry and microneme proteins are present in the Golgi-endosomal associated structures in which resides TgSORTLR, related to Figure 2.

(A) Coimmunoprecipitation of TgSORTLR binding partners. The positions of microneme and rhoptry proteins that bind to TgSORTLR are indicated. (B, C) Proteomic analysis and MS/MS spectra of two tryptic-generated peptides (designated pTgSORTLR) containing the chemically DSP modified lysine K143 and K475 from TgSORTLR. (D) Proteomic analysis and MS/MS spectrum of a tryptic-generated peptide (designated pROP5) containing the chemically DSP modified lysine K235 from ROP5, a TgSORTLR protein ligand. (E) Immunoblots demonstrating that the purified recombinant luminal domain of rTgSORTLR₃₇₋₇₈₉-GST immobilized to glutathione-Sepharose beads can directly pull down rhoptry ROP1, ROP2, ROP2-4 proteins as well as other microneme MIC4, MIC5 and MA2P proteins. Proteins were pulled down from a total protein extract from tachyzoites extracted by SDS neutralized with Triton-X-100 detergent prior GST pull down experiments followed by immunoblot analyses.

No ROP or MIC proteins bind to the GST alone coupled to glutathione-Sepharose beads using the same amount of total protein extracts. We confirmed that no dense granule proteins as exemplified by GRA3 can be pulled down by the recombinant luminal domain of TgSORTLR. This confirms the proteomic data shown in Table S1. One third of the eluates were analyzed and blots were incubated with rabbit polyclonal specific antibodies to MA2P, MIC4, MIC5 and GRA3 whereas monoclonal antibodies specific to ROP1, ROP2, ROP2-4 were used. (F) Confocal images of double fluorescence labeling of formaldehyde-fixed intracellular tachyzoites using monoclonal anti-ROP5 (red) and mouse polyclonal anti-TgSORTLR antibodies (green). Three different vacuoles are shown for each pair of antibodies for this panel and panels B and C. Bars, 5 μm . (G) Confocal images intracellular tachyzoites stained with rabbit polyclonal antibodies specific to the propeptide of proROP4 (red) and the mouse polyclonal anti-TgSORTLR antibodies (green). Bars, 5 μm . (H) Confocal images of intracellular parasites stained with rabbit polyclonal antibodies specific to the propeptide specific of proMIC5 (red) and mouse polyclonal anti-TgSORTLR antibodies (green). Bars, 5 μm . (I) Immunoblots showing that DrpB-YFP fails to co-immunoprecipitate with TgSORTLR. The monoclonal antibody anti-GFP (Clontech) and the polyclonal antibody anti-TgSORTLR were used.

Figure S3

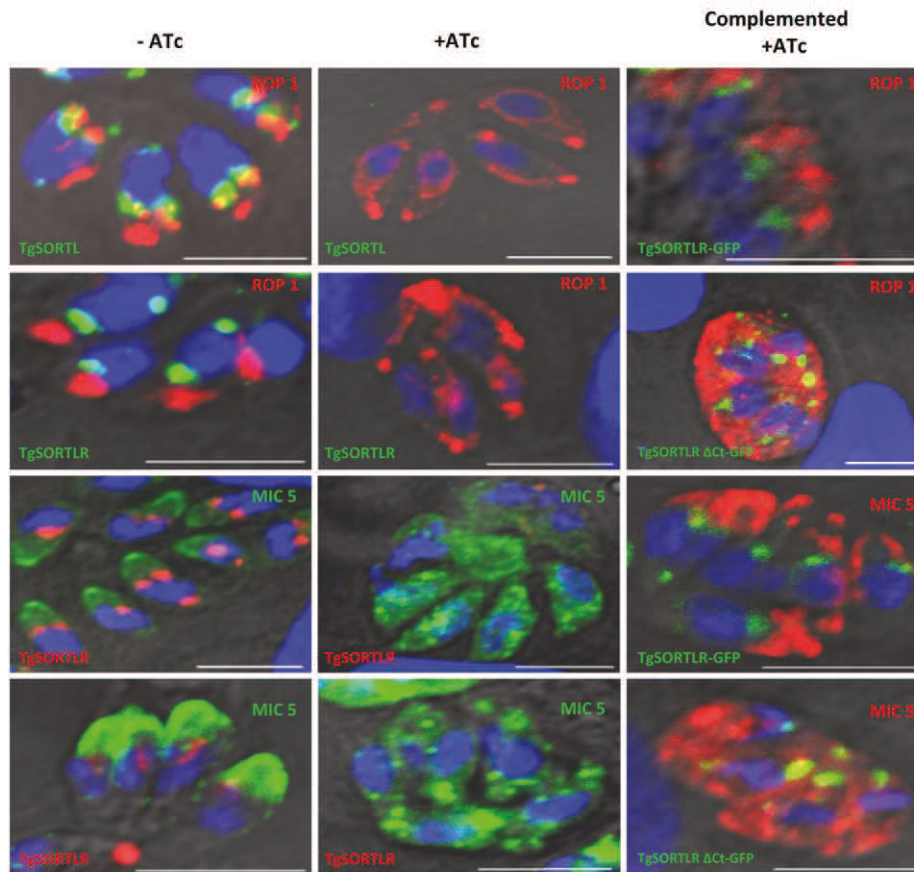


Figure S3. Ectopic expression of TgSORTLR-GFP from the GRA1 promoter rescues apical microneme and rhoptry patterns, related to Figure 4.

Complementation with ectopic TgSORTLR-GFP (green, see labels) restored the apical microneme pattern as demonstrated by staining with rabbit polyclonal anti-MIC5 antibodies (red, top two panels) and rhoptry pattern revealed by staining with monoclonal anti-ROP1 antibodies (red, bottom two panels). In contrast, TgSORTLR lacking the C-terminal (TgSORTLR Δ Ct-GFP; green, see labels) failed to rescue the apical rhoptry and microneme signals. Bar 5 μ m.

Figure S4

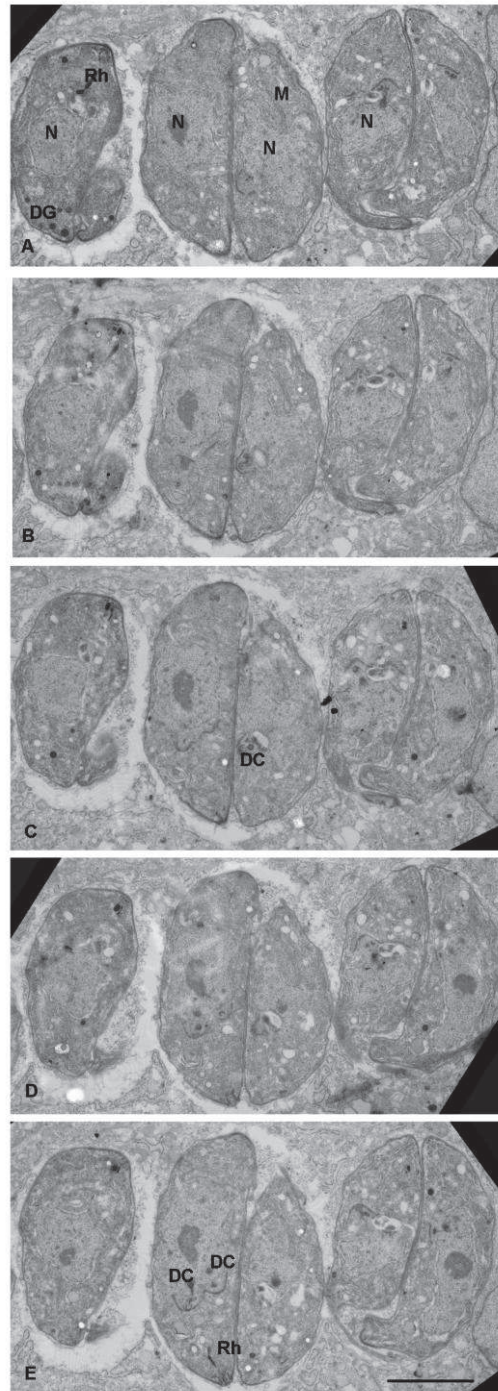


Figure S4. Serial ultrathin sections of iKO mutants lacking TgSORTLR, related to Figure 5.

Five serial ultrathin sections spaced 100 nm apart through five individual TgSORTLR-deficient parasites after 48 h of ATc treatment. These ultrastructural images confirm the absence of typical rophtries in 23 out of the 25 serial electron micrographs. Only two ultrathin sections revealed profoundly altered and residual rophtries (Rh, panel A and E). Also, no typical micronemes can be observed in all 25 serial ultrathin sections whereas numerous dense granules (DG) were detected. N, nucleus; DC, daughter cells. Bar, 200 nm.

Supplemental Tables

Table S1

Protein name	Gene ID	Protein molecular weight (Da)	Percentage sequence coverage	Number of unique peptides after Reassignator	Peptide sequence	Peptide start index	Peptide stop index
Sortilin, putative	TGME49_090160	105 802	7%	7	TILK	83	87
					NHFISEDSAATFR	143	155
					WLVIVGSR	134	142
					TSTGECEFDK	375	384
					SWTEITDLLK	102	111
					STSTENEPIPR	938	948
					GQKIDCPPDR	473	482
MIC1 (microneme protein MIC1)	TGME49_091890	48 652	5%	2	LVEEGVQR	134	141
					CQEIAAELCQSGLR	45	58
MIC4 (microneme protein MIC4)	TGME49_008030	63 001	7%	4	GVLGVTSGPK	202	211
					TGVTGVTVGPR	367	377
					MQLYSSPQDR	286	295
					EFCDFGGSIR	378	387
ROP1 (surface protein rhoptyr, putative)	TGGT1_085550	49 523	3%	1	GEQPEGQQPQGPVR	297	310
ROP 2 (Rhoptry kinase family protein ROP2A)	TGVEG_030040	64 014	18%	10	FFLYPR	354	359
					DMWVLSR	347	353
					ALLEGFLR	515	522
					AAAIPAASR	153	163
					QLSEQVLR	297	304
					FIFPIDLVK	323	331
					GFAPPETTAER	445	455
					LLPLGAMETSEYEQLR	529	544
					IPETSWNENER	209	220
					GTPGDVVIEELFNR	194	208
ROP4 (Rhoptry kinase family protein ROP4 / ROP7)	TGVEG_050040	63 984	5%	3	VASELGGPGR	248	257
					LYLTVQAVR	393	401
					TLWAEGGVVR	238	247
ROP5 (Rhoptry kinase family protein ROP5)	TGME49_108080	60 851	18%	11	LHEATFAAAR	279	288
					LVEPLR	236	241
					WLSGLGR	147	153
					FLNFDR	506	511
					LAANLQSK	376	383
					TNDLASGTPHVAR	34	46
					LLGESPEEAR	289	298
					LKLVLEPLR	234	241
					VFTMGAENSR	264	273
					GPASSVPVTYAPR	418	430
					VPASSTTTSASEGIFR	80	95

Table S1 continued

Actin	TGME49_009030	41 890	43%	15	GILTLK LDLAGR AGVAGDDAPR TFDSIMK EYDESGPSIVHR DLTEYMMK GYGFTTSAEK ELTSLAPSTMK DCYVGDEAQQSK AVFPSIVGKPK CPEALFQPSFLGK VAPEEHPVLLTEAPLNPKANR LCYIALDFDEEMK GYGFTTSAEK SYELPDGNITVGNR IQQSLLR ANAEGTSLAIR LVELDTGVASPVFAR AVLSIDPAK FDSIGVENTEARN LTGMAFR YEDIVAARK SAGVNIIPASTGAAK SSDVIVSNASCITNCLAPLAK VPVPDVSVDLTCK LTGMAFRVPDVSVDLTCK LVELAHYMSVQDGA	64 179 20 278 361 185 198 317 52 30 258 97 217 198 240 258 401 273 219 114 230 257 203 142 237 230 327	69 184 29 285 373 192 207 327 62 40 270 117 229 211 255 264 412 287 227 126 236 265 217 162 250 250 340
Conserved hypothetical protein	TGGT1_053770	47 891	8%	3			
Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	TGME49_036040	46 944	5%	2			
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGGT1_033520	36 610	24%	7			

Table S1. Complete list of proteins and the peptides identified by mass spectrometry using *nano-LC-MS/MS*, related to Figure 3.

MS and MS/MS data were analyzed using a local Mascot server (Matrix Science, London, UK) for search against an in-house generated protein database composed of protein sequences of *Apicomplexa* downloaded from NCBI Inr (May 25, 2009) concatenated with reversed copies of all sequences (total 307,386 entries). Homologies were identified based on annotation available on ToxoDB or by manual Blast against the non-redundant NCBI protein database. K (red) in each peptide indicates the lysine residue chemically modified by DSP.

Table S2

Protein name	Gene ID	Protein molecular weight (kDa)	Number of unique peptides	Percentage sequence coverage	Peptide sequence
Adaptin proteins					
Beta adaptin protein, putative	TGGT1_049890	101.9	20	26.6%	AAEVLDR - AQPELAILAINTFR - CVAVLDLIQTK - DSLDNPMLIR - EYATEVDVDFVR - IQLHLTLANK - LDILVR - LEEITEVLYEPLRR - LIGNISLSSVYHK - LSHANSAVLSAIK - LVLYVINYAK - MATEETYNDLR - NIELIVQK - QMQAANISLVAQR - QSSLMASAPSSQSPQAVTK - TGLQVSAALTR - VIAAMTVGK - VNYVVQEAIVAIDIFRK - VTNPDVVR - VVFAPKPPINEDADALDYNTLDR
Gamma adaptin, putative	TGME49_113670	107.2	14	22%	ASPOGIPPHASGAPSSGAGVAGGSVAGSSGDK - FETSNNVEVQQR - FVNVGDFPAGLLA - GDAESSASISDVLAHVATNTEGAK - GHLLSPNGGGSMTEDTLAIPTFR - LLACLALLADR - QGQSGSTATLHEASGSEK - QGVLTQLLTAALK - QVADLLISVADQLSSFPK - SLSLGGSFASLSGR - THIPTLVK - TIMTIEDDPGLR - VLALLAK - VLGVNIILGR
Mu1 adaptin	TGME49_089770	48.9	7	22%	ALEESIR - FEIPIFTVSGITVR - LNTQVKPLIWDVAVDVDTGR - LSEVLQEYFK - SGYQALPWVR - SVASGVEIHVPVPPDADSPHFK - YITQNGEYQLR
Transport Protein Sec					
Transport protein Sec24, putative	TGME49_077000	108.02	11	18%	AVVQSVQGEHLNAMR - DAVLEALDTIPSLWR - ILLFASFPPTVGALVTK - LLALPVDR - LOHSQQLENDIVHIITR - MLPLHNLNFGGSPDR - SAGGIPSSPFHAATPANPGAAPPPR - SGGLAGADGAGTDGSSR - SQLQAPAPPMIPAAAGGAAPLQQPR - TTGWEAVMR - VLDGQEEVILPPALR
Transport protein Sec23, putative	TGME49_091680	87.58	9	17%	ELTSTQIQQLGLAR - FAEPNTIDVAPGDFQEAVALMTR - GNKELTSTQIQQLGLAR - QLLOAPLEDAK - QSFLOFQTSYLHPSGR - SANAYVPAGGPGAPAGSPLLRPAAAR - SHFLQTFNASPDETAYYR - TESESLDVLR - YVTQLANQAVR
Clathrin					
Clathrin heavy chain, putative	TGME49_090950	194.46	8	5%	FGLFGEADTLK - FGVVYIVTK - LEADYAGLLR - LEDFAASVDAAR - LLLQWLEAR - TAQVIQPK - VAEGNQEPVHNALAK - WVAPTLLALVTRD
Clathrin-associated adaptor complex small chain, putative	TGME49_070370	19.66	1	9%	VMINAQDALMEESNTK
Vacuolar sorting proteins					
Vacuolar sorting protein 9 domain-containing protein	TGME49_030140	140.02	8	9%	DVSVSSPSVSHASPPAGASR - FLQQVQNSAAAAASLPQPHADSGR - FVEMFPTNLSR - GLLTLPVSPVLFQDEK - HLEVPLIPNASALALGAR - LLEAQQPATR - TPYNVFLER - VGQIPALLK
Vacuolar protein sorting 26, putative	TGME49_063500	34.18	3	14%	DLEPPGVLVESK - FEIMDGAPIR - TETAGTGSSAVTSETLTK
Vacuolar sorting protein 35, putative	TGME49_042660	95.6	2	3%	LSPAGVEAVVELLSPLR - VLVGSTLVR
Hypothetical proteins					
Conserved hypothetical protein	TGGT1_053770	47.9	3	8%	ANAEGTSIAITR - AQRPDPEPPAPR - LPLLGGGIFR
Hypothetical protein	TGME49_094220	62.18	2	5%	SGFSATELVPVPSR - TVGGGADGFFPRR
Hypothetical protein	TGME49_028630	24.26	1	10%	SSASSEPALVTPGAAGEPVR

Table S2. Proteomic analyses of cytosolic cargo sorting proteins that bind to the cytoplasmic tail of TgSORTLR, related to Figure 6.

The C-terminus tail of amino acids from 808 to 962 was cloned and fused to GST, and then immobilized to glutathione-Sepharose beads. The cytoplasmic protein extracts from 2×10^9 tachyzoites were incubated with 100 μ l of affinity beads, washed and eluted by Laemmli's buffer, analyzed by SDS-PAGE and stained by silver. The purified GST alone was also coupled to glutathione-Sepharose beads and incubated with the same amount of total protein extracts. The proteins pulled down by the rTgSORTLR₈₀₈₋₉₆₂-GST and GST alone were cut and processed for proteomic analyses as above. The proteins listed here correspond to specific binding partners that are deduced after the removal of unspecific proteins that commonly bind to both the GST alone and rTgSORTLR₈₀₈₋₉₆₂-GST.

Supplemental Experimental Procedures

Monoclonal and polyclonal antibodies

The following monoclonal antibodies were used: mAb T53E2 or 1G11 (anti-ROP5), mAb 5B1 (anti-MIC4), mAb T34A7 (anti-ROP2-4), mAb T52D1 (anti-ROP2), mAb T101F7 or 1E12 (anti-MIC1), mAb T34F2H9 (anti-MIC2), mAb T4 2F3 (anti-MIC3) and mAb 11G8 (anti-Atrx2). These antibodies were used at the dilution 1:500. The rabbit polyclonal antibodies were as follows: anti-TgCPL (1:200), anti-MIC5 (1:1000), anti-MIC10 (1:500), anti-TgM2AP (1:1000), anti-ROP1 (1:1000), anti-ROP7 (1:500) and anti-proROP4 (1:500). In addition, the mouse polyclonal anti-TgSORTLR (1/500), rat anti-HSP60 (1/1000) rabbit anti-SERCA (1:1000), rabbit anti-GAP45 (1:1000), rabbit anti-HA9, rat anti-HA9 and mouse anti-HA9 were also used.

The following secondary antibodies from Invitrogen were as follows: Alexa Fluor goat 488 nm-goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 594-nm goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488-nm goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 594-nm goat anti-mouse IgG (H+L), and Alexa Fluor 633-nm goat anti-rabbit IgG (H+ L).

Nucleotide sequences for PCR and cloning

For recombinant sortilin expression in *E. coli*, the following primers were used: forward, ggccGGATCCAGTGAAGACGCGCAGAAGCGTGAA and reverse, ccggCGCCGGCGGCACTGGGTGGACCCGATGGC. To knock-in TgSORTLR gene, the following primers were used for the 5' end DNA fragment: forward, ccggCATATGATGTCATCAGGAGCCCCTCTGCC and reverse, ccggCATATGGGTGACTGTCTGTACACCGGAGG while for the 3' end DNA fragment, the primers were: forward, ccggAGATCTATGGCGCACAGCTTCGCACGAG and reverse, ccggCCTAGGCCGCGGTAGACCAGACGCGTG. For expression of TgSORTLR protein lacking C-terminal tail, the primers were: forward, ccggGGATCCCGCAGAAGCGTGAA and reverse, ccggGAATTCTCTTCCAGTTTTTCGCCAGATAGTTGATG. For expression of TgSORTLR lacking N-terminal tail, the primers were: forward, ccggGGATCCcccgggTCTAGAGTCAGTCGAGGAGGAAAGACAGTGTT and reverse, ccggGAATTCAAGAAGTTCGACGTTATCCTCGTCAATCG. The following primers were used to add the peptide signal to TgSORTLR lacking N-terminal tail: forward, ccggGGATCCATGGCGCACAGCTTCGCACGAGGCCCGCCACCGGCGGCCGCGCCGA

ACACTCGCGGTTTTTCCTTGCT and reverse, ccggTCTAGAGAAGAATCCCGGCAGAA GCGAAG.

Imaging by confocal microscopy

For immunofluorescence assays (IFA), intracellular tachyzoites were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 minutes on ice, followed by two PBS washes. Intracellular parasites were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS containing 0.1% glycine for 10 minutes at room temperature. Samples were blocked with 3% BSA in the same buffer and diluted immune sera were added on parasites in the same buffer for one hour at 37°C. Alexa Fluor secondary antibody (Invitrogen) diluted at 1:1000 was added in addition to DAPI for nucleus staining.

Confocal imaging was performed with a LSM710 microscope (Zeiss) and a Plan Apochromat objective (Plan-Apochromat 636/1.40 Oil DIC M27, Zeiss). The associated software (Zen 2008) enabled the adjustment of acquisition parameters. Fluorescent signals were collected sequentially, with a 4 lines average, a zoom factor (varying between 2 and 4) and resulting images are 5126512 pixels in size, and 8 bits in resolution (256 gray levels). By setting the photomultiplier tubes and the pinhole size (1 AU) correctly, there was no signal bleed through. The images were treated with ImageJ (NIH). Z-stack acquisitions enabled to visualize the 3D localization of fluorescent signals. Rotation (360° around the y axis) movies were created with the Zen software, at a rate of 5 frames per second.

Electron microscopy

For immuno-electron microscopy, the intracellular tachyzoites were fixed overnight at 4°C in 8% paraformaldehyde containing 0.01 % glutaraldehyde in PBS buffer, thoroughly washed in the same buffer and infused in sucrose 2.3 M containing 20% polyvinyl pyrrolidone 10000 in phosphate buffer 0.1 M. The pellets were mounted on ultracryotome supports and rapidly frozen in melting nitrogen. Ultrathin sections of about 90–100 nm were obtained using Reichert Ultra Cut E ultramicrotome equipped with a FC4 device. The sections were then picked on formvar coated grids and incubated in blocking medium (0.05 M glycine, 5% fish gelatin in 0.1 M PBS buffer) for 30 min. The grids were incubated with the specific antibodies for 1 hour at 37°C or overnight at 4°C. After washing, sections were incubated at room temperature for 30 min in the corresponding secondary gold conjugates (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) diluted in the same buffer. Following a final thorough

wash in PBS alone, the grids were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 10 min at room temperature and washed in water. After staining with 0.5% uranyl acetate in 1.5% methyl cellulose, sections were observed on a Hitachi H600 transmission electron microscope at 75 kV accelerating voltage.

Live video microscopy

Images were obtained from an AxioObserver Z1 (Zeiss), equipped with a regulation chamber for temperature and CO₂, through a Plan Apochromat objective (Plan-Apochromat 1006/1.46 Oil, Zeiss). Samples were excited with a Colibri source (Zeiss) and fluorescence signal was collected with an Axio mRm Camera (Zeiss), through different filters sets (Filter Set 38HE, 60HE, Zeiss). Experiments were performed by exposing the sample during three minutes. The images were treated using ImageJ (NIH).

***In vitro* gliding assay and host cell invasion**

Intracellular TgSORTLR iKO parasites grown in monolayer HFF cells with or without ATc for 48 h were released mechanically and used in three independent experiments. For gliding assays, 510⁵ untreated and ATc-treated iKO mutants were filtered in DMEM containing 10 mM HEPES and 1 mM EGTA. After centrifugation at 1000 rpm for 10 minutes, the parasite pellet was resuspended in the same medium and the parasites were allowed to move for 15 min at 37°C on slides previously coated overnight with 50% FCS prepared in PBS. Slides were immediately fixed with 4% PFA and processed for immunofluorescence assays using antibodies specific to the major surface antigen SAG1 in PBS. Trails of gliding parasites were visualized with a Zeiss Axiophot microscope. For host cell invasion assays, 2x10⁵ treated or untreated parasites were also resuspended with DMEM medium containing 10% FCS, 2mM L-glutamine and 10 000 U/mL Penicillin-Streptomycin, loaded onto confluent monolayer HFF cells and grown for 24 h at 37° C. The intracellular parasites were fixed and stained with monoclonal antibody specific to SAG1 for immunofluorescence as above and intracellular tachyzoites were counted under Zeiss Axiophot microscopy.

Sample preparation for proteomic analysis

Silver stained gels were systematically cut into slices, and in-gel digestion was performed with an automated protein digestion system, Mass PREP Station (Waters, Milford, MA). The gel slices were washed three times in a mixture containing 25 mM NH₄HCO₃: CH₃CN (1:1,

v/v). The cysteine residues were reduced with 50 mL of 10 mM dithiothreitol at 57°C and alkylated with 50 mL of 55 mM iodoacetamide. After dehydration with acetonitrile, the proteins were cleaved in gel with 40 mL of 12.5 ng/mL of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM NH_4HCO_3 at 37°C for 4 hours. The tryptic peptides were extracted with 60% acetonitrile in 0.1% formic acid.

Mass spectrometry analysis

NanoLC-MS/MS analyses were performed using an Agilent 1100 series nanoHPLC-Chip/MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) coupled to a HCT Plus ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The chip contained a Zorbax 300SB-C18 column (43 mm \times 675 mm, 5 mm particle size) and a Zorbax 300SB-C18 enrichment column (40 nL, 5 mm particle size). The solvent system consisted of 2% acetonitrile, 0.1% formic acid in water (solvent A) and 2% water, 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). 2 mL of each sample was loaded into the enrichment column at a flow rate set to 3.75 mL/min with solvent A. Elution was performed at a flow rate of 300 nL/min with a 8–40% linear gradient (solvent B) in 7 minutes followed by a 3 min stage at 70% of solvent B before reconditioning the column at 92% of solvent A. The system was fully controlled by ChemStation Rev B.01.03.SRI (Agilent Technologies). The MS instrument was operated with the following settings: source temperature was set to 320°C while cone gas flow was at 3 l/min. The capillary voltage was optimized to 21850 V. The MS spectra were acquired in the positive ion mode on the mass range 250 to 2500 m/z using the standard enhanced resolution mode at a scan rate of 8.100 m/z/s. The Ion Charge Control was fixed at 100000 with a maximum accumulation time of 200 ms and the number of averages was set to 4. For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes. The 3 most abundant peptides were selected on each MS spectrum for further isolation and fragmentation with a preference for doubly charged ions (absolute threshold of 2000 and a relative of 5%). Ions were excluded after the acquisition of 2 MS/MS spectra and the exclusion was released after one minute. The Smart Parameters Setting option was used for the selected precursor ions. The MS/MS spectra were acquired on the mass range 50 to 2800 m/z using the ultrascan resolution mode at a scan rate of 26.000 m/z/s. The Ion Charge Control was fixed at 300000 and 6 scans were averaged to obtain a MS/MS spectrum. The MS/MS fragmentation amplitude was set to 1.5 V. The system was fully controlled by the Esquire Control 5.3 Build 11.0 software (Bruker Daltonics). Mass data collected during the nanoLC-MS/MS analyses

were processed and converted into *.mgf files using the Data Analysis 3.3 Build 146 software (Bruker Daltonics).

Protein identification

The MS/MS data were analyzed using the MASCOT 2.2.0. Algorithm (Matrix Science, London, UK) and Open Mass Spectrometry Search Algorithm (OMSSA) for search against an in-house generated protein database, which is composed of protein sequences of Apicomplexa downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (on May 25, 2009) concatenated with reversed copies of all sequences (total 307386 entries). Searches were performed with a mass tolerance of 0.25 Da in both MS and MS/MS mode and with the following parameters: full trypsin specificity with one missed cleavage, methionine oxidation, protein amino-terminal acetylation and cystein carbamidomethylation. The Mascot and OMSSA results were loaded into the Scaffold software (Proteome Software, Portland, USA). To minimize false positive identifications, results were subjected to very stringent filtering criteria as follows. For the identification of proteins with two peptides or more, a Mascot ion score above the identity score or an OMSSA E-value below $2 \log (e^2)$ was required. The target-decoy database search allowed us to control and estimate the false positive identification rate of our study.

Mes travaux de thèse dont l'objectif principal est d'élucider les fonctions biologiques de l'homologue de la sortiline chez *T. gondii* ont d'abord débuté par des études *in silico* qui nous ont permis d'observer que la structure de TgSORTLR est similaire à la celle de la sortiline humaine formant un large tunnel du côté N-terminal constitué de dix domaines nommés « bêta-propeller » qui sont potentiellement impliqués dans l'interaction avec les ligands (Figure 1A, page 517 et Figure S1B-C dans l'article). Le domaine C-terminal de TgSORTLR bien que plus divergent contient également des motifs que l'on retrouve dans les protéines à domaine Vps10p mais aussi dans les récepteurs au Mannose-6-Phosphate dans les cellules de mammifères et qui sont impliqués dans le recrutement des protéines de la machinerie de transport vésiculaire (Figure 1A dans l'article, page 517).

Nous avons tout d'abord produit une protéine recombinante correspondant à la première boucle luminale de TgSORTLR et obtenu un anticorps polyclonal de souris dirigé spécifiquement contre la protéine TgSORTLR endogène (Figure 1B dans l'article, page 517). Cet anticorps polyclonal et des vecteurs d'expression portant le gène de la sortiline étiquetée par un épitope HA-FLAG ou une protéine GFP, nous ont permis d'observer grâce à des techniques de microscopie confocale et électronique que TgSORTLR réside majoritairement dans les saccules de l'appareil de Golgi et les vésicules post-golgiennes (Figure 1D-F article ; page 517).

Nous avons observé que les protéines de rhoptries et de micronèmes transitent par les compartiments subcellulaires où réside TgSORTLR lors de leur transport au cours de la biogenèse des organites apicaux (Figure S2 F-H de l'article). Nos résultats attestent que TgSORTLR est capable de lier les protéines de rhoptries et de micronèmes (Figure 3, page 520 et tableau S1 de l'article) probablement au niveau de l'appareil de Golgi et que cette association dépend du domaine N-terminal luminal du récepteur. En effet, nous avons spécifiquement et réciproquement co-immunoprécipité certaines protéines de rhoptries et de micronèmes avec TgSORTLR (Figure 3F de l'article, page 520). Les expériences d'interactions réalisées avec des protéines TgSORTLR tronquées recombinantes suggèrent que l'extrémité N-terminale contenant les domaines « ten-beta propeller » est requise pour permettre l'interaction avec les ligands et que cette liaison serait probablement dépendante aussi de modifications post-traductionnelles ayant lieu dans le parasite car les résultats obtenus et décrits dans la Figure 3 (Figure 3H-J page 520 et Figure S2E de l'article) ont montré que les protéines de rhoptries et de micronèmes recombinantes produites en bactéries ou dans un système acellulaire sont

incapables d'interagir avec TgSORTLR alors que des protéines de rhoptries et de micronèmes extraites à partir de parasites sont capables de s'associer avec le récepteur TgSORTLR.

La surexpression par transfection transitoire du domaine luminal N-terminal résulte à la délocalisation de la protéine TgSORTLR transgénique tronquée mais aussi de la protéine entière TgSORTLR endogène (Figure 2A, page 519). Cela entraîne également une délocalisation de toutes les protéines de rhoptries et de micronèmes testées (Figure 2B et 2C page 519). Nous avons par ailleurs observé par transfection transitoire que le domaine C-terminal de TgSORTLR est suffisant pour la localisation golgienne à la protéine TgSORTLR transgénique tronquée dépourvue de domaine N-terminal (Figure 2A, page 519) et nous avons établi que ce domaine interagit avec diverses protéines cytosoliques impliquées dans le transport vésiculaire telles que des homologues de Sec23, Sec24, des adaptines, la clathrine et des protéines du complexe retromer (Vacuolar Protein Sorting) (Figure 6, page 523 et tableau S2 de l'article). Ces résultats suggèrent que ces partenaires cytosoliques de TgSORTLR pourraient jouer un rôle déterminant dans la localisation et le trafic intracellulaire de TgSORTLR et de ses ligands.

L'obtention d'une souche mutante conditionnelle sensible à l'anhydrotetracycline (ATc) nous a permis de démontrer que TgSORTLR est essentielle au trafic intracellulaire des protéines de rhoptries et de micronèmes et pour la biogenèse des organites clés de sécrétion qui représentent les éléments majeurs de la transmission intracellulaire de *T. gondii* et des autres parasites Apicomplexes. La déplétion de TgSORTLR conduit en effet à la délocalisation complète des protéines de rhoptries et de micronèmes (article Figure 4, page 521) et à l'absence des organites apicaux chez les parasites néoformés (article Figure 5, page 522).

De plus, les études phénotypiques attestent que TgSORTLR est cruciale pour la motilité parasitaire, l'invasion cellulaire et la virulence *in vivo*. Dans un modèle murin, l'infection avec le parasite mutant dépourvus de TgSORTLR en présence d'ATc conduit à une réponse anticorps de la part de l'hôte mais n'induit pas la mort de l'animal, ni les symptômes visibles de l'infection (article Figure 7, page 524).

TgSORTLR lierait donc les protéines de rhoptries et de micronèmes via son domaine N-terminal et recruterait à l'aide de son domaine cytosolique des partenaires de la machinerie de transport vésiculaire pour intégrer ses ligands dans des vésicules destinées aux organites de sécrétion apicaux.

Nos résultats suggèrent à la fois l'existence de mécanismes de trafic intracellulaire communs aux autres cellules eucaryotes et de mécanismes originaux aux parasites Apicomplexa. En effet, contrairement aux autres cellules eucaryotes, nous avons montré que chez le toxoplasme, la protéine homologue à la sortiline est indispensable à sa survie, ce qui traduit que les parasites Apicomplexa ne possèdent pas de mécanismes redondants de trafic protéique vers les organites de sécrétion comme les cellules de mammifères qui ont au moins deux récepteurs, le récepteur Mannose 6-Phosphate et la sortiline. En d'autres termes, à l'exception de nos observations chez *T. gondii*, les fonctions essentielles ou critiques de la sortiline n'ont pas pu être clairement définies chez les mammifères à cause de la présence de multiples récepteurs intracellulaires (Coutinho et al., 2012 ; Progida et al., 2012). Comme chez les mammifères, il existe également chez les plantes une multiplicité de récepteurs endosomaux (Robinson et al., 2012 ; Masclaux et al., 2005), ce qui n'est pas en apparence la situation qui prévaut chez *T. gondii* et probablement chez les autres parasites Apicomplexes. Nous avons également conclu que TgSORTLR agit comme un récepteur « multi-ligands » capable de lier des protéines (MIC et ROP) qui sont très structurellement différentes. Ainsi, les domaines peptidiques de l'extrémité N-terminale qui expliqueraient comment l'unique récepteur TgSORTLR de *T. gondii* identifié jusqu'alors est capable de lier à la fois des protéines de rhoptries et micronèmes restent à déterminer. Les rôles précis des partenaires putatifs du domaine C-terminal dans le trafic de TgSORTLR reste également à étudier. TgSORTLR pourrait également servir de point d'ancrage afin de connaître les acteurs majeurs impliqués dans la biogenèse des organites de sécrétion primordiaux pour le parasitisme.

II. La déplétion du récepteur TgSORTLR entraîne l'absence d'une réponse immunitaire protectrice chez les animaux infectés

Dans un modèle murin de toxoplasmose expérimentale, nous avons observé que les parasites dépourvus de TgSORTLR sont avirulents et ne provoquent pas les symptômes typiques de l'infection chez les animaux infectés (Figure 7F de l'article page 525). En effet, alors que cinq milles parasites iKO-SORT injectés dans les souris suffisent à entraîner la mort d'une souris, l'infection par des doses croissantes de parasites iKO-SORT allant de cinq milles à 2,5 millions de parasites injectés dans des souris dont l'eau de boisson contient de l'ATc n'entraîne ni la mort de l'animal, ni aucun symptôme visible de l'infection. Cependant, lors d'une seconde infection avec dix milles parasites RH sauvages, les souris sont totalement vulnérables et meurent en l'espace de dix jours (Figure 7G dans l'article, page 525). Ces résultats indiquent que TgSORTLR, certainement à cause de ses fonctions dans la biogenèse des organites apicaux, est nécessaire à la mise en place d'une immunité protectrice de la part de l'hôte contre *T. gondii*. En d'autres termes, la présence des organites de sécrétion rhoptries et micronèmes qui contiennent les protéines essentielles à la virulence, seraient nécessaire à l'établissement d'une réponse immunitaire efficace contre le parasite.

Nous avons alors comparé les réponses sérologiques des souris infectées par des doses sub-létales de parasites qui possèdent la protéine TgSORTLR en comparaison avec les souris infectées par les parasites mutants et dont l'eau de boisson contient une solution d'ATc (Figure 28B).

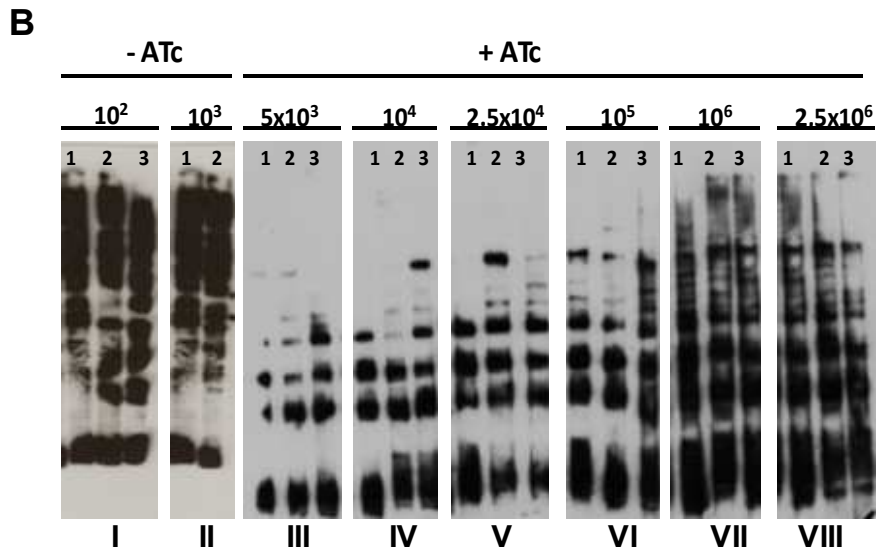
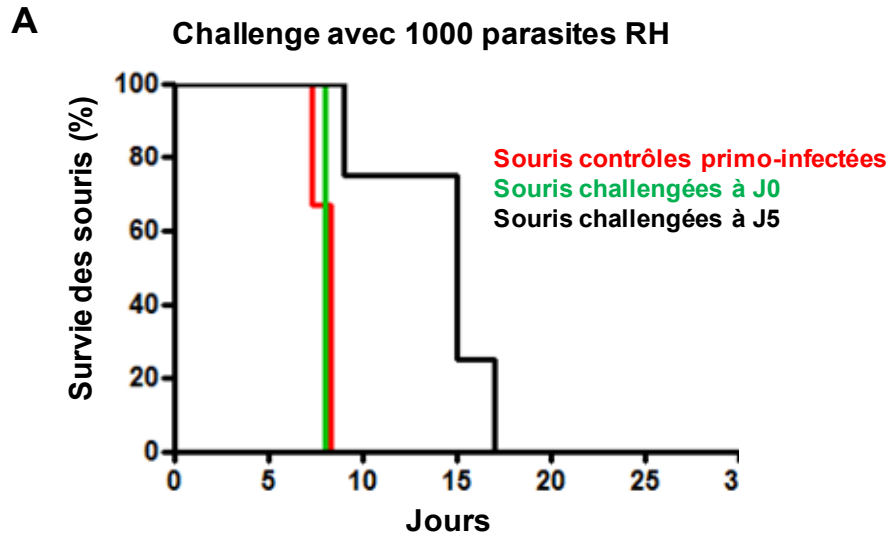


Figure 28. Les parasites dépourvus de TgSORTLR entraîne une réponse sérologique des souris mais ne confèrent qu'un décalage de mortalité dans un modèle de toxoplasmose animale contre un challenge. **A.** La propagation de l'infection toxoplasmique des parasites iKO-SORT pendant 5 jours avant l'ajout du traitement ATc retarde la mort mais ne protège pas les souris contre une seconde infection avec 10 000 parasites sauvages. Les souris sont infectées par 10000 parasites iKO-SORT puis l'ATc est ajouté à l'eau de boisson à J0 ou 5 jours après l'infection. Trente jours plus tard, une seconde infection par 10000 parasites RH est réalisée. Un groupe de souris naïves est utilisé comme contrôle négatif pour tester le bon déroulement de la seconde infection. **B.** L'infection par le parasite mutant iKO-SORT en présence d'ATc entraîne une réponse humorale dose-dépendante de la part de l'hôte. L'immuno-empreinte est réalisée avec les sérums des souris

infectées par 100, 1000 parasites iKOSORT sans ajout d'ATc (I-II) et par 5000, 10000, 100000, 1 million, 2.5 millions en présence d'ATc (III-VIII) sur des extraits parasitaires.

Nous avons constaté que les souris infectées par 100 ou 1000 parasites iKO-SORT exprimant TgSORTLR montraient une réponse humorale importante et présentaient un profil caractéristique en immuno-empreinte en reconnaissant à la fois des protéines de bas poids moléculaires correspondant classiquement aux protéines de surface et des protéines de plus hauts poids moléculaires qui correspondent probablement aux protéines de rhoptries et micronèmes (Figure 28B, panels I et II). L'infection des souris avec les parasites iKO-SORT dépourvus de TgSORTLR entraîne une réponse humorale dépendante de la dose injectée. Bien que l'infection par 2,5 millions de parasites dépourvus de TgSORTLR entraîne une réponse humorale importante de la part de l'hôte, nous avons observé que le profil des protéines reconnues en immuno-empreinte est radicalement différent de la réponse anticorps des souris infectées par des parasites où la protéine TgSORTLR est présente (Figure 28B). En effet, les protéines de bas moléculaires sont reconnues par les anticorps présents dans le sérum des souris infectées par les parasites dépourvus de TgSORTLR mais les protéines de plus hauts moléculaires qui correspondent typiquement aux protéines des rhoptries et des micronèmes n'apparaissent pas dans les résultats de l'immuno-empreinte. Les protéines de rhoptries et de micronèmes présentes dans les parasites dépourvus de TgSORTLR semblent donc être incapables d'induire une réponse humorale significative chez les souris infectées alors que nos expériences de détection fluorescente par la microscopie confocale montrent que toutes ces protéines de rhoptries et micronèmes testées sont synthétisées chez les mutants mais qu'elles sont simplement délocalisées (voir Figure 4 page 521 de l'article et Figure 32). Ces résultats suggèrent donc que les protéines de rhoptries et de micronèmes seraient donc directement impliquées dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice de la part de l'hôte mais que la présence d'organites fonctionnels soit requise à la mise en place d'une réponse immunitaire stérilisante et protectrice.

Afin d'approfondir le rôle de la propagation parasitaire dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice, nous avons infecté deux groupes de souris avec la souche parasitaire mutante iKO-SORT puis l'ATc a été ajouté dans l'eau de boisson soit au moment de l'injection pour le premier groupe, soit 5 jours après l'infection pour le second groupe c'est-à-dire après l'apparition des symptômes de l'infection. Ces deux groupes de souris survivantes ont ensuite été infectés par dix milles parasites sauvages virulents de type RH. Les résultats de la figure 28A montrent que les souris infectées par

des parasites déplétés de TgSORTLR après avoir reçu de l'ATc 5 jours après la primo-infection meurent en l'espace de 10 à 17 jours alors que les souris ayant reçu l'ATc au moment de la primo-infection meurent toutes en 8 jours.

On observe donc un décalage de la mortalité lorsque le traitement par l'ATc est différé de 5 jours suggérant que la présence de TgSORTLR est importante pour l'induction de la réponse immunitaire. Ces résultats suggèrent que la protéine TgSORTLR est impliquée dans la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice de la part de l'hôte. L'immunité protectrice semble dépendre des protéines de rhoptries et de micronèmes lesquelles sont présentes dans les parasites dépourvus de TgSORTLR et se retrouvent en partie sécrétées jusque dans la cellule hôte par l'intermédiaire des granules denses. Ces résultats suggèrent également que non seulement les protéines de rhoptries et de micronèmes sont nécessaires pour induire une réponse immunitaire efficace mais aussi que la présence de rhoptries et micronèmes fonctionnels, donc la sécrétion apicale régulée est cruciale. La voie endolysosomale empruntée par les protéines de rhoptries et de micronèmes, probablement des modifications post-traductionnelles que subissent ces protéines et leurs sécrétions par les organites apicaux puis leurs ciblage dans les compartiments tels que le cytoplasme, le noyau et le réticulum endoplasmique des cellules hôtes apparaissent comme des éléments essentiels pour l'induction d'une réponse immune protectrice.

III. L'absence de TgSORTLR entraîne une aberration de la migration électrophorétique des protéines de rhoptries et de micronèmes

Nous avons produit plusieurs protéines recombinantes rSORT₃₇₋₇₈₉, rΔ1SORT₃₇₋₇₈₉, rΔ2SORT₄₄₆₋₇₈₉, rΔ3SORT₇₃₆₋₇₈₉ représentant l'entièreté du domaine N-terminal de TgSORTLR (rSORT₃₇₋₇₈₉) ou des versions mutantes du domaine N-terminal déléetées du prodomaine, et respectivement des domaines « beta-propeller » B à D (rΔ1SORT₃₇₋₇₈₉), B à H (rΔ2SORT₄₄₆₋₇₈₉), et B à 10CCb (rΔ3SORT₇₃₆₋₇₈₉) fusionnées avec la GST. Nous avons ensuite incubé les extraits protéiques de parasites iKO-SORT cultivés en présence ou en absence d'ATc avec les différentes protéines recombinantes produites couplées à des billes de Sépharose. Nous avons alors découvert que les protéines de rhoptries et de micronèmes MIC5, ROP1 et ROP2 montrent un profil de bandes différent

en immuno-empreinte lorsque les parasites iKO-SORT sont traités ou non traités par l'ATc (Figures 29A, 29B et 29C, colonnes 1 et 2).

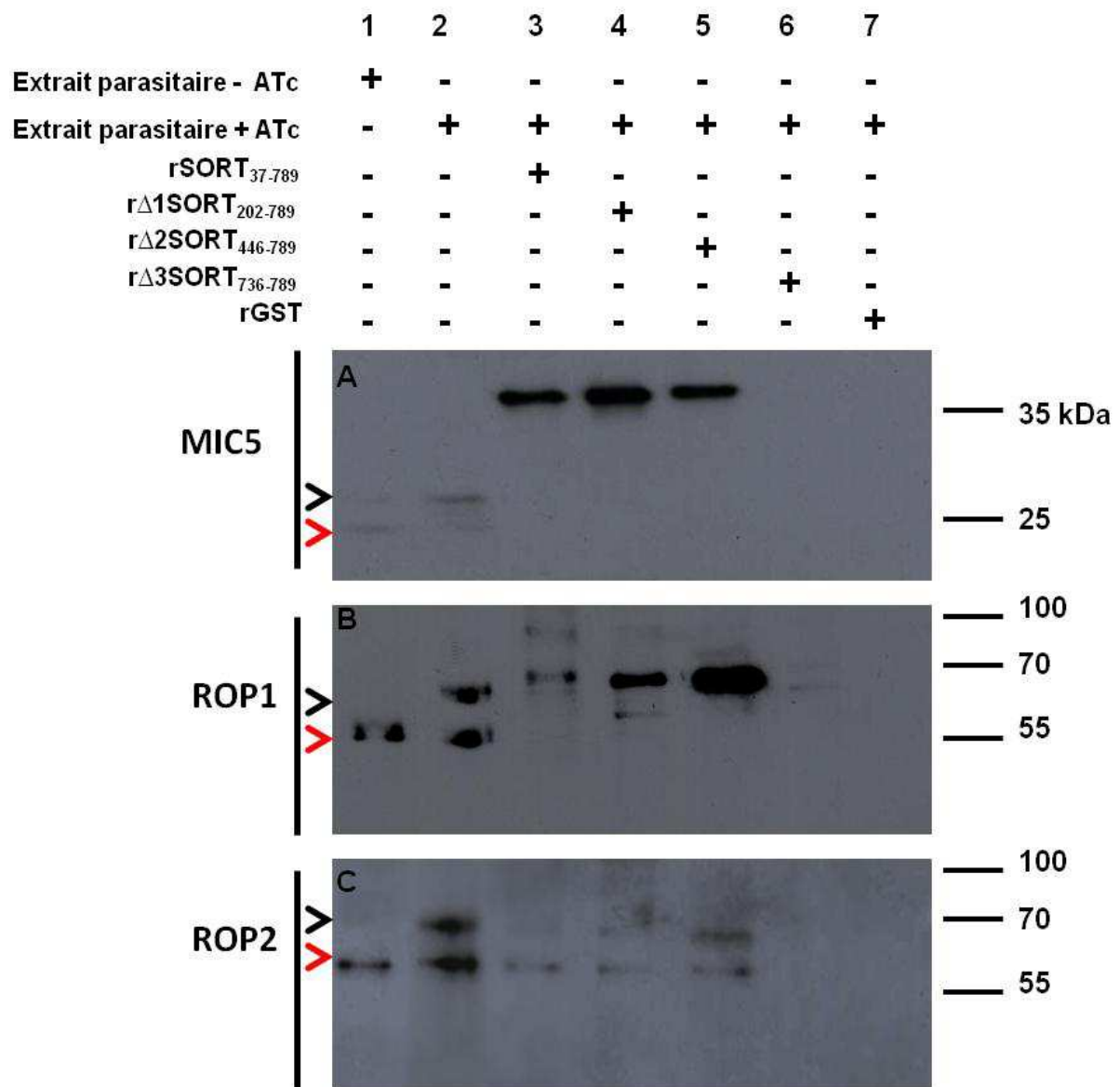


Figure 29. Chromatographie d'affinité sur des extraits de parasites dépourvus de TgSORTLR par les protéines recombinantes rSORT₃₇₋₇₈₉, rΔ1SORT₃₇₋₇₈₉, rΔ2SORT₄₄₆₋₇₈₉, rΔ3SORT₇₃₆₋₇₈₉ et rGST. Analyse par immuno-empreinte grâce aux anticorps polyclonaux anti-MIC5, anti-ROP1 et anti-ROP2. rGST est utilisé ici comme contrôle négatif.

On remarque que les protéines parasitaires MIC5, ROP1 et ROP2 présentent deux bandes protéiques qui pourraient correspondre à la protéine native (Figures 29A, 29B et 29C flèche noire, colonnes 1 et 2) puis à la protéine maturée par clivage protéolytique (figures 29A, 29B et 29C flèche rouge,

colonnes 1 et 2) ou pourraient correspondre à deux versions de la protéine ayant subies ou non une modification post-traductionnelle dont la nature reste à déterminer.

Nous avons alors observé que les protéines rSORT₃₇₋₇₈₉, rΔ1SORT₃₇₋₇₈₉, rΔ2SORT₄₄₆₋₇₈₉ sont capables de précipiter la bande supérieure qui pourrait correspondre à la protéine ROP1 native (Figure 29B). Dans le cas de ROP2, on peut voir que les deux formes de la protéine semblent s'associer avec TgSORTLR (Figure 29C). Les résultats concernant les protéines ROP1 et ROP2 suggèrent également qu'il existerait des affinités différentes entre les diverses protéines recombinantes et les protéines de rhoptries. Ainsi, on peut remarquer que la quantité de protéines ROP1 précipitées est plus importante au fur et à mesure que le domaine N-terminal de TgSORTLR est tronqué. En d'autres termes, la protéine recombinante rSORT₃₇₋₇₈₉ précipite moins de protéines ROP1 que la protéine tronquée rΔ2SORT₄₄₆₋₇₈₉, ce qui indique que la conformation de TgSORTLR est directement liée à la capacité du récepteur à interagir avec ses ligands.

De manière très surprenante, les protéines MIC5 précipitées par les différentes protéines recombinantes de TgSORTLR montrent un décalage important de 10 à 15 kDa dans les résultats de l'immuno-empreinte présentée dans la figure 29A par rapport à la taille escomptée. TgSORTLR lie donc une protéine MIC5 dont la taille ne correspond ni à la forme mature ni à la forme native de la protéine. Cette observation suggère que la protéine MIC5 subirait des modifications post-traductionnelles et que ces modifications pourraient être nécessaires à l'interaction avec le récepteur TgSORTLR. Nos résultats sont en adéquation avec divers travaux qui concernent l'étude de la maturation de protéines de rhoptries et de micronèmes et qui démontrent que la maturation protéolytique a lieu au sein du système endolysosomal et/ou dans les organites immatures. Or si TgSORTLR est absente, elle ne peut plus transporter les protéines de rhoptries et de micronèmes et les orienter au sein de ces structures subcellulaires où résident les enzymes responsables de la maturation (Gaji et al., 2011 ; Parussini et al., Hajagos et al., 2012 ; Dou et Carruthers, 2011). Ces résultats suggèrent également que la conformation du domaine N-terminal de TgSORTLR serait primordiale pour l'interaction avec ses ligands ou que la modulation de cette conformation pourrait être un mécanisme permettant de trier les protéines et de réguler les affinités entre récepteur et ligand. La conformation de la protéine de rhoptries ou de micronèmes, la présence du prodomaine

dans ces protéines ou encore des modifications post-traductionnelles sont autant de facteurs qui pourraient influencer ou moduler l'interaction entre TgSORTLR et ses partenaires.

IV. L'extrémité N-terminale de TgSORTLR est requise pour la localisation et l'activité fonctionnelle du récepteur.

Afin d'approfondir les fonctions du domaine N-terminal de TgSORTLR, nous avons utilisé le parasite mutant iKO-SORT sensible à l'ATc (anhydrotetracycline) qui a servi aux travaux décrit ci-dessus et récemment publiés (Sloves et al., 2012) comme une nouvelle souche de *T. gondii* qui devient un parasite récepteur de divers transgènes.

Nous avons choisi d'intégrer les différents transgènes dans le locus UPRT car le gène UPRT code une enzyme non-essentielle impliquée dans la voie de récupération de nucléotides à partir de la cellule hôte mais le parasite est capable de synthétiser *de novo* ses propres métabolites (Donald et Roos, 1995). Le plasmide utilisé permet de cibler le gène UPRT et l'interruption génique du gène UPRT va également conférer la résistance au FUDR (5'-fluo-2'-deoxyuridine) (Donald et Roos, 1995), ce qui permet de sélectionner les parasites exprimant de manière stable les protéines transgéniques. Pour que l'expression des protéines transgéniques de TgSORTLR dans les parasites soit le plus proche de l'expression de la protéine TgSORTLR endogène sauvage, nous avons inséré dans le plasmide les 1700 pb correspondant au promoteur putatif de TgSORTLR. Trois vecteurs plasmidiques ont été construits afin d'intégrer une copie entière ou tronquée de TgSORTLR dans cette souche iKO-SORT. Dans un premier temps, nous avons réalisé un plasmide portant l'entièreté des 962 acides aminés de TgSORTLR (SORT-FL) puis des versions tronquées de TgSORTLR Δ 1SORT202-962, allant de l'acide aminé 202 à 962 et Δ 2SORT446-962, de l'acide aminé 446 à 962. Le domaine N-terminal de TgSORTLR comporte 4 domaines successifs de 789 acides aminés au total et qui se termine au début du domaine transmembranaire (allant de l'acide aminé 790 à 808) : un peptide signal, un pro-domaine putatif, dix sous-domaines nommés « ten bladed propeller » numérotés de A à J et deux sous-domaines 10CC (a et b) (schéma Figure 30).

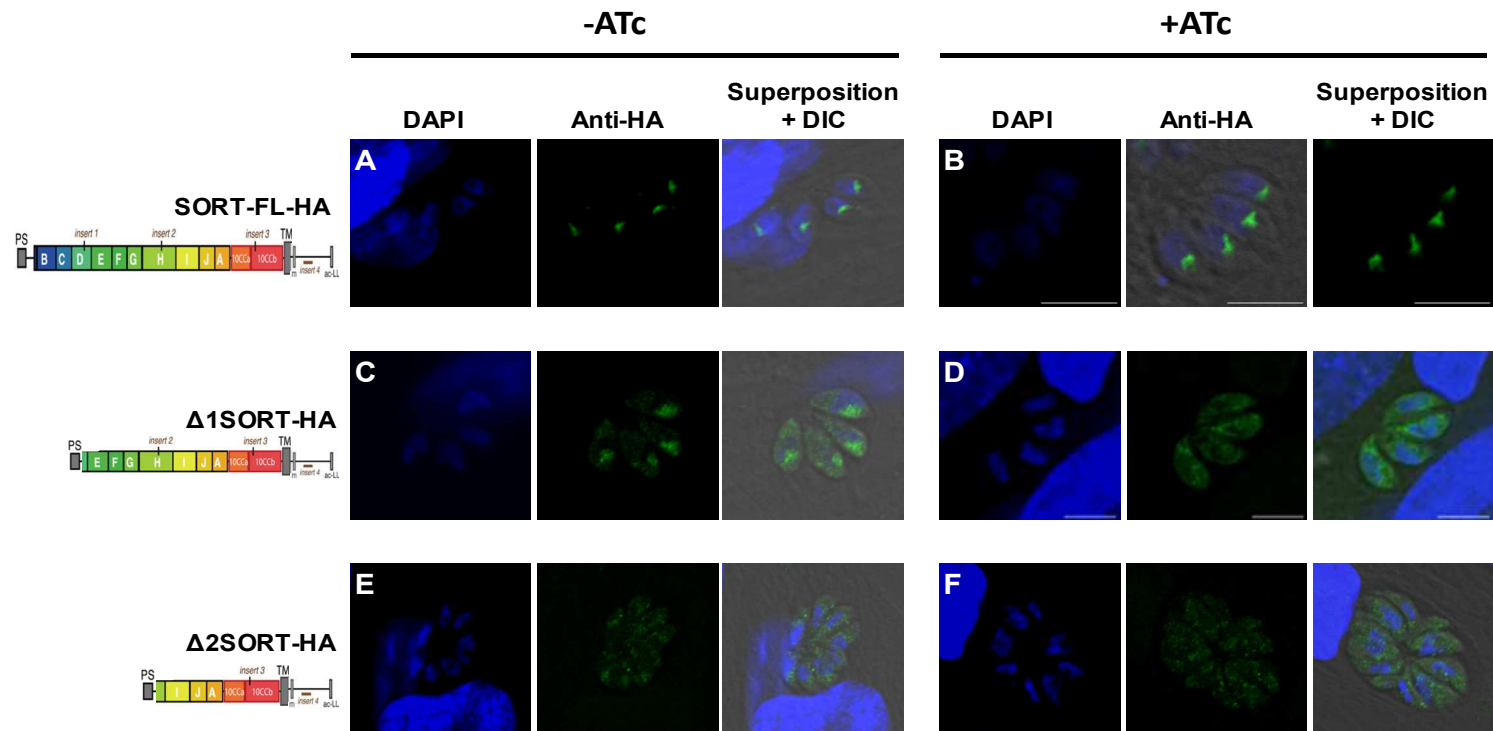


Figure 30. Parasites stables exprimant les protéines transgéniques TgSORTLR entière ou mutées en absence et en présence d'ATc. A-B. Les vacuoles parasitophores au sein des cellules HFF contiennent 4 parasites non traités (A) ou traités (B) par l'ATc qui expriment la protéine transgénique SORT-FL dans les deux cas localisée au niveau de l'appareil de Golgi et des compartiments post-golgiens. **C-D.** Les quatre parasites filles présents dans des vacuoles indépendantes non traités (C) ou traités (D) par l'ATc expriment la protéine mutée $\Delta 1$ SORT202-962-HA dépourvue du prodomaine putatif et des bêta-propeller B à D. **E-F.** localisation subcellulaire de la protéine transgénique $\Delta 2$ SORT446-962-HA dépourvue du prodomaine putatif et des domaines beta-propeller B à H exprimée dans 8 parasites intracellulaires en absence (E) ou en présence d'ATc (F). Les images de microscopie confocale montrent le marquage anti-HA (anticorps monoclonal de rat 3F10, Roche) et le noyau marqué au DAPI. Les barres d'échelles sont de 5 μ m

Le transgène $\Delta 1$ SORT202-962 code pour une protéine TgSORTLR transgénique tronquée dépourvue du prodomaine putatif et des « beta-propeller » B à D. En plus de ces délétions, la protéine transgénique $\Delta 2$ SORT446-962 est également dépourvue des domaines beta propeller E à H. Afin de pouvoir observer les fonctions des domaines composant la partie N-terminale de TgSORTLR, nous avons introduit par PCR et clonage dans chaque vecteur d'expression les séquences nucléotidiques codant le signal peptidique permettant l'entrée de la protéine transgénique dans le réticulum endoplasmique et de poursuivre le trafic vers les voies de sécrétion ainsi que le domaine transmembranaire et le domaine C-terminal de TgSORTLR qui permettent respectivement l'ancrage de la protéine transgénique dans les membranes des vésicules et l'interaction avec les partenaires cytosoliques. Les séquences transgéniques contenues dans les vecteurs d'expression sont introduit en fusion avec la séquence codant pour une étiquette HA qui permet notamment de visualiser les protéines transgéniques synthétisées.

Les parasites stables obtenus après sélection FUDR possèdent donc simultanément une copie endogène de TgSORTLR sous contrôle d'un promoteur inductible qui peut être régulé négativement par l'ajout d'ATc et un nouveau transgène codant pour la protéine transgénique exprimée constitutivement sous le contrôle du promoteur propre de TgSORTLR. Lors du traitement par l'ATc, il y a ainsi l'extinction de la copie inductible de TgSORTLR et nous sommes capables d'observer la localisation et l'activité fonctionnelle de la protéine transgénique.

Comme attendu, les parasites iKO-SORT complémentés par la sortiline transgénique entière étiquetée HA (SORT-FL), que ce soit en présence ou en absence d'ATc, montrent que la protéine est bien localisée au niveau de l'appareil de Golgi en présence ou en absence de la protéine TgSORTLR endogène (Figures 30A et 30B).

Cette observation confirme le fait que l'expression d'une copie surnuméraire avec un promoteur homologue (Figures 30A et 30B) ou hétérologue (Figure 1D page 517 et 2D page 518 de l'article) dans un locus différent n'entraîne aucune conséquence négative sur la localisation golgienne et post-golgienne de la sortiline transgénique et probablement aussi sur ses fonctions biologiques. Nous observons un signal fluorescent très net avec un contour bien défini comme pour TgSORTLR sauvage dans le parasite sauvage. En revanche, l'expression de la protéine mutante $\Delta 1$ SORT202-962 dans le mutant iKO-SORT révèle un signal bien plus diffus de la protéine transgénique tronquée (Figure 30C).

En effet, on observe dans les quatre parasites intracellulaires, un signal fluorescent vert qui occupe une surface plus grande dans le cytoplasme vers l'extrémité apicale du parasite avec une concentration de la protéine tronquée $\Delta 1$ SORT202-962-HA dans une zone antérieure au noyau marqué en bleu par du DAPI. En présence d'ATc, lorsque la protéine TgSORTLR endogène est absente, la protéine $\Delta 1$ SORT202-962-HA est détectée dans tout le cytoplasme avec une partie du signal bloqué dans une structure autour du noyau qui pourrait être le réticulum endoplasmique (Figure 30D). Les parasites présents à l'intérieur des cellules HFF expriment la protéine mutée $\Delta 2$ SORT446-962-HA qui apparaît très diffuse dans le cytoplasme des parasites et présente des granulations en microscopie confocale, que ce soit en absence ou en présence d'ATc c'est-à-dire en présence ou en absence de la protéine TgSORTLR endogène (Figures 30E et 30F).

Afin de montrer que TgSORTLR entière ou mutantes exprimées par les parasites transgéniques présentent une codistribution fluorescente parfaite ou non avec TgSORTLR endogène, et ainsi déterminer la localisation subcellulaire de la protéine endogène par rapport à la protéine transgénique, nous avons utilisé l'anticorps polyclonal anti-TgSORTLR (en rouge) conjointement avec l'anticorps anti-HA (en vert) sur les parasites mutants (Figure 31).

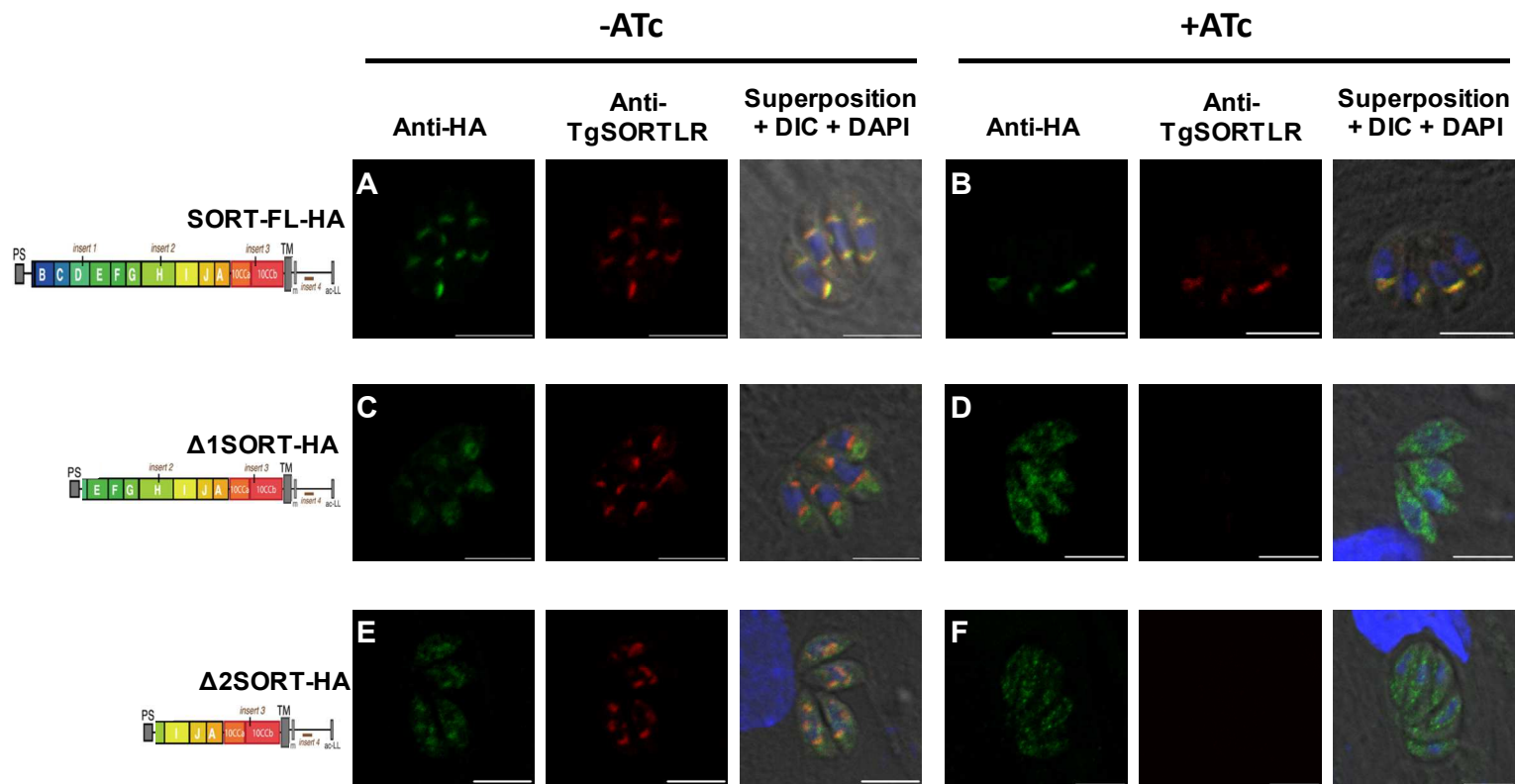


Figure 31. Le domaine N-terminal de TgSORTLR est crucial pour permettre la localisation correcte subcellulaire du récepteur. A-B. Localisation subcellulaire dans des parasites intracellulaires de TgSORTLR endogène et de la protéine transgénique SORT-FL-HA en absence (A) et en présence d'ATc (B). **C-D.** Co-distribution de TgSORTLR endogène et de la protéine transgénique $\Delta 1$ SORT202-962-HA en absence (C) et en présence d'ATc (D). **E-F.** Localisation subcellulaire de TgSORTLR endogène et de la protéine transgénique $\Delta 2$ SORT446-962-HA en absence (E) et en présence d'ATc (F). En vert, le marquage anti-HA de la protéine transgénique (anti-HA de rat 3F10, Roche) et en rouge le marquage réalisé avec l'anticorps polyclonal anti-TgSORTLR de souris. Les barres d'échelles sont de 5 μ m.

Les figures 31A et 31B montrent les images de microscopie confocale de parasites intracellulaires qui expriment la protéine transgénique SORT-FL-HA. En absence de l'ATc, le signal de la protéine transgénique SORT-FL-HA se superpose parfaitement avec le signal correspondant à la protéine TgSORTLR endogène au dessus et en dessous du noyau (Figure 31A). Après un traitement ATc, les parasites dépourvus de TgSORTLR endogène présentent un signal fluorescent pour SORT-FL-HA au dessus du noyau, au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 31B). L'anticorps anti-TgSORTLR reconnaît ici non pas la protéine endogène TgSORTLR qui est absente après le traitement ATc mais la protéine transgénique SORT-FL qui contient l'entièreté de la protéine TgSORTLR et donc les épitopes reconnus par l'anticorps polyclonal anti-TgSORTLR utilisé.

La figure 31C montre par immuno-fluorescence, que la protéine transgénique $\Delta 1$ SORT202-962-HA (en vert) n'est que très minoritairement co-distribuée avec la protéine TgSORTLR endogène (en rouge) lorsque ces deux protéines sont exprimées simultanément dans les parasites intracellulaires (Figure 31C).

La fluorescence correspondant à la protéine transgénique $\Delta 1$ SORT202-962-HA apparaît majoritairement concentrée dans une région antérieure à la protéine TgSORTLR endogène. Dans la figure 31D, on constate que l'absence de TgSORTLR endogène conduit à la diffusion de la protéine $\Delta 1$ SORT202-962-HA dans le cytoplasme des parasites mais aussi qu'une forte proportion de la protéine transgénique est également concentrée autour du noyau dans la région où se situe le réticulum endoplasmique.

Les parasites intracellulaires exprimant la protéine transgénique $\Delta 2$ SORT446-962-HA montrent un signal (en vert) diffus dans le cytoplasme des parasites (Figure 31E et 31F). En absence d'ATc, une quantité modérée mais significative de protéines transgéniques colocalise avec TgSORTLR endogène (en rouge) (Figure 31E). On remarque qu'après traitement ATc, le signal correspondant à la protéine transgénique tronquée $\Delta 2$ SORT446-962-HA est complètement diffus dans le cytoplasme.

Les parasites utilisés dans ces travaux possèdent une copie endogène du gène de TgSORTLR dont l'expression est régulée par un promoteur hétérologue inducible « Tet07Sag4 ». Nous avons pu observer que de nombreux parasites montrent un signal au dessus du noyau au niveau de l'appareil de Golgi pour TgSORTLR mais également derrière le noyau des parasites c'est-à-dire dans la région postérieure du parasite (Figure 31). Cette localisation sensiblement différente par rapport au parasite

sauvage n'a aucune incidence sur les fonctions biologiques du récepteur et peut s'expliquer soit par le type de promoteur hétérologue utilisé pour exprimer la protéine TgSORTLR soit par la force d'expression de ce promoteur. Lorsque TgSORTLR est présente, SORT-FL est retrouvée de la même manière antérieure et postérieure au noyau (Figure 31A). Cependant, après traitement ATc, la protéine SORT-FL est uniquement observée dans la région de l'appareil de Golgi (Figure 31B) c'est-à-dire au dessus du noyau comme au sein de parasite sauvages, ce qui suggère que les protéines SORT-FL et TgSORTLR pourraient s'associer en complexe. Alternativement, la surexpression de TgSORTLR pourrait également entraîner une délocalisation partielle d'une certaine quantité de la protéine TgSORTLR.

Lorsque la protéine TgSORTLR endogène est présente, Δ 1SORT202-962 est retrouvée dans une région antérieure à l'appareil de Golgi au dessus de TgSORTLR (Figure 31C). L'absence de TgSORTLR endogène conduit au blocage d'une partie substantielle de la protéine Δ 1SORT202-962 au niveau du réticulum endoplasmique (Figure 31D). La présence d'une copie intacte de TgSORTLR semble donc jouer un rôle dans le passage du réticulum permettant ensuite à la protéine Δ 1SORT202-962 d'atteindre les compartiments antérieurs à l'appareil de Golgi. Une hypothèse consisterait à une oligomérisation du récepteur très tôt dans la voie de biosynthèse, ce qui permettrait à Δ 1SORT202-962 de franchir le contrôle qualité présent dans le RE. La protéine mutante Δ 1SORT202-962 resterait alors bloquée dans les compartiments subcellulaires antérieurs à l'appareil de Golgi en raison d'une altération de la dissociation récepteur-ligand et donc de son recyclage vers l'appareil de Golgi. En l'absence des acides aminés 36 à 202, la protéine mutante se trouverait dans l'incapacité de franchir les différents contrôles qualités et seraient alors bloquée dans le réticulum et/ou dégradée dans le cytoplasme du parasite.

La région de TgSORTLR comprise entre l'acide aminé 36 et 202 contenant un prodomaine putatif et les bêta-propeller B-D semble donc participer à l'adressage de la protéine à son compartiment final.

La protéine exogène Δ 2SORT446-962 montre une localisation diffuse dans le cytoplasme avec un aspect granuleux en microscopie confocale en absence ou en présence d'ATc (Figures 31E-F et 31E-F). Malgré ce signal, une proportion de la protéine apparaît de manière significative dans des structures vésiculaires où l'on retrouve TgSORTLR localisée grâce à l'anticorps polyclonal anti-TgSORTLR (Figure 31E). Ce résultat évoque la possibilité que les sortilines endogènes et exogènes

sont capables de s'associer et en dépit de la délétion des domaines bêta propeller B-H que la sortiline exogène. Il semble donc que l'association entre $\Delta 2$ SORT446-962 et TgSORTLR pourrait permettre à la protéine transgénique $\Delta 2$ SORT446-962 de franchir le contrôle qualité présent dans le RE et d'être correctement localisée au niveau de l'appareil de Golgi et des vésicules post-golgiennes proximales. En absence du récepteur TgSORTLR endogène, la protéine $\Delta 2$ SORT446-962 serait alors dégradée et dispersée dans le cytoplasme des parasites.

Nous avons ensuite cherché à savoir si de telles versions de TgSORTLR sont capables ou non de d'assurer les fonctions de trafic intracellulaire des protéines de rhoptries et de micronèmes. Pour cela, nous avons réalisé des immunofluorescences en utilisant les protéines ROP1 et MIC5 comme marqueurs pour suivre le transport ou ciblage des protéines dans les organites apicaux (Figure 31 et 32). Chez le parasite iKO-SORT, on observe que la protéine ROP1 en rouge est bien présente au niveau de l'apex des parasites intracellulaires (Figure 32A). Après le traitement ATc et la déplétion en protéine TgSORTLR endogène, la protéine ROP1 est complètement délocalisée dans le cytoplasme des parasites (Figure 32C).

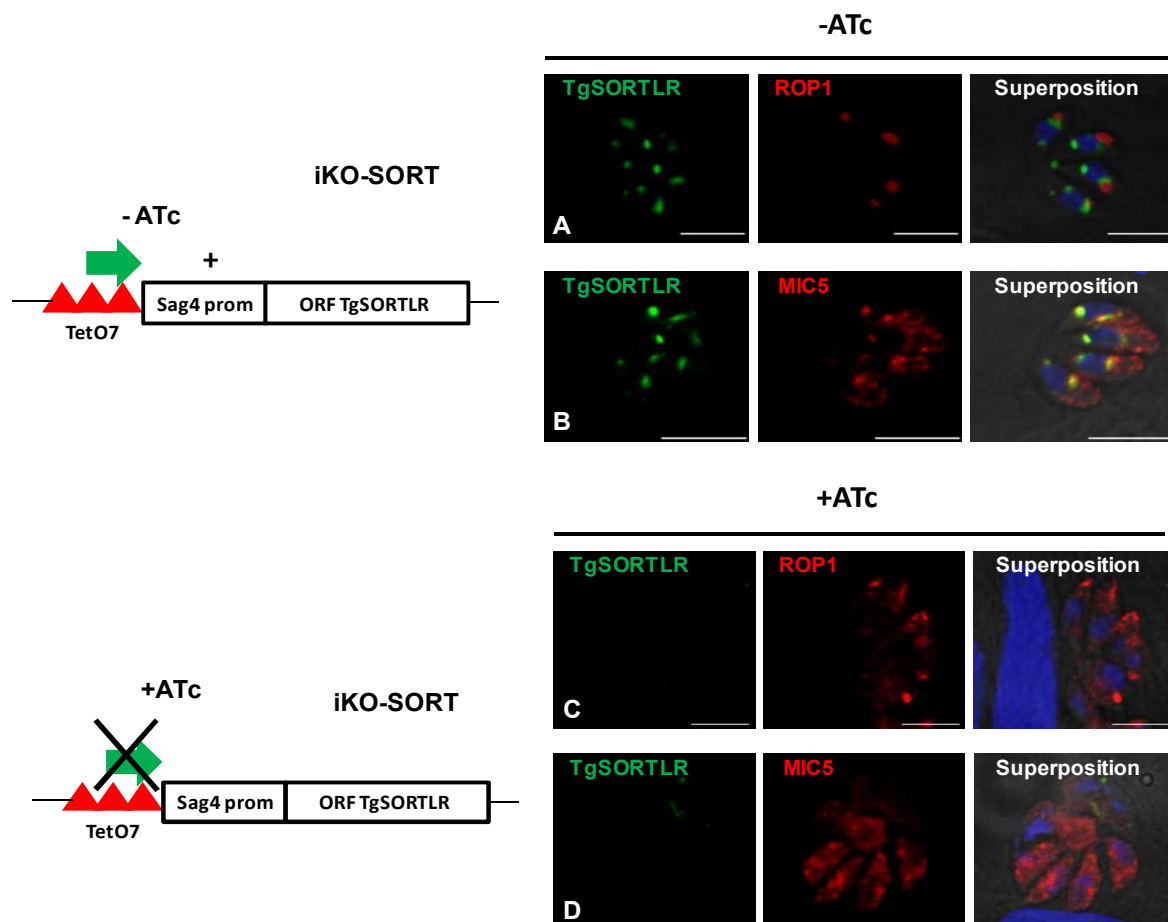


Figure 32. La déplétion conditionnelle de TgSORTLR entraine la délocalisation des protéines de rhoptries et de micronèmes. A-B. Distributions des protéines TgSORTLR et TgROP1 (A) ou TgMIC5 (B) en absence d'ATc. **C-D.** Localisation subcellulaire des protéines TgROP1 (C) ou TgMIC5 (D) en présence d'ATc. Les anticorps anti-ROP1 et anti-MIC5 utilisés sont des anticorps polyclonaux de lapin. Les barres d'échelles sont de 5µm.

La déplétion de TgSORTLR conduit également la protéine MIC5 normalement contenue dans les micronèmes (Figure 32B), à une délocalisation complète dans le cytoplasme des tachyzoïtes intracellulaires (Figure 32D). En absence de TgSORTLR endogène, les protéines de rhoptries et de micronèmes ne sont pas prises en charge pour leur transport et se retrouve alors délocalisées dans le cytoplasme des parasites mais aussi dans la vacuole parasitophore et jusque dans la cellule hôte.

Nous avons constaté que l'intégration de SORT-FL (la sortiline entière) est capable de rétablir la localisation apical typique des protéines ROP1 et MIC5 indiquant un trafic ou transport correct de ces protéines vers les rhoptries et micronèmes des parasites mutants iKO-SORT complémentés par SORT-FL-HA en présence de l'ATc, c'est-à-dire dans les conditions de déplétions complètes de la sortiline inductible endogène (Figure 31B et 31H). En effet, en dépit du traitement ATc, on retrouve le signal typique des rhoptries à l'apex du parasite et dans la vacuole pour la protéine ROP1 (Figure 33B) et un signal dessinant le pôle antérieur du parasite pour MIC5 (Figure 33H) à l'image des signaux visualisés dans les parasites complémentés avec SORT-FL-HA non traités par l'ATc (Figures 33A et Figure 33G) et des parasites iKO-SORT non traités avec l'ATc (Figures 32A et 32B).

Les parasites transgéniques exprimant la protéine mutée Δ 1SORT202-962 non traités par l'ATc montrent des signaux typiques pour les protéines ROP1 (438C) et MIC5 (Figure 33I).

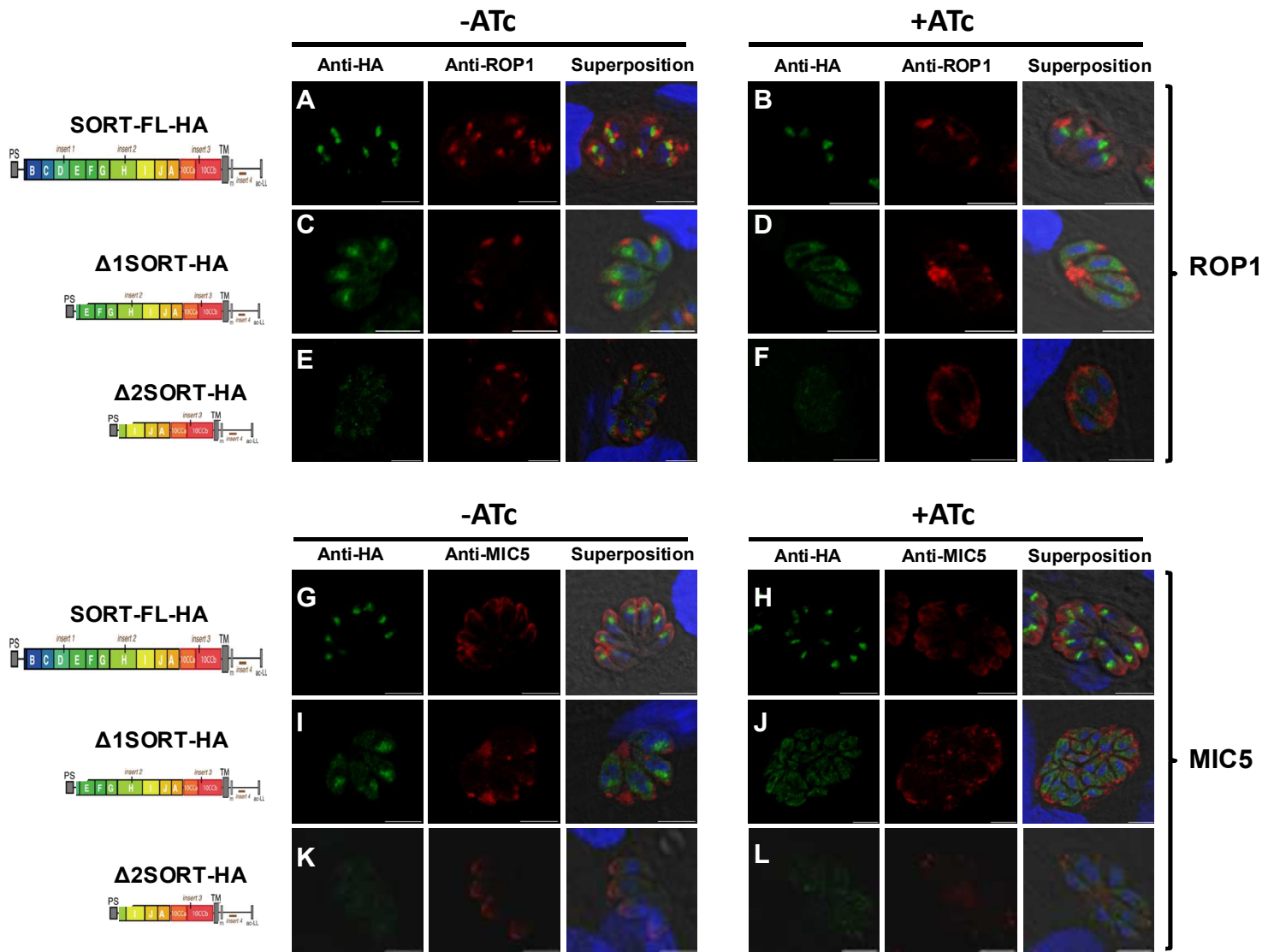


Figure 33. La région entre les acides aminés 36 et 202 du domaine N-terminal de TgSORTLR est cruciale au récepteur pour assurer sa fonction dans le trafic intracellulaire des protéines de rhoptries et de micronèmes. A et D. Localisation des protéines ROP1 et MIC5 dans la souche complémentée SORT-FL-HA. B et E. Localisation des protéines ROP1 et MIC5 dans la souche complémentée $\Delta 1$ SORT202-962-HA. C et F. Localisation des protéines ROP1 et MIC5 dans la souche complémentée $\Delta 2$ SORT446-962-HA. Les anticorps anti-ROP1 et MIC5 utilisés sont des anticorps polyclonaux de lapin. Les barres d'échelles sont de 5 μ m.

Au sein de ces parasites transgéniques, la déplétion de TgSORTLR par le traitement ATc entraîne la délocalisation complète de la protéine ROP1 (Figure 33D) et également de MIC5 (Figure 33J). Dans les figures 33F et 33L correspondant aux parasites transgéniques exprimant la protéine $\Delta 2$ SORT446-962-HA, les protéines ROP1 et MIC5 (en rouge) sont délocalisées dans le cytoplasme des parasites et dans la vacuole parasitophore après le traitement ATc.

Nous avons également observé que les protéines MIC5 et ROP1 synthétisées par les parasites transgéniques exprimant les protéines mutées $\Delta 1$ SORT202-962 et $\Delta 2$ SORT446-962 sont délocalisées dans l'entièreté de la vacuole parasitophore et jusque dans cellule hôte et autour du noyau de la cellule HFF après le traitement ATc (Figure 34).

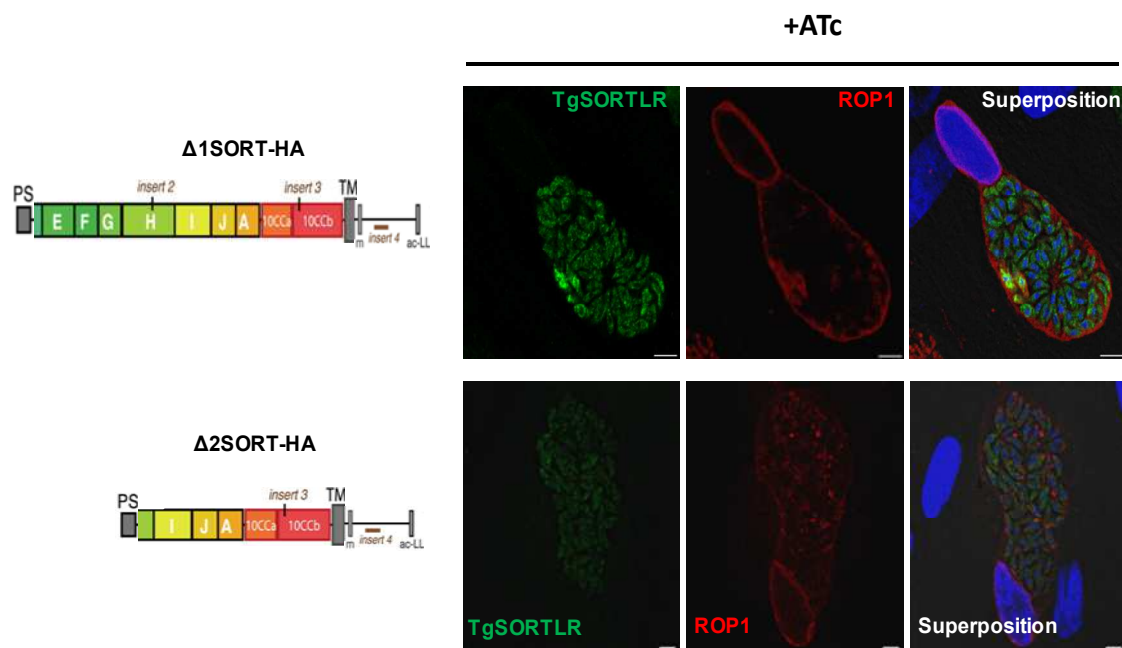


Figure 34. Délocalisation de la protéine ROP1 dans la cellule hôte en absence d'une protéine TgSORTLR intacte. Les protéines transgéniques $\Delta 1$ SORT202-962-HA et $\Delta 2$ SORT446-962-HA

sont des versions tronquées de TgSORTLR allant respectivement de l'acide aminé 202 à 962 et donc dépourvue du prodomaine putatif et des bêta-propeller B à D (pour $\Delta 1$ SORT202-962-HA) et allant de l'acide aminé 446 à 962 et dépourvue du prodomaine putatif et des domaines beta-propeller B à H (pour $\Delta 2$ SORT446-962-HA). Barres d'échelles, 5 μ m.

En d'autres termes, chez les parasites iKO-SORT+ $\Delta 1$ SORT202-962 et iKO-SORT+ $\Delta 2$ SORT446-962 en présence de TgSORTLR, les signaux de ROP1 et MIC5 sont normaux, mais la suppression de TgSORTLR endogène entraîne une délocalisation de ROP1 et MIC5 dans le cytoplasme des parasites, dans la vacuole parasitophore et dans la cellule hôte (Figure 34). Les protéines mutantes $\Delta 1$ SORT202-962 et $\Delta 2$ SORT446-962 sont donc incapables d'assurer l'activité fonctionnelle de TgSORTLR entière et de permettre le transport correct de ces protéines vers les micronèmes et les rhoptries.

Afin d'étudier les conséquences des différentes complémentations réalisées dans les parasites transgéniques sur la biogenèse des organites et de comprendre les fonctions biologiques des protéines mutées, des expériences de microscopie électronique de morphologie ultrastructurale ont été réalisées. Les différentes souches mutantes iKO-SORT-SORT-FL, iKO-SORT- $\Delta 1$ SORT202-962 et iKO-SORT- $\Delta 2$ SORT446-962 non traitées avec l'ATc ont été analysées en microscopie électronique et la présence des rhoptries, des micronèmes, des granules denses ainsi qu'un appareil de Golgi similaires au parasite sauvage a été confirmée. Après 40 heures de traitement ATc, les parasites iKO-SORT présentent des rhoptries et des micronèmes très fortement altérés voire absents. En revanche, lorsque la protéine TgSORTLR endogène est déplétée en présence d'ATc, la complémentation par la protéine entière SORT-FL-HA assure, comme nous pouvions attendre, la biogenèse des rhoptries et micronèmes à l'apex du parasite (Figure 35A).

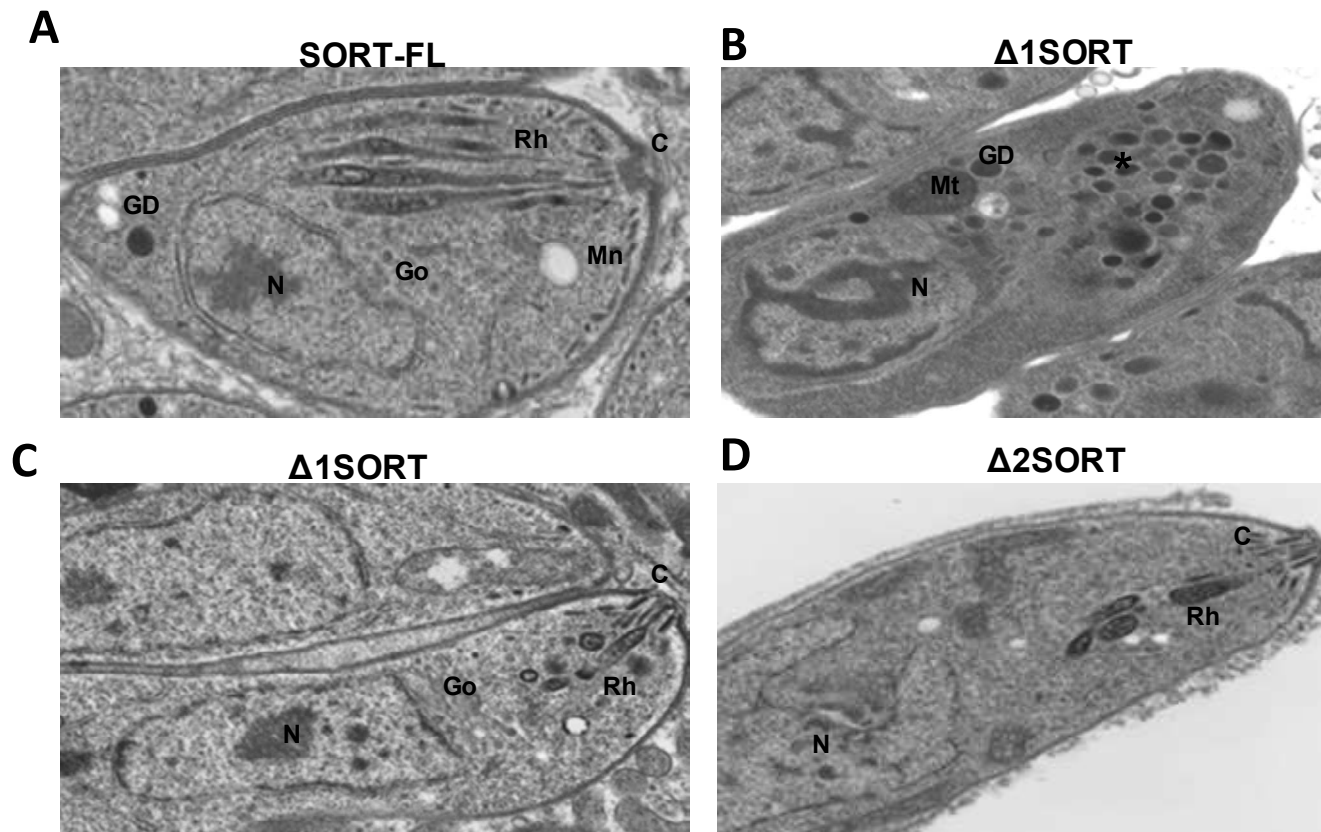


Figure 35. La région de TgSORTLR comprise entre l'acide aminé 36 et 202 est indispensable à la biogenèse des organites de sécrétion apicaux. Images ultrastructurales de microscopie électronique à transmission montrant un défaut dans la biogenèse des organites apicaux en absence des acides aminés 36 à 202 de TgSORTLR. Parasites transgéniques dépourvus de TgSORTLR exprimant la protéine SORT-FL-HA (A). Δ 1SORT202-962 (B-C) Δ 2SORT446-962 (D). C : conoïde ; GD : granule dense ; Go : appareil de Golgi ; Mn : micronème ; Mt : mitochondrie ; N : noyau ; Rh : rhoptrie. Le symbole * indique la présence de multiples structures vésiculaires de nature inconnue.

Les parasites iKO-SORT- Δ 1SORT202-962 dépourvus de la protéine TgSORTLR endogène montrent un nombre réduit de micronèmes et les rhoptries sont quasiment absentes (Figures 35B et 35C). De plus, chez ces parasites mutants, une accumulation de structures vésiculaires jusqu'alors inconnus dans le parasite et situées entre l'appareil de Golgi et l'apex du parasite est observée (Figure 35C). Les parasites iKO-SORT- Δ 2SORT446-962, après traitement ATc, sont dépourvus de micronèmes et présentent très peu de rhoptries qui sont très courtes et atrophiées (Figure 35D).

Dans le but d'examiner le rôle des différentes protéines transgéniques et du domaine N-terminal de TgSORTLR dans la virulence du parasite, nous avons procédé à des expériences phénotypiques *in vitro*. Les expériences de plage de lyse consistent à la succession de cycles d'invasion et d'échappement des cellules hôtes par les parasites. Un parasite va ainsi pouvoir en l'espace de sept jours, pénétrer une cellule hôte, se répliquer, sortir de la cellule HFF puis de nouveau répéter ce cycle, ce qui va conduire à créer un « trou » dans le tapis cellulaire visualisable par une coloration au cristal violet. Cette expérience nous permet d'aborder de manière globale le pouvoir infectieux *in vitro* des parasites transgéniques. La souche parasitaire contenant la protéine endogène TgSORTLR sous le contrôle du promoteur inductible sensible à l'ATc est capable de former des plages de lyses dans le tapis cellulaire en absence d'ATc (Figure 36A, panel de gauche).

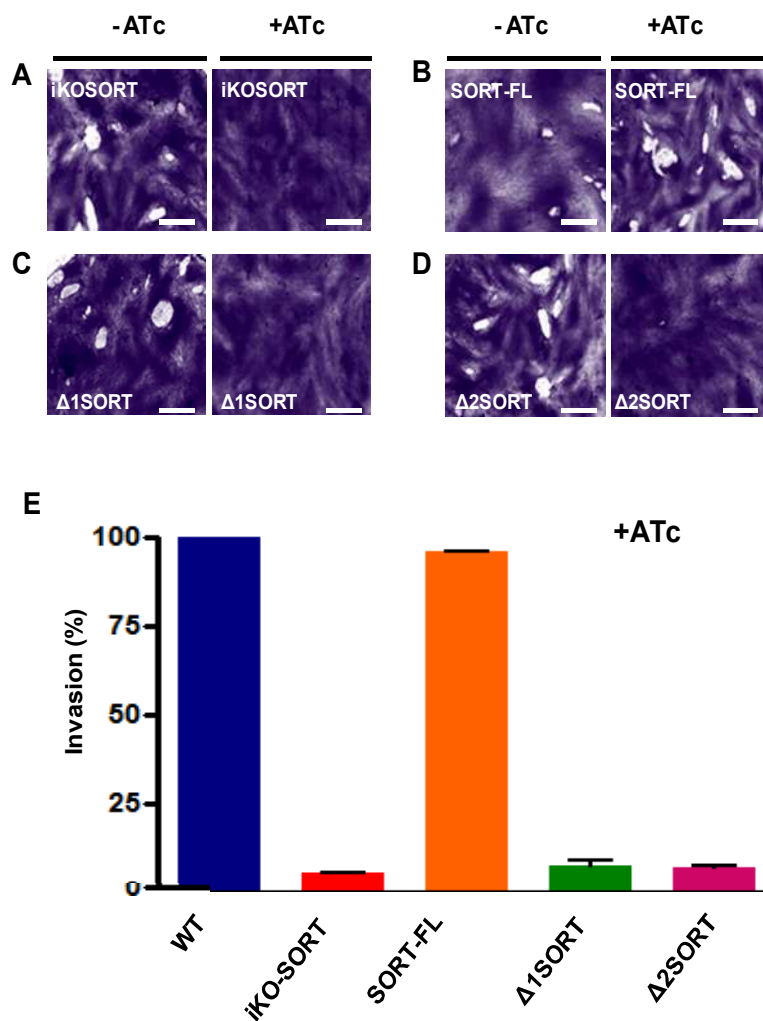


Figure 36. La région de TgSORTLR comprise entre l'acide aminé 36 et 202 est essentielle pour l'invasion des cellules hôtes et la virulence *in vitro* des parasites. **A-D.** Les cycles de lyses et d'invasions formant des plages de lyses sont fortement altérés en absence de l'entièreté de TgSORTLR. Barres d'échelles 200µm. **E.** L'invasion des cellules hôtes après 48 heures de traitement ATc est sévèrement diminuée en absence des acides aminés 36 à 202 de TgSORTLR.

Le traitement ATc conduit à une incapacité à former les plages de lyses chez ces parasites mutants, ce qui démontre le caractère essentiel de TgSORTLR (Figure 36A, panel de droite). L'expression de la protéine transgénique SORT-FL-HA de manière constitutive permet au parasite transgénique d'effectuer des cycles d'invasion-échappement créant ainsi des trous dans le tapis cellulaire en présence d'ATc (Figure 36B). Les parasites exprimant la protéine tronquée Δ1SORT202-962 sont incapables de former des plages de lyse *in vitro* en absence de TgSORTLR endogène (Figure 36C) comme les parasites exprimant la protéine Δ2SORT446-962(Figure 36D).

Nous avons également étudié l'invasion des cellules hôtes par les différents parasites transgéniques. Pour cela, les parasites sont sortis de cellules HFF mécaniquement à l'aide d'une seringue après 48h de traitement ATc puis sont utilisés pour infecter un nouveau tapis cellulaire. Après 24 heures d'infection, les parasites iKO-SORT montrent une diminution critique de leur capacité d'invasion par rapport à une souche parasitaire sauvage (Figure 36E). Les parasites possédant le transgène SORT-FL sont capables d'envahir les cellules HFF d'une manière similaire aux parasites sauvages tandis que les parasites exprimant des protéines transgéniques tronquées sont fortement altérés dans leur capacité invasive quand ils expriment uniquement la protéine $\Delta 1$ SORT202-962 ou $\Delta 2$ SORT446-962 (Figure 36E).

Les expériences phénotypiques menées montrent que seule l'intégration d'une version entière de TgSORTLR (SORT-FL) est capable de conférer aux parasites mutants dépourvus de TgSORTLR endogène, le pouvoir de former des plages de lyses *in vitro* (Figure 36 A-D) et de rétablir un taux d'invasion des cellules hôtes comparable aux parasites sauvages (Figure 36E).

Ces résultats démontrent que les deux protéines mutantes $\Delta 1$ SORT202-962 et $\Delta 2$ SORT446-962 sont incapables de compléter et de restaurer chez le parasite mutant iKO-SORT traité avec l'ATc, les fonctions impliquées dans le transport protéique et la biogenèse des organites de sécrétion. Ces résultats attestent que la région N-terminale allant de l'acide aminé 36 à l'acide aminé 202 est également nécessaire à la localisation et à la fonction de TgSORTLR afin d'assurer le trafic subcellulaire des protéines de rhoptries et de micronèmes et de former des organites sécrétoires fonctionnels déterminants pour l'invasion et la virulence de *T. gondii*.

V. TgSORTLR co-localise et interagit spécifiquement avec des partenaires de la machinerie de transport vésiculaire

1. TgSORTLR est localisée dans les compartiments où se situent des protéines cargo qui régule le transport antérograde et rétrograde

Nous avons purifié par chromatographie d'affinité puis identifié par spectrométrie de masse des partenaires potentiels du domaine C-terminal de TgSORTLR qui interviendraient dans son transport et

donc dans le trafic des protéines de rhoptries et micronèmes (Article tableau S2). Nous avons ainsi identifié :

- Une protéine homologue parasite de la chaîne lourde de la clathrine qui joue un rôle crucial pour la formation des vésicules lors de l'endocytose mais aussi au niveau du trans-golgi pour le trafic intracellulaire (McPherson, 2010)
- Les protéines homologues parasites (ou sous-unités) β -adaptine, γ -adaptine, μ -adaptine et σ -adaptine du complexe AP-1 (Adaptor Protein 1) qui interviennent dans le transport des vésicules du TGN aux endosomes et qui est connu chez les mammifères ou la levure pour son rôle dans le transport de la sortiline (Popoff et al., 2011 ; Nykjaer et al., 2012).
- Les protéines homologues de Sec23 et Sec24, deux protéines du complexe COPII qui chez les mammifères permettent le trafic des vésicules du RE à l'appareil de Golgi (Lord et al., 2011 ; Jensen et Schekman, 2011)
- Les protéines homologues Vps26 et Vps35 qui font partie du complexe retromer impliqué dans le transport rétrograde des protéines vers l'appareil de Golgi (McGough et Cullen, 2011)
- Une protéine homologue à domaine Vps9 qui intervient chez la levure dans l'activation de la protéine Vps21 conduisant à la fusion membranaire (Carney et al., 2006)
- Trois protéines hypothétiques parasites sans homologies avec des protéines référencées (TGGT1_053770 ; TGME49_094220 ; TGME49_028630)

Le nombre de protéines intervenant dans le trafic de TgSORTLR et des protéines de rhoptries et de micronèmes devant être beaucoup important nous avons procédé à des analyses supplémentaires de bioinformatiques comparatives des protéines cargo du système endolysosomal humain de la levure et de plusieurs Apicomplexa dont le séquençage et l'annotation des génomes ont déjà été réalisés. Ces résultats d'analyses bioinformatiques sont présentés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Protéine	<i>Homo sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>T. gondii</i>	<i>Th. parva</i>	<i>C. parvum</i>
Clathrine						
Heavy Chain	NP_004850/NP_009029	NP_011309	PF3D7_1219100	TGME49_090950	TP03_0480	Cgd8_1270
Light Chain	NP_001824	NP_011683	-	-	-	-
Complexes AP (Adaptor Protein)						
AP1						
γ	NP_001025178	NP_015354	PF3D7_1455500	TGME49_113670	TP04_0213	Cgd5_3850
β1	NP_0011118	NP_012787	PF3D7_0528100	TGME49_040870	TP02_0304	Cgd4_4300
μ1	NP_115882	NP_015064/NP_011844	PF3D7_1311400	TGME49_089770	TP01_0712	Cgd7_2680
σ1	NP_001274	NP_031483.1	PF3D7_1118100	TGME49_070370	TP02_0416	Cgd8_4040
AP2						
α	NP_036437/NP_055018	NP_013271	PF3D7_0617100	TGME49_021940	TP03_0146	Cgd6_2070
β2	NP_001025177	NP_012538	PFE1400c	TGME49_040870	TP02_0304	Cgd4_4300
μ2	NP_004059	NP_014579	PF3D7_1218300	TGME49_030920	TP_01_0660	-
σ2	NP_004060	NP_012592	PF3D7_0217300	TGME49_113450	TP01_0754	Cgd3_3810
AP3						
δ	NP_003929	NP_015129	PF3D7_0808100	TGME49_109370	-	-
β3	NP_00003655/NP_004635	NP_011777	PF3D7_0613500	TGME49_089080	-	-
μ3	NP_036227	NP_009847	PF3D7_1218300	TGME49_069480	-	-
σ3	NP_005820	NP_012510	PFL2425w	TGME49_015130	-	-
AP4						
ε	NP_031373	-	PF3D7_0904100	TGME49_044290	TP04_0106	Cgd4_2210
β4	NP_006585	-	PF3D7_0730200	TGME49_066280	TP01_0832	Cgd6_4930
μ4	NP_004713	-	PF3D7_1119500	TGME49_007390	TP02_0642	Cgd8_950
σ4	NP_009008	-	PF3D7_0423100	TGME49_114420	TP01_0763	Cgd8_4900
GGAs (Golgi-localized Gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein)						
GGA-1	NP_037497	NP_010645	-	-	-	-
GGA-2	NP_055859.1	NP_011976	-	-	-	-
GGA-3	NP_619525	-	-	-	-	-
Complexe COPI (Coat Protein)						
Arf1	NP_001649	NP_010089	PF3D7_1020900	TGME49_012950	TP02_0245	Cgd3_860
α	NP_004362	NP_010136	PF3D7_0606700	TGME49_040650	TP02_0162	Cgd8_860
β	NP_057535	NP_011378	PF3D7_0905900	TGME49_066990	TP01_0687	Cgd7_5010
γ	NP_057212	NP_014112	PF3D7_1145100	TGME49_073370	TP04_0297	Cgd7_1910
δ	NP_001646	NP_116709	PF3D7_1134800	TGME49_021520	TP04_0332	Cgd7_2940
ε	NP_009194	NP_012189	PF3D7_0808400	TGME49_044390	TP01_0656	Cgd4_4100
ζ	NP_057141	NP_015315	PF3D7_0415400	TGME49_080550	TP03_0756	Cgd7_4180
ARFGAP	NP_060679	NP_011048	PF3D7_0804900	TGME49_073070	TP01_1104	Cgd5_140
ARFGEF	NP_001186308	NP_015420	PF3D7_0508500	TGME49_028650	TP03_0534	cgd3_310
Complexe COPII						
Sar1	NP_064535/NP_057187	NP_015106	PF3D7_0416800	TGME49_015060	TP04_0542	Cgd7_2330
Sec13	NP_899195	NP_013309	PF3D7_1230700	TGME49_001700	TP03_0044	Cgd8_4110
Sec31	NP_055748/NP_056305	NP_010086	PF3D7_0214100	TGME49_111400	TP01_0918	cgd4_260
Sec23	NP_006355/NP_116781	NP_015507	PF3D7_0822600	TGME49_091680	TP02_0701	Cgd3_1820
Sec24	NP_068817/NP_006314/NP_004913/NP_055637	NP_012157	PF3D7_0405100	TGME49_077000	TP01_0099	Cgd8_1250
sec12 (GEF)	NP_037520	NP_014423	PF3D7_1116400	TGME49_094250	TP04_0875	Cgd4_1120

Trimère Vps (Vacuolar Protein Sorting) du complexe retromer pour la sélection du cargo

Vps35	NP_060676	NP_012381	PF11_0112	TGME49_042660	TP01_0794	Cgd4_2390
Vps29	NP_057310	NP_011876	PF14_0064	TGME49_052490	TP04_0799	Cgd7_2060
Vps26	NP_004887/NP_443107	NP_012482	PFL24.15w	TGME49_063500	TP04_0783	Cgd2_1570

Complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)

ESCRT-0

Hse1/STAM	NP_003464/NP_005834	NP_011861	-	-	-	-
Vps27/Hrs	NP_004703	NP_014403	-	-	-	-

ESCRT-I

Mvb12	NP_258257.1/NP_612410.1	NP_011722	-	-	-	-
Vps23	NP_006283	NP_009919	-	-	TP03_0624	-
Vps28	NP_057292	NP_015260	-	-	TP01_0691	-
Vps37A	NP_689628	NP_013220	-	-	-	-
Vps37B	NP_078943					
Vps37C	NP_060436					
Vps37D	NP_001071089					

ESCRT-II

Vps22	NP_009172	NP_015323	-	-	TP04_0045	-
Vps25	NP_115729	NP_012636	-	-	TP03_0505	-
Vps36	NP_057159	NP_013521	-	-	TP01_0962	-

ESCRT-III

Vps2	NP_055268/NP_054762	NP_012924	PF3D7_0816200	-	TP02_0665	cgd7_4570
Vps24	NP_057163	NP_012883	-	-	-	-
Vps20	NP_078867	NP_013794	-	-	TP03_0870	-
Vps32A	NP_054888	NP_013125	PF3D7_12343500	TGME49_048310	TP04_0143	cgd5_3790
Vps32B	NP_789782					
Vps32C	NP_689497					
CHMP7	NP_689485	NP_012486	-	-	-	cgd8_2920

ESCRT-IV

Vta1	NP_057569	NP_013282	PF3D7_0103000	-	-	-
Vps4	NP_037377/NP_004860	NP_015499	PF3D7_1457500	TGME49_115680	TP03_0351	cgd1_3390
Vps31	NP_037506	NP_015241	-	-	-	-
Vps46	NP_002759/NP_065145	NP_012961	PF3D7_0906100	TGME49_115350	TP01_0395	cgd1_1320
Vps60	NP_057494	NP_010774	PF3D7_1441800	-	-	-

Protéines Rab

Rab1A/SEC4	NP_004152	NP_116650	PF3D7_0513800	TGME49_014770	TP04_0644	cgd6_3830
Rab1B/YPT1	NP_112243	NP_116615	PF3D7_0512600	TGME49_058130	TP03_0775	Cgd6_3220
Rab2/YPT31	NP_002856	NP_010948	PF3D7_1231100	TGME49_057340	TP01_0877	Cgd1_2060
Rab5A/YPT53	NP_004153	NP_014306	PF3D7_0211200	TGME49_110460	TP04_0575	Cgd3_3150
Rab5C/YPT51	NP_004574	NP_014732	PF3D7_0106800	TGME49_067810	TP01_0639	Cgd8_1880
Rab6/YPT6	NP_942599	NP_013363	PF3D7_1144900	TGME49_110460	TP02_0799	Cgd2_1940
Rab7/YPT7	NP_004628	NP_013713	PF3D7_0903200	TGME49_048880	TP03_0666	Cgd7_1680
Rab11A/YPT32	NP_004654	NP_011305	PF3D7_1320600	TGME49_089680	TP01_1204	Cgd4_320
Rab11B/YPT11	NP_004209	NP_014095	PF3D7_1340700	TGME49_120480	TP02_0559	Cgd7_4380
Rab18/YPT10	NP_067075	NP_009823	PF3D7_0807300	TGME49_113190	-	-

Tableau 1. Etude comparative *in silico* de protéines cargo impliquées dans le transport vésiculaire et le trafic intracellulaire des protéines. Certaines informations ont été prises dans les articles publiés par Nevin et Dacks, 2009 ; Leung et al., 2008 ; Koumandou et al., 2011 et grâce aux bases de données Eupathdb.org et uniprot.org.

On remarque alors que les gènes codant les protéines de la machinerie de transport qui interviennent de manière précoce sont relativement bien conservés entre l'Homme, la levure et les parasites Apicomplexa (COPI, COPII) (Tableau 1). En revanche, les gènes qui codent les protéines qui interviennent dans les étapes les plus tardives ne sont pas toujours présents ou en tout cas identifiés. C'est le cas pour le complexe AP-3 et les complexes ESCRT chez certains Apicomplexa. Globalement, les parasites Apicomplexa posséderaient un nombre plus réduit d'acteurs ou protéines du trafic intracellulaire et sembleraient avoir évolué vers une simplification du système de transport des protéines.

Dans le but d'approfondir les connaissances sur les protéines impliquées dans le transport de TgSORTLR et surtout des protéines de rhotropies et de micronèmes, nous avons pour l'instant concentré nos efforts sur la validation des protéines cargo identifiées par co-immunoprécipitation avec TgSORTLR. Afin de démontrer si ces protéines interagissent réellement avec TgSORTLR *in situ* dans le parasite, nous avons utilisé la stratégie de « Knock-In » qui consiste à étiqueter directement le gène endogène d'intérêt avec le HA (Hémagglutinine) directement dans le locus et le chromosome parasitaire. Cette stratégie permet d'observer que les différentes protéines partenaires putatifs résident dans les mêmes compartiments subcellulaires que TgSORTLR et puis d'utiliser l'immunoprécipitation inverse pour démontrer que ces partenaires putatifs sont capables d'interagir avec TgSORTLR *in cellulo*.

L'expression au sein des parasites des différentes protéines a été analysée par une immunoprecipitation avec un anticorps anti-HA qui permet de confirmer la présence des protéines TgSec23, Tgμ1-adaptine, TgVps26, TgVps35, TgVps9 et TgHP20 étiquetées HA dans les parasites transgéniques (Figure 37).

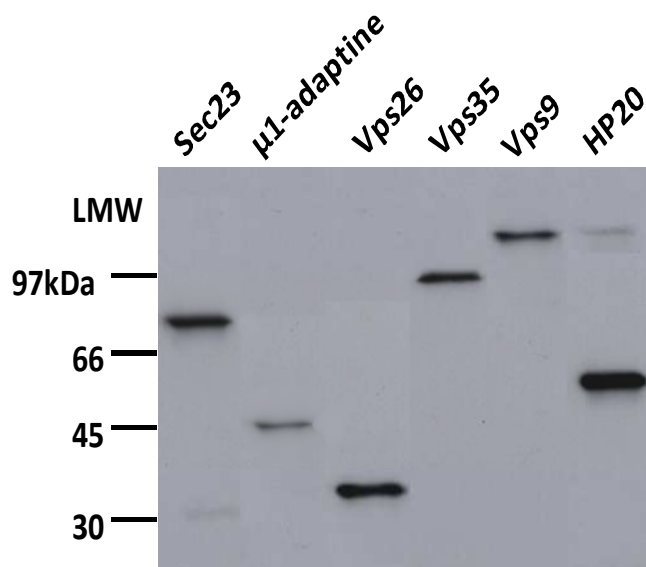


Figure 37. Analyse par immuno-empreinte de l'expression des protéines TgSec23, μ 1-adaptine, Vps26, Vps35, Vps9 et HP20. Les extraits protéiques des différentes souches parasites exprimant les protéines Sec23-HA, μ 1-adaptine-HA, Vps26-HA, Vps35-HA, Vps9-HA et HP20-HA ont été déposées dans un gel d'acrylamide 10% (SDS-PAGE) puis analysées par immuno-empreinte grâce à un anticorps anti-HA (anti-HA polyclonal de lapin, Invitrogen).

En effet, les protéines étiquetées avec l'épitope HA exprimées à partir des transgènes ont une migration électrophorétique avec des masses moléculaires de tailles escomptées pour Sec23 (88 kDa), μ 1-adaptine (48,9 kDa), Vps26 (34 kDa), Vps35 (95,6 kDa), Vps9 (140 kDa) et HP20 (62,2 kDa), démontrant que les protéines produites *in vivo* sont entières et qu'elles possèdent bien l'étiquette HA.

Nous avons choisi de valider initialement grâce à la stratégie de « Knock-In » et de l'immunofluorescence que l'homologue de Vps26 (Vacuolar Protein Sorting 26) chez *T. gondii* était bien localisé dans les mêmes compartiments que TgSORTLR. La validation du premier partenaire Vps26 que nous avons choisi avait déjà fait l'objet de la publication de ces résultats dans l' Article (Figure 6 page 523). Dans la suite de ma thèse, nous avons utilisé Vps26 comme un contrôle positif et nous avons confirmé sa co-distribution avec TgSORTLR (Figure 38C), parallèlement aux autres partenaires étudiés.

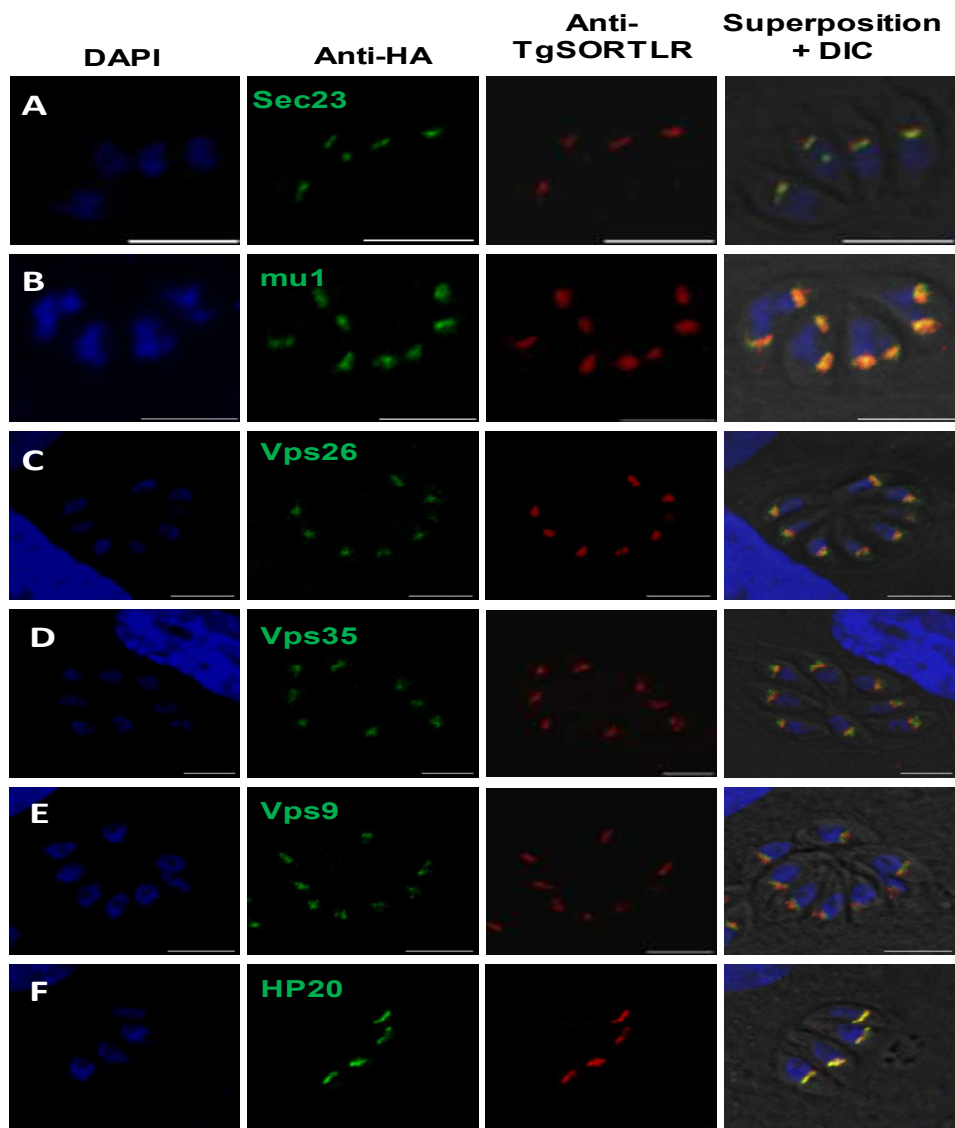


Figure 38. TgSORTLR est localisée à proximité de protéines de la machinerie de transport vésiculaire. A à F. Co-distribution en microscopie confocale de TgSORTLR et de TgSec23(A), Tgmu1-adaptine (B), TgVps26 (C), TgVps35 (D), TgVps9 (E) obtenue grâce à l'anticorps polyclonal anti-TgSORTLR et l'anticorps polyclonal de lapin anti-HA (invitrogene). Barres d'échelles, 5µm.

La seconde protéine partenaire étudiée est l'homologue de Sec23 appelée TgSec23 et qui est connue chez les mammifères et la levure en tant que sous-unité du complexe COPII. Cette protéine homologue TgSec23 qui est déterminante dans le transport antérograde des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi (Lord et al., 2011 ; Zanetti et al., 2011 ; Jensen et Schekman, 2011) co-localise partiellement avec TgSORTLR (Figure 38A). Toutefois, TgSec23 semble majoritairement situé en

amont du compartiment occupé par TgSORTLR probablement au niveau des premiers saccules de l'appareil de Golgi.

Nous avons également étudié le complexe AP-1 qui est constitué de protéines qui permettent l'assemblage des vésicules recouvertes de clathrine chez les mammifères et la levure pour le transport des protéines entre le TGN et les endosomes (McMahon et Mills, 2004 ; Popoff et al., 2011). Chez *T. gondii*, une étude a précédemment montré que l'homologue de la sous-unité μ 1 de l'adaptine est impliqué dans le transport antérograde des protéines des rhoptries depuis l'appareil de Golgi jusqu'aux pré-rhoptries/rhoptries (Ngô et al., 2003). Les signaux fluorescents de TgSORTLR (en rouge) et de Tg μ 1-HA (en vert) transgéniques obtenus par la technique de «knock-in» sont fortement co-distribués (Figure 38B), indiquant donc qu'une proportion significative des deux protéines réside donc dans le même compartiment.

Les protéines Vps26 et Vps35 sont deux composants du complexe retromer impliqué dans le recyclage et le transport rétrograde des récepteurs des endosomes vers le TGN (Kim et al., 2010 ; McGough et Cullen, 2011 ; Bonifacino et Hurley, 2008). Les signaux de chacune des deux protéines Vps26 (Figure 38C) et Vps35 (Figure 38D) se superposent majoritairement avec le signal de TgSORTLR. Leur homologue chez *T. gondii* est donc localisé dans les deux cas et d'une manière significative au niveau des compartiments où réside TgSORTLR mais également en partie plus vers l'apex du parasite probablement au niveau des endosomes plus éloignés du compartiment golgien (Figure 38C et 38D).

Enfin, la protéine Vps9 est une protéine GEF (Guanine nucleotide exchange factor) qui active Vps21 chez la levure ou les protéines de la famille Rab5 chez les mammifères et va ainsi favoriser la fusion membranaire (Burd et al., 1996 ; Di Fiore et al., 2003 ; Kajihô et al., 2011). Cette protéine est impliquée dans le transport des récepteurs cargo dans la voie endocytaire mais aussi dans le transport du récepteur au Mannose-6-Phosphate du TGN vers les vésicules périphériques (Di Fiore et al., 2003 ; Kajihô et al., 2011). Nous avons observé au cours de notre étude que la protéine homologue de Vps9 chez *T. gondii* est fortement colocalisée avec TgSORTLR et est probablement située au sein de la voie endolysosomale au niveau de l'appareil de Golgi et des vésicules post-golgiennes comme TgSOTRLR (Figure 38E).

Nous concluons que le domaine C-terminal de TgSORTLR donc l'extrémité cytosolique de TgSORTLR malgré sa divergence structurale est capable de co-localiser avec des protéines cargo cytosoliques du système endosomal ou du trafic intracellulaire et de les reconnaître d'une manière similaire au récepteur Mannose-6-Phosphate ou sortiline des cellules de mammifères (McMahon et Mills, 2004 ; McGough et Cullen, 2011 ; Coutinho et al., 2012 ; Nykjaer et Willnow., 2012).

De manière originale et inattendue, nous avons identifié trois protéines parasites (TGGT1_053770; TGGT1_074520 ; TGGT1_084200) qui n'ont aucune homologie avec des protéines connues et qui se fixent aussi sur la partie C-terminale de TgSORTLR. La technique de « knock-in » nous a permis d'observer que parmi ces 3 protéines hypothétiques (ou HP), les deux protéines TGGT1_053770 (HP) et TGGT1_084200 (HP30) montrent des signaux en immunofluorescence très distincts de TgSORTLR (Figures 39A et 39B) et colocalisent majoritairement avec le signal de la protéine des granules denses GRA1 (Figures 40A et 40B).

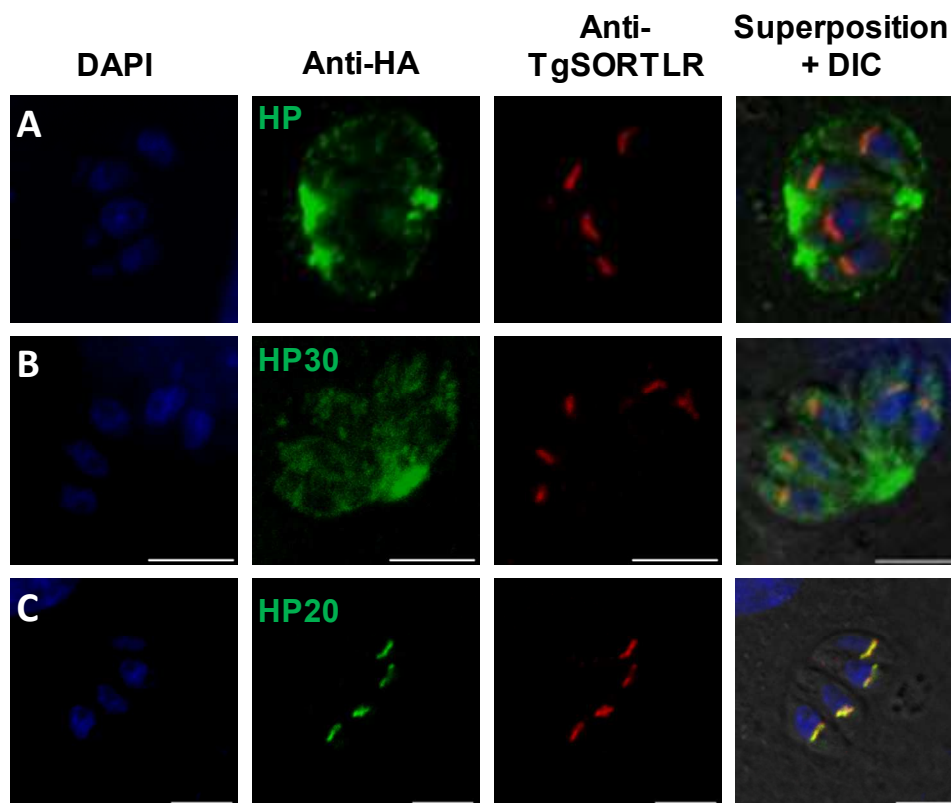


Figure 39. Co-distribution de TgSORTLR et des protéines TGGT1_053770 (HP), TGGT1_084200 (HP30) et TGGT1_074520 (HP20). Les protéines HP (A) ; HP30 (B) sont localisées dans des compartiments différents de ceux où se situe TgSORTLR tandis que HP20 (C) colocalise parfaitement avec TgSORTLR au niveau de l'appareil de Golgi. Barres d'échelle 5µm.

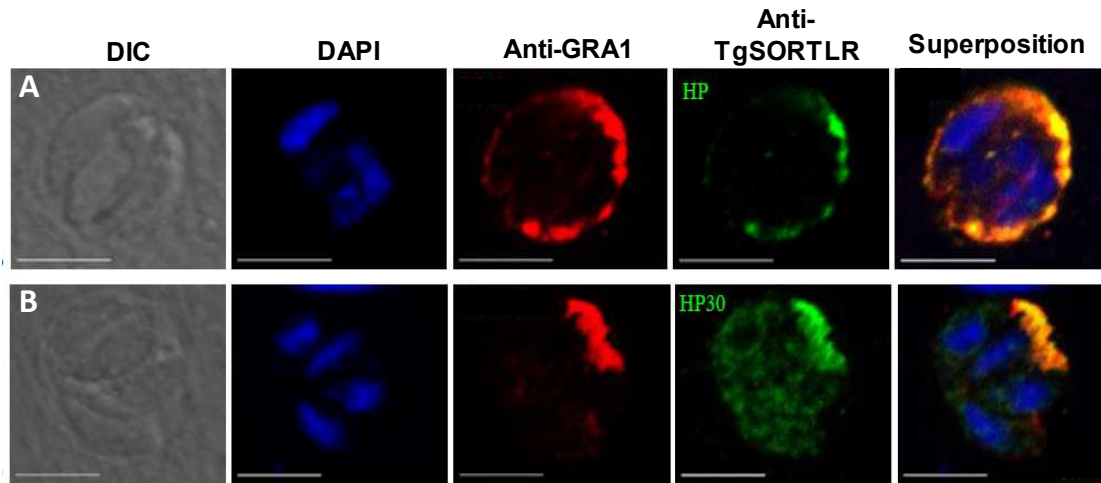


Figure 40. Localisation subcellulaire des protéines HP et HP30. Les protéines HP (A) et HP30 (B) sont principalement codistribuées avec la protéine de granule dense GRA1. Barres d'échelle 5µm.

Ces deux protéines hypothétiques sont donc localisées dans les granules denses et pourraient aussi représenter des contaminants qui se seraient peut être fixés de manière non-spécifique sur le domaine C-terminal de TgSORTLR lors de la chromatographie d'affinité. En revanche, la troisième protéine hypothétique HP20 (TGGT1_074520) montre une codistribution quasi complète avec TgSORTLR (Figure 39C). Cette protéine qui n'a jamais été décrite auparavant est ainsi localisée dans les compartiments golgiens et post-golgiens. Il est donc probable que HP20 soit un partenaire de TgSORTLR et soit donc impliquée dans le trafic intracellulaire de *T. gondii*. Comme la protéine HP20 n'existe pas chez l'Homme, elle pourrait être un partenaire parasite spécifique de TgSORTLR avec un rôle qui reste à déterminer dans le trafic intracellulaire de protéines de micronèmes et de rhoptries vers les organites apicaux au sein du système endolysosomal des parasites Apicomplexa. N'ayant aucune homologie avec des protéines connues, HP20 pourrait constituer à plus long terme une cible thérapeutique dans la lutte contre les parasites Apicomplexa.

2. TgSORTLR interagit spécifiquement et réciproquement avec les homologues de Sec23, µ1-adaptine, Vps26, Vps35, Vps9 et avec HP20

Après avoir purifié ces six protéines à l'aide du domaine C-terminal de TgSORTLR (Sloves et al., 2011), nous avons démontré que ces protéines sont capables d'immunoprécipiter à leur tour et de manière réciproque TgSORTLR. Nous avons utilisé les souches parasitaires génétiquement modifiées dans lesquelles les différentes protéines partenaires TgSec23, Tg µ1-adaptine, TgVps26, TgVps35,

TgVps9 et TgHP20 sont étiquetées avec l'épitope HA. Des colonnes Sépharose-anti-HA sont utilisées pour immunoprécipiter les protéines cytosoliques étiquetées HA en complexes avec leurs partenaires. Contrairement à la souche RH sauvage et à une souche où une protéine des granules denses est également étiquetée avec un HA et qui sont toutes les deux utilisées comme contrôles négatifs, les immuno-empreintes de la Figure 41 démontrent que toutes ces protéines transgéniques TgSec23, Tg μ 1-adaptine, TgVps26, TgVps35, TgVps9 et TgHP20 étiquetées avec l'épitope HA immunoprécipitent spécifiquement le récepteur TgSORTLR, confirmant fortement une association directe ou indirecte avec le récepteur (Figure 41).

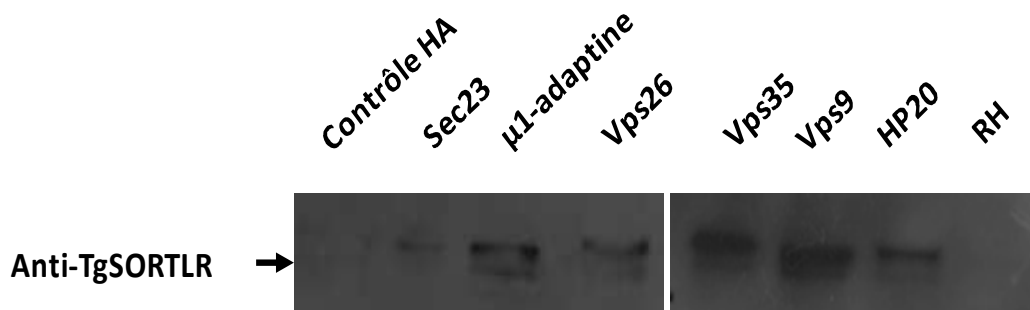


Figure 41. Immunoprécipitations réciproques de TgSORTLR par les différentes protéines partenaires de la machinerie de transport vésiculaire. L'immunoprécipitation a été réalisée avec des billes anti-HA (Pierce) et la présence de TgSORTLR confirmée par immuno-empreinte anti-TgSORTLR. Les immunoprécipitations ont été également réalisées sur des extraits protéiques provenant de parasites sauvages RH et des parasites exprimant une protéine des granules denses étiquetée HA et ont été déposées comme contrôles négatifs.

Ces résultats indiquent que TgSORTLR interagit donc spécifiquement et réciproquement avec ces différentes protéines du système de trafic vésiculaire.

3. **L'expression ectopique d'une version tronquée de TgSORTLR dépourvue du domaine C-terminal entraîne la délocalisation de ses partenaires cytosoliques**

Afin de définir précisément les relations entre TgSORTLR et ses partenaires cytosoliques impliqués dans le transport vésiculaire, les différentes souches transgéniques exprimant TgSec23-HA, Tg μ 1-adaptine-HA, TgVps26-HA, TgVps35-HA, TgVps9-HA et TgHP20-HA ont été transfectées

transitoirement avec un vecteur d'expression portant le gène TgSORTLR tronqué dépourvu de l'extrémité C-terminale et fusionné avec la GFP (TgSORTLR- Δ Ct-GFP) dont l'expression conduit à un effet dominant négatif caractérisé par la délocalisation de TgSORTLR endogène des compartiments golgiens et post-golgiens vers une relocalisation cytoplasmique diffuse. Nous avons exploité les propriétés de l'effet dominant négatif de la sortiline C-terminale tronquée pour répondre à la question s'il y a une interaction entre la partie C-terminale cytosolique entre le peptide C-terminale de TgSORTLR et les protéines cargo endosomales putatives. Si tel est le cas, la perturbation de la localisation golgienne par effet dominant négatif de TgSORTLR- Δ Ct-GFP doit entraîner une délocalisation identique de tous les partenaires cytosoliques qui interagissent avec l'extrémité C-terminale de TgSORTLR. La transfection transitoire de la construction TgSORTLR- Δ Ct-GFP dans les parasites transgéniques dont le signal observé en vert (Figure 42) grâce à la GFP fusionnée à la protéine TgSORTLR- Δ Ct confirme une localisation cytoplasmique du dominant négatif dans les parasites et cause une délocalisation cytoplasmique similaire des protéines TgSec23-HA, Tg μ 1-adaptine-HA, TgVps26-HA, TgVps35-HA, TgVps 9-HA et TgHP20-HA (en rouge) mais également dans la vacuole parasitophore au même titre que la protéine TgSORTLR endogène visualisée grâce à l'anticorps polyclonal anti-TgSORTLR (en violet).

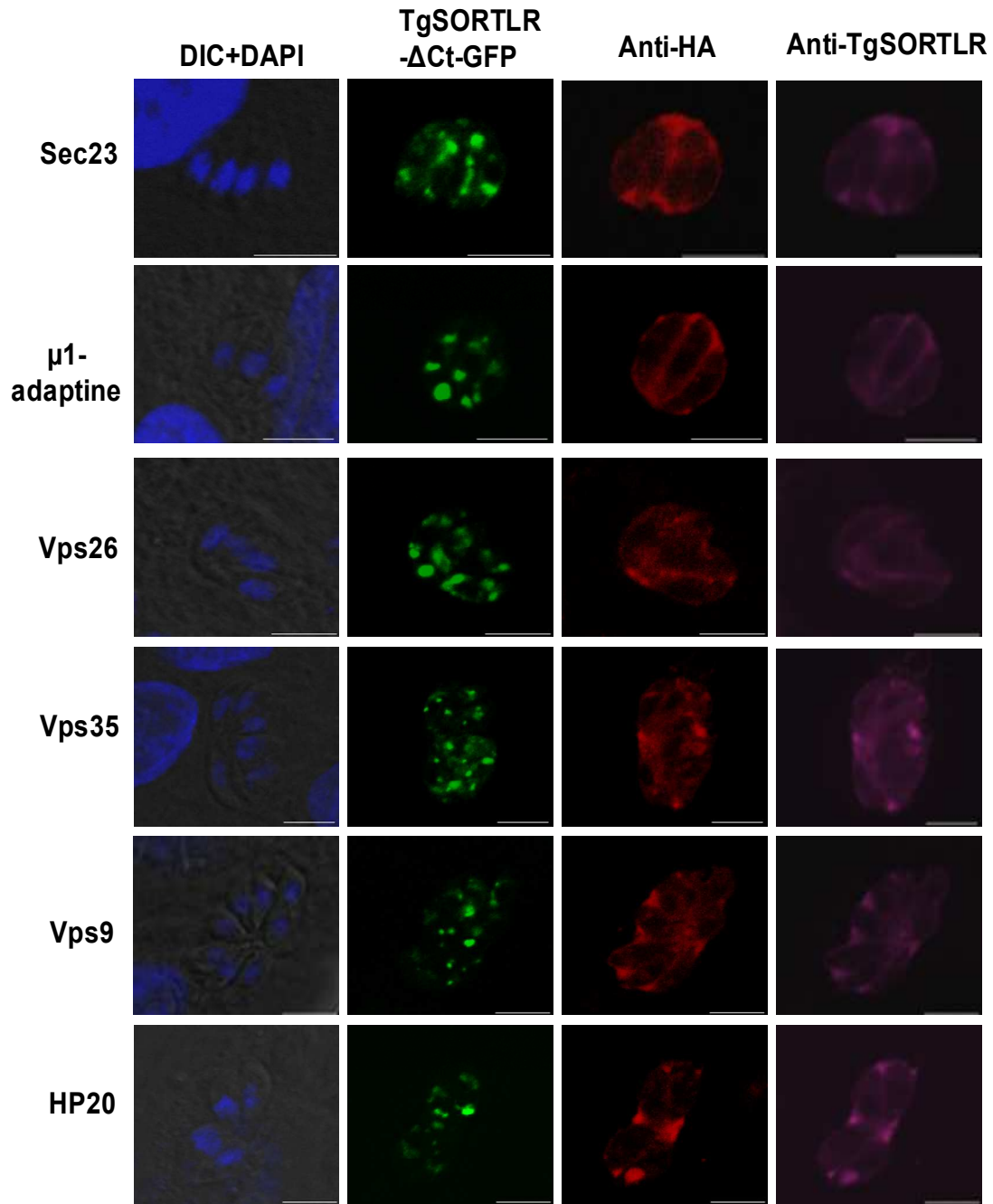


Figure 42. L'expression ectopique transitoire de TgSORTLR- Δ Ct-GFP conduit à la **délocalisation des protéines de la machinerie de transport vésiculaire**. Les souches parasitaires transgéniques exprimant les protéines TgSec23-HA, Tg μ 1-adaptine-HA, TgVps26-HA, TgVps35-HA, TgVps9-HA et TgHP20-HA révélées avec l'anticorps anti-HA (en rouge) ont été transfectées transitoirement avec un vecteur d'expression portant le gène TgSORTLR- Δ Ct-GFP (en vert). La protéine TgSORTLR (en violet) est marquée grâce à l'anticorps polyclonal de souris anti-TgSORTLR. Barres d'échelles, 5 μ m.

Les résultats de la Figure 42 démontrent ainsi que la colocalisation entre TgSORTLR et tous les protéines partenaires telles que TgSec23, Tg μ 1-adaptine, TgVps26, TgVps35, TgVps 9 et TgHP20 est complètement perturbée par l'expression de la protéine transgénique TgSORTLR- Δ Ct-GFP, démontrant que la codistribution observée entre TgSORTLR et ces protéines cargo cytosoliques est directement dépendante de leurs interactions avec l'extrémité C-terminale de TgSORTLR.

En conclusion, TgSORTLR interagit spécifiquement par son domaine C-terminal avec des protéines impliquées dans le transport vésiculaire dans des compartiments subcellulaires qui appartiennent à la voie de sécrétion des protéines. Ces résultats indiquent que le domaine C-terminal de TgSORTLR interagit avec les homologues parasitaires de TgSec23, Tg μ 1-adaptine, TgVps26, TgVps35, TgVps9 et TgHP20 pour former des complexes multi-protéiques permettant l'acheminement des protéines de rhoptries et de micronèmes dans la voie endolysosomale vers les compartiments cibles. La biogenèse des organites de sécrétion résultant de la fusion successive de vésicules dépend donc directement de TgSORTLR et également de la prise en charge du récepteur par les partenaires cytosoliques. Ces données suggèrent également que les protéines homologues à TgSec23, Tg μ 1-adaptine, TgVps26, TgVps35 et TgVps9 pourraient avoir des fonctions biologiques similaires entre *T. gondii* et probablement les autres parasites Apicomplexa, les mammifères et la levure. Des protéines parasitaires comme la protéine HP20 pourraient avoir des fonctions spécifiques dans le transport des protéines et la biogenèse des organites parasitaires.

Les résultats expérimentaux obtenus dans ma deuxième partie de thèse et les données bibliographiques existantes concernant les protéines de la machinerie de transport vésiculaire chez la levure et les mammifères nous permettent de proposer le modèle fonctionnel suivant : la protéine TgSORTLR néo-synthétisée dans le réticulum serait prise en charge dans des vésicules recouvertes du complexe protéique COPII et serait amenée dans l'appareil de Golgi grâce à l'action de TgSec23. Le transport jusqu'au compartiment *trans*-golgien dépendrait de vésicules recouvertes du complexe COPI. TgSORTLR lierait les protéines de rhoptries et de micronèmes dans le compartiment *trans*-golgien afin de les emballer dans des vésicules recouvertes de clathrine par l'intermédiaire du complexe AP-1 dont le recrutement se ferait par la sous-unité μ 1. Les vésicules formées chemindraient alors le long du cytosquelette jusqu'aux endosomes où des protéines comme TgVps9 permettraient la fusion membranaire. Les protéines de rhoptries et de micronèmes seraient ensuite délivrées dans les organites cibles. Après avoir délivré les protéines de rhoptries et de micronèmes

TgSORTLR serait alors recyclée à l'aide du complexe retromer Vps26 Vps35 et Vps 29 et peut-être des protéines du complexe AP-1. Nous ne pouvons pas inclure la protéine HP20 dans ce modèle pour l'instant car nous n'avons de preuves expérimentales biochimiques ou génétiques sur les fonctions intrinsèques formelles de cette protéine HP20 hormis le fait qu'elle s'associe spécifiquement et co-distribue parfaitement avec TgSORTLR. Actuellement, nous ne pouvons qu'avancer l'hypothèse que cette protéine hypothétique HP20 liant le domaine C-terminal de TgSORTLR pourrait constituer en quelque sorte une signature vésiculaire spécifique de *T. gondii* et participerait probablement à l'acheminement des vésicules vers les organites spécifiques des parasites Apicomplexa tels que les rhoptries et les micronèmes.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les parasites Apicomplexa comme *T. gondii* possèdent au niveau de leur apex des organites de sécrétion, rhoptries et micronèmes, dévoués pour la sécrétion fine et régulée de protéines effectrices. La sécrétion des protéines de micronèmes permet l'expression à la surface du parasite des protéines qui sont impliquées dans la formation du complexe appelé «glidéosome » qui est responsable de la motilité et concourt avec les protéines des rhoptries à la pénétration active du parasite dans la cellule hôte par l'intermédiaire d'une jonction mobile. Après l'entrée dans la cellule hôte, les rhoptries présentes dans le parasite vont également sécréter des modulateurs majeurs de la réponse immune de l'hôte et déterminants pour la virulence du parasite.

De nombreuses études ont permis d'avancer dans la compréhension du trafic intracellulaire et dans la biogenèse des organites. Les motifs peptidiques impliqués dans les mécanismes d'adressage ont été identifiés et caractérisés. Néanmoins, les récepteurs clés qui permettent de trier, d'acheminer les protéines et de former les rhoptries et les micronèmes n'avaient pas été identifiés.

Les études récentes concernant l'adressage des protéines de micronèmes et de rhoptries suggéraient l'action d'un récepteur cargo jusqu'alors inconnu permettant de lier et d'orienter les protéines vers les organites apicaux, rhoptries et de micronèmes (Gaji et al., 2011 ; Richard et al., 2009). Les MPRs (Mannose-6-Phosphate Receptor) et la sortiline sont deux types de récepteurs bien connus chez les mammifères pour leurs rôles dans le transport des protéines dans la voie endolysosomale (Canuel et al., 2009 ; Coutinho et al., 2012 ; Nykjaer et Willnow, 2012). Le génome de *T. gondii* ne possède pas d'homologues des MPRs mais possède un homologue du récepteur sortiline. Par ailleurs, *T. gondii* présente deux homologues de récepteurs de tri de type végétal appelés VSRs (Vacuolar Sorting Receptor). Ainsi, *T. gondii* possède à la fois des récepteurs de type végétal et des récepteurs de type animal (Gajria et al., 2008). Le récepteur TgVSR1 n'est pas exprimée chez les tachyzoïtes et la protéine TgVSR2 est localisée au niveau des endosomes mais son interruption génique n'affecte pas le transport des protéines de micronèmes (Gaji et al., 2011).

Au cours de ma thèse, nous avons étudié une protéine homologue à la sortiline chez le parasite Apicomplexa *T. gondii* que nous avons nommé *TgSORTLR pour Toxoplasma gondii SORTilin Like*

Receptor. Cette protéine, préalablement identifiée dans le laboratoire, possède de fortes homologies avec les protéines à domaine Vps10p (Fauquenoy et al., 2008). Les protéines à domaine Vps10p servent à orchestrer le tri et l'adressage de protéines chez les mammifères et la levure (Marcusson et al., 1994 ; Iwaki et al., 2006 ; Hermey, 2009). TgSORTLR possède un large domaine N-terminal luminaire très conservé dont le domaine Vps10p couvre la quasi-totalité et un court domaine C-terminal cytosolique plus divergent. Trois séquences d'insertion qui forment des boucles sont présentes dans le domaine N-terminal de TgSORTLR. Ces boucles pourraient permettre d'augmenter la surface d'interaction avec les ligands mais également de contrôler l'accessibilité au récepteur pour le ligand à l'image des boucles présentes dans l'arrestine (Sommer et al., 2012).

Nous avons découvert que TgSORTLR est localisée au carrefour du trafic intracellulaire, au niveau des saccules de l'appareil de Golgi et des vésicules post-golgiennes. L'expression transitoire d'une version tronquée de TgSORTLR déléetée du domaine N-terminal a montré que le domaine cytosolique est déterminant pour la localisation subcellulaire de TgSORTLR tandis que l'expression de TgSORTLR dépourvu de domaine C-terminal induit une délocalisation complète de la protéine TgSORTLR endogène et des protéines de rhoptries et de micronèmes. Nous avons démontré que TgSORTLR est capable de lier des protéines de rhoptries et de micronèmes. Cette association est portée par le domaine luminaire N-terminal de TgSORTLR et dépend probablement de modifications post-traductionnelles sur la protéine parasitaire. Par ailleurs, le domaine cytosolique de TgSORTLR est capable d'interagir spécifiquement et réciproquement avec diverses protéines de la machinerie de transport vésiculaire dont TgSec23, la clathrine, le complexe AP-1 et le complexe retromer.

Nous avons montré par génétique inverse que TgSORTLR est essentielle au transport des protéines de rhoptries et de micronèmes et à la biogenèse des organites sécrétoires apicaux. En l'absence de rhoptries et de micronèmes, les protéines normalement contenues dans ces organites se retrouvent complètement délocalisées dans le parasite et semblent en partie sécrétées via les granules denses dans la vacuole parasitophore et jusque dans la cellule hôte. Malgré la présence des protéines de rhoptries et de micronèmes, les parasites dépourvus de TgSORTLR montrent une atténuation complète de la virulence et ne causent aucun symptôme dans un modèle animal de toxoplasmose, ce qui suggère que la présence d'organites apicaux fonctionnels et d'un système de transport protéique efficient sont indispensables à la survie parasitaire.

Depuis environ une décennie de multiples arguments sous-tendent l'hypothèse que les voies de l'endocytose et de l'exocytose seraient fusionnées chez les parasites Apicomplexa (Hoppe et al., 2000 ; Ngô et al., 2003 ; Yang et al., 2004 ; Harper et al., 2006 ; Parussini et al., 2010 ; Gaij et al., 2011). Le caractère essentiel de TgSORTLR témoigne que le système de transport protéique des parasites Apicomplexa a évolué vers une simplification. Cette singularité parasitaire fait de TgSORTLR, l'unique récepteur cargo parasitaire des voies endosomales de fonctions probablement similaires aux sortilines connues chez les autres eucaryotes et qui se traduit par le transport des protéines de rhoptries et micronèmes vers les compartiments endosomaux en même temps que leurs enzymes de maturation afin d'acheminer ces protéines vers les voies d'exocytoses. En effet, que ce soit chez les levures ou dans les cellules de mammifères, la sortiline n'est pas essentielle pour la survie cellulaire parce qu'il y a une redondance de la voie de transport endolysosomal liée à la présence d'un second récepteur important, le récepteur du Mannose-6-Phosphate (M6PR; Marcusson et al., 1994 ; Jansen et al., 2007), qui est en revanche absent chez les parasites Apicomplexa.

Chez *T. gondii*, les données bibliographiques et les expériences que nous avons menées suggèrent que de nombreux acteurs de la machinerie de transport sont conservés avec la levure ou les cellules de mammifères. Les protéines de la machinerie de transport vésiculaire étudiées semblent jouer des fonctions similaires aux homologues existant chez les autres cellules eucaryotes. Chez *T. gondii*, le mécanisme de sécrétion régulé utilise les voies endolysomales pour acheminer les protéines vers les rhoptries et les micronèmes qui sont des organites apicaux de sécrétion qui déversent et ciblent directement leurs contenus en protéines à l'extérieur du parasite alors que chez les cellules de mammifères, les vésicules endosomales fusionnent avec la membrane plasmique directement à partir du TGN (Sossin et al., 1990). Il est à noter que l'existence d'une fusion de vésicules d'endocytoses et/ou d'exocytoses classiques qui fusionneraient avec la membrane plasmique parasitaire n'a pas été formellement démontrée chez les parasites Apicomplexa.

La sécrétion des rhoptries par exocytose est un mécanisme régulé initié par l'attachement à la cellule hôte tandis que les protéines de micronèmes sont sécrétées par un mécanisme dépendant d'un signal calcique intra-parasitaire. Des données bibliographiques récentes et nos résultats suggèrent que les rhoptries fonctionneraient comme des lysosomes sécrétoires (Ngô et al., 2004 ; Kats et al., 2008) alors que les micronèmes déchargeraient leur contenu de manière similaire aux vésicules de

sécrétion présentes dans les cellules mammifères (Lourido et al., 2010 ; Farrell et al., 2012). La découverte d'un récepteur TgSORTLR unique permettant d'orienter les protéines vers ces deux voies de sécrétions très différentes suggère que ces voies du trafic intracellulaire seraient au moins en partie fusionnées, notamment dans les étapes précoces du transport protéique entre l'appareil de Golgi et les endosomes.

Nous avons démontré que la région N-terminale de TgSORTLR située entre les acides aminés 36 et 202 est impliquée dans la localisation et dans l'activité fonctionnelle de TgSORTLR. Dans cette région on retrouve un pro-domaine putatif présentant un site de clivage putatif pour l'enzyme protéolytique ou la furine et également les domaines en hélice bêta B à D. Ces éléments doivent permettre la conformation correcte de la protéine permettant au récepteur d'être localisé dans l'appareil de Golgi, ce qui est déterminant pour qu'il puisse jouer ses fonctions dans le tri protéique comme c'est le cas chez les cellules de mammifères où le pro-domaine permet le transport de la sortiline dans l'appareil de Golgi précoce (Westergaard et al, 2004).

Les protéines de rhoptries et de micronèmes synthétisées sont associées sous formes de complexes protéiques dans l'appareil de Golgi (Gaji et al., 2011 ; Richard et al., 2009) avant de lier le récepteur TgSORTLR et d'être adressées jusqu'à leur organite cible. Les protéines de micronèmes et de rhoptries seraient présentes dans des clusters membranaires distincts rassemblant des protéines et des lipides particuliers qui vont déterminer la future composition des organites en formation (Richard et al.,2009). Les vésicules formées au niveau de l'appareil de Golgi vont alors interagir avec les protéines de la machinerie vésiculaire, dont certaines sont décrites dans notre travail, via le récepteur transmembranaire TgSORTLR. Les protéines sont alors maturées et dissociées par clivage protéolytique avant l'arrivée à l'organite final.

Nous proposons un modèle (Figure 43) dans lequel TgSORTLR serait amenée du RE à l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de vésicules recouvertes du complexe COPII et grâce à l'action de la protéine TgSec23 puis cheminerait jusqu'au trans-golgi probablement via les vésicules recouvertes de COPI. TgSORTLR lierait ensuite les protéines de rhoptries et de micronèmes au niveau de l'appareil de Golgi tardif et grâce à son domaine C-terminal recruterait le complexe TgAP-1 sur lequel va se fixer la clathrine, permettant d'empaqueter les protéines de rhoptries et de micronèmes dans des vésicules

puis d'acheminer ces vésicules jusqu'aux endosomes où la fusion membranaire ferait notamment intervenir TgVps9.

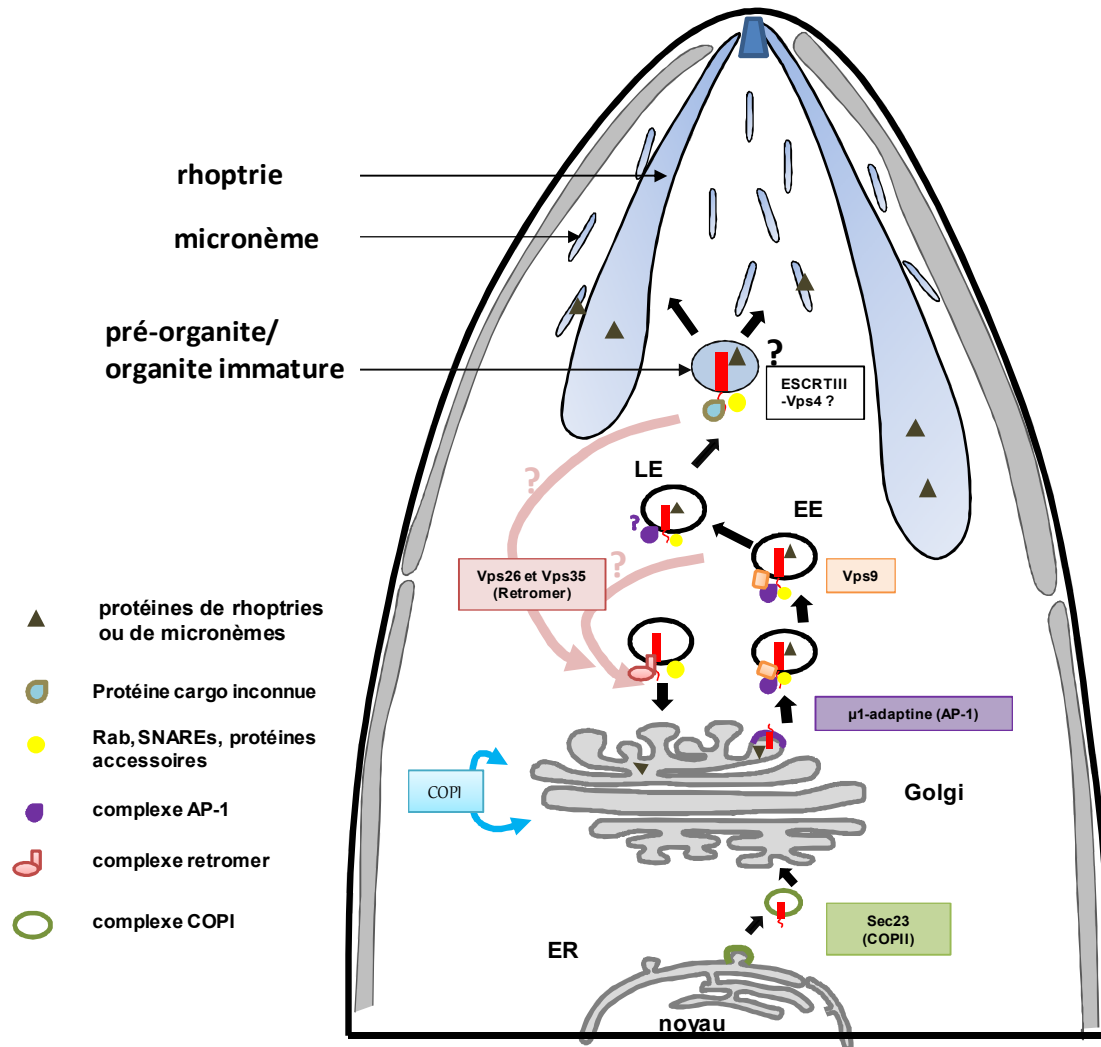


Figure 43. Modèle hypothétique du trafic intracellulaire de TgSORTLR et de ses ligands.

TgSORTLR est amenée jusqu'à l'appareil de Golgi par l'intermédiaire du complexe protéique COPII puis prend en charges les protéines de rhoptries et de micronèmes au niveau du trans-golgi. Le domaine C-terminal de TgSORTLR s'associe avec la sous-unité $\mu 1$ du complexe AP-1 permettant de former des vésicules qui contiennent les complexes protéiques de rhoptries ou de micronèmes qui sont alors acheminées jusqu'aux endosomes. Les protéines de rhoptries et de micronèmes subissent alors des maturations protéolytiques et sont dirigées vers les organites apicaux par un mécanisme qui pourrait faire intervenir les complexes AP-1 et/ou ESCRTIII.

Chez la levure ou les cellules de mammifères, les protéines à domaine Vps10p sont transportées du TGN vers les endosomes par les protéines GGA (Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding) et/ou AP-1 (Coutinho et al., 2012 ; Nikjaer et Willnow, 2012). Chez les parasites Apicomplexa, la présence de protéines GGA n'a pas été rapportée jusqu'à ce jour (Boehm et Bonifacino, 2001 ; Ngô et al., 2003). Le complexe AP-1 pourrait donc être le seul acteur permettant le transport antérograde de TgSORTLR et de ses ligands à partir de l'appareil de Golgi vers les endosomes.

Le compartiment précis dans lequel TgSORTLR délivre ces ligands reste à préciser. Certains de nos résultats suggèrent que TgSORTLR interviendrait de manière précoce dans le trafic intracellulaire c'est-à-dire jusque dans les endosomes. Toutefois, nous ne pouvons exclure qu'elle assure le transport jusqu'aux organites ou pré-organites. En effet, des travaux précédents semblent affirmer que la protéine μ 1-adaptine peut-être retrouvée dans les pré-rhoptries (Ngô et al., 2003). Par ailleurs, chez la levure les données bibliographiques attestent que la protéine Vps10p délivre son ligand CPY dans le compartiment pré-vacuolaire et est ensuite recyclée notamment grâce au retromer (Nothwehr et al., 1999 ; Deloche et Schekman, 2002 ; Iwaki et al., 2006 ; Abazeed et Fuller, 2008). Par analogie, il est donc envisageable que TgSORTLR délivre les protéines ROP et MIC jusque dans les organites immatures. Nous n'avons pas pour le moment de preuve formelle que TgSORTLR puisse transiter jusqu'aux pré-organites. Alternativement, nous pouvons imaginer qu'entre les endosomes et les pré-organites, Tg μ 1 permet le transport des protéines de rhoptries (et de micronèmes ?) par un mécanisme indépendant à TgSORTLR ou que TgSORTLR et Tg μ 1 en association sont impliqués dans ces étapes tardives du transport protéique.

Des expériences d'ARN interférence et de dominant négatif de Tg μ 1 ont montré une accumulation des protéines de rhoptries dans les rhoptries immatures où est localisée la protéine ROP2 lorsque le motif cytoplasmique YXX ϕ est supprimé (Ngô et al., 2003). Le complexe AP-1 serait donc impliqué dans le transport des protéines entre les pré-rhoptries et les rhoptries matures. Il a été montré que le complexe AP-1 est impliqué dans la biogenèse des rhoptries et l'ARN interférence de μ 1-adaptine utilisée conduit également à une incapacité des parasites à se répliquer correctement. La déplétion de TgSORTLR affecte la biogenèse des organites apicaux mais n'altère en aucun cas la division parasitaire. Cette différence peut être expliquée par le fait qu'AP-1 posséderait d'autres fonctions additionnelles ou par le choix de la stratégie expérimentale utilisée dans le travail cité ci-dessus.

Un autre complexe protéique qu'AP-1 pourrait également intervenir dans les étapes finales du transport protéique. Chez la levure ou les cellules de mammifères, quatre complexes ESCRT principaux intervenant séquentiellement sont requis pour le transport de protéines vers le lysosome (Bowers et al., 2004 ; Henne et al., 2011) (voir Tableau 1 décrit dans le paragraphe V de la partie Résultats, page 138-140). Chez les parasites Apicomplexa, le complexe ESCRT-III et la protéine Vps4 sont les seuls complexes homologues ESCRT identifiés par nos analyses bioinformatiques et les travaux effectués chez *Plasmodium falciparum* (Yang et al., 2004 ; Nevin et Dacks, 2009 ; Leung et al., 2008) (Tableau 1). Récemment il a été décrit que le complexe AP-3 permet le transport d'un récepteur de la MVB vers les lysosomes par une voie indépendante de l'ubiquitination en recrutant indirectement ESCRTIII (Dores et al., 2012). Les protéines de la machinerie ESCRT des parasites Apicomplexa pourraient intervenir dans les étapes finales du transport protéique entre les endosomes tardifs et les organites finaux via la formation des organites immatures qui dans le cas des pré-rhoptries portent des marqueurs de type endosomal et s'apparentent aux corps multi-vésiculaires (Yang et al., 2004 ; Ngô et al., 2003).

Ensuite, lorsque les protéines de rhoptries et de micronèmes délivrées par TgSORTLR (endosomes/pré-organites ?), le récepteur serait alors recyclé vers l'appareil de Golgi (Figure 43) par l'intermédiaire du complexe retromer et peut-être d'AP-1.

Nos résultats montrent que la plupart des protéines de rhoptries et micronèmes testées sont présentes dans les parasites dépourvus de TgSORTLR et sont sécrétées parfois jusque dans la cellule hôte. Nous avons découvert que la déplétion de TgSORTLR par le traitement ATc conduit à une aberration de la migration électrophorétique avec un changement de leurs masses moléculaires pour certaines protéines de rhoptries et micronèmes suggérant un défaut de maturation de ces protéines. Le décalage observé qui est parfois important en taille estimé entre 5 et 15 kilodaltons pourrait être expliqué par l'ajout de certaines modifications post-traductionnelles qui restent à déterminer. Il serait intéressant d'explorer s'il s'agit de modifications post-traductionnelles ayant lieu dans le parasite sauvage et qui se retrouve exacerbées dans le parasite mutant dépourvu de TgSORTLR ou est-ce l'absence de TgSORTLR qui entraîne ces modifications ?

Les modifications post-traductionnelles des protéines jouent un rôle clé dans les mécanismes cellulaires car elles sont capables de modifier ou d'inverser les fonctions des protéines pré-existantes.

T. gondii possède une large « gamme » de modifications post-traductionnelles (Sullivan et Hakimi, 2006). Chez les parasites Apicomplexa, les modifications post-traductionnelles sont cruciales pour de multiples mécanismes et notamment l'invasion et l'échappement des cellules hôtes (phosphorylation, prenylation, palmitoylation) et le trafic intracellulaire (ubiquitination, prenylation, palmitoylation) (Jortzik et al., 2011). Certaines modifications comme la palmitoylation pourraient jouer un rôle dans le transport des protéines de rhoptries et de micronèmes car cette modification est connue pour permettre l'ancrage à la membrane de protéines (Banning et al., 2011 ; Aicart-Ramos et al., 2011). Chez *T. gondii*, la palmitoylation représente une modification post-traductionnelle majeure pour l'invasion des cellules hôtes et l'inhibition de la palmitoylation entraîne une diminution critique de la motilité (gliding) et de l'invasion (Corvi et al., 2011 ; Alonso et al., 2012 ; Linder et Deschenes, 2007) et récemment il a été décrit chez *Plasmodium* que la palmitoylation mais aussi la myristoylation seraient nécessaires pour l'attachement de nombreuses protéines à la membrane des rhoptries (Cabrera et al., 2012). L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle impliquée dans la voie de dégradation des protéines mais également dans la biogenèse des organites (Varshavsky, 2012). En absence de TgSORTLR suite au traitement ATc, les protéines de rhoptries et de micronèmes peuvent ainsi être conduites vers la voie de dégradation par la voie de l'ubiquitination mais l'ubiquitination représente également un motif de ciblage des protéines vers les lysosomes en étant reconnue par la machinerie ESCRT (Piper et Lehner, 2011 ; Raiborg et Stenmark, 2009). Cette modification pourrait donc intervenir dans le trafic subcellulaire des protéines vers les rhoptries et les micronèmes considérés comme des lysosomes sécrétoires (Kats et al., 2008). Les glycosylations pourraient également jouer un rôle primordial pour la bonne conformation et le transport des protéines de rhoptries et de micronèmes. En effet, La N-glycosylation et la O-glycosylation des protéines sont impliquées le trafic, la sécrétion, la stabilité et la conformation des protéines (Zauner et al., 2012 ; Nagee et Yamaguchi, 2012). Chez *T. gondii* Il semblerait que la plupart des protéines présentes dans la voie de sécrétion du parasite soient modifiées par la O-glycosylation (Stwora- Wojczyk et al., 2004) et il a été en outre démontré que la glycosylation est responsable du transport correct de certaines protéines et permet aux protéines de franchir le contrôle qualité présent dans le RE (Fauquenoy et al., 2011).

Chez *T. gondii*, les prodomaines des protéines de micronèmes et de rhoptries sont cruciaux pour permettre l'adressage des protéines dans les organites cibles (Bradley et al., 2001 ; Richard et al.,

2009 ; Harper et al., 2006 ; El Hajj et al., 2008 ; Binder et al., 2008 ; Gaji et al., 2011). Par ailleurs, chez les mammifères, il est connu que la sortiline lie les versions non maturées de certaines protéines comme le pro-NGF ou pro-BDNF par l'intermédiaire du propeptide (Nykjaer et al., 2004 ; Teng et al., 2005). Notre hypothèse consiste donc à une interaction entre TgSORTLR et les précurseurs des protéines de micronèmes et de rhoptries au niveau de l'appareil de Golgi via le prodomaine de ces dernières. Toutefois, nous n'avons actuellement aucun élément qui pourrait permettre d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse.

Par ailleurs, les parasites dépourvus de TgSORTLR montrent une atténuation complète de la virulence et entraînent une réponse sérologique chez l'hôte. Néanmoins, la réponse humorale produite semble différente de celle obtenue après l'infection des souris par des parasites exprimant TgSORTLR et la primo-infection des souris avec les parasites dépourvus de TgSORTLR ne protège pas efficacement contre la réinfection contre une souche virulente RH sauvage. Ces résultats suggèrent donc que la réponse immune induisant une protection dépendrait non seulement des protéines des rhoptries et des micronèmes mais surtout de la présence d'organites rhoptries et micronèmes fonctionnels, de l'intégrité du système de sécrétion et de la présence de protéines matures et bien conformées. En d'autres termes, la présence de rhoptries et de micronèmes semblent induire la protection chez l'hôte infecté et que cette induction par les protéines de rhoptries et de micronèmes dépend probablement de leur maturation et/ou de modifications post-traductionnelles au cours du trafic endolysosomal qui vont leur permettre d'exercer leur activité fonctionnelle. Si ces résultats sont confirmés, cette découverte pourraient permettre d'orienter les recherches concernant la mise au point de vaccins en démontrant que des protéines recombinantes produites dans des bactéries ou des autres systèmes hétérologues seront probablement insuffisant pour protéger efficacement les hôtes infectés.

L'étude d'une protéine parasitaire essentielle dans la virulence et observer son comportement en absence de TgSORTLR pourrait permettre de déterminer si cette protéine conserve son activité fonctionnelle en absence de TgSORTLR et des organites de sécrétion apicaux. La protéine TgROP16 est déterminante pour la virulence du parasite notamment grâce à son activité kinasique qu'elle exerce directement dans le noyau des cellules hôtes sur des facteurs de l'immunité tels que STAT6 (Saeij et al., 2006 ; Saeij et al., 2006 ; Ong et al., 2010). Nous avons obtenu une souche parasitaire transgénique exprimant de manière stable la protéine ROP16 étiquetée avec l'épitope HA. Nous

avons contrôlé l'expression de ROP16-HA par immuno-empreinte puis confirmé par immuno-fluorescence que la protéine ROP16-HA exprimée par des parasites intracellulaires iKOSORT était localisée dans le noyau des cellules HFF. Ces outils vont maintenant nous permettre d'étudier la protéine ROP16 en présence et en absence de TgSORTLR et la capacité à phosphoryler STAT6 dans les deux conditions, nous renseignera sur les mécanismes reliant la virulence à la protection stérile après la primo-infection. En absence de TgSORTLR, ROP16 est-elle toujours ciblée dans le noyau des cellules hôtes infectées et si tel est le cas, ROP16 est-elle toujours capable d'avoir l'activité enzymatique de phosphorylation ?

Grâce aux différents acteurs de trafic vésiculaire que nous avons identifiés par affinité pour le domaine C-terminal de TgSORTLR, nous serons en mesure de reconstituer, du moins en partie, le système endolysosomal de *T. gondii*. Nous avons réalisé des expériences de biochimie afin de purifier et d'identifier par spectrométrie de masse les partenaires de TgSec23, Tg μ 1-adaptine, TgVps26, TgVps35, TgVps9 et HP20. Nous espérons ensuite pouvoir établir un réseau du système endolysosomal de *T. gondii* impliqué dans les voies de sécrétion et identifier la plupart des protéines intervenant dans ces mécanismes. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus ont permis de reconstituer certains complexes. Par exemple, l'immuno-précipitation de TgVps26-HA permet de purifier les protéines TgVps35 et TgVps29 qui forment le trimère de base composant le retromer. Ces expériences ont également mis en évidence, des protéines du complexe COP I, des protéines impliquées dans le transport des ions bivalents telle qu'une calcium ATPase dont les fonctions dans le transport du calcium et le trafic vésiculaire pour le recrutement des protéines sont connues et qui pourraient représenté un candidat pour l'établissement d'une asymétrie des lipides dans les membranes eucaryotes (Inesi et al., 2011 ; Ton et Rao, 2004 ; Micaroni , 2010)), et enfin des protéines Rab tels que Rab5 et Rab11 dont les fonctions au niveau des endosomes précoces et pour le recyclage des protéines, respectivement, ont été décrits chez les parasites Apicomplexa (Quevillon et al., 2003 ; Kats et al., 2008).

Le développement des connaissances concernant le transport subcellulaire chez les parasites Apicomplexa et intervenant dans la mise en place des rhoptries et des micronèmes nous a conduits à l'identification de protéines spécifiques des parasites comme la protéine HP20. Une séquence d'insertion occupant plus de la moitié de la longueur du domaine C-terminal de TgSORTLR est présente dans le domaine cytosolique des récepteurs de type sortiline des parasites mais absente des

sortilines des mammifères. Cette région pourrait donc être incriminée dans le recrutement de protéines spécifiques des parasites. Les premiers résultats que nous avons obtenus concernant les partenaires putatifs de HP20 montrent majoritairement de nouvelles protéines hypothétiques parasitaires en plus de quelques protéines cargo endosomales basiques. Cette découverte suggère que des voies endolysosomales et des complexes protéiques spécifiques aux parasites pourraient être présents chez *T. gondii* et pourraient jouer un rôle dans la mise en place des organites et dans le transport des protéines impliquées dans la virulence. En effet, des protéines exclusives aux parasites portent des fonctions propres aux parasites probablement pour permettre le transport de protéines et la biogenèse d'organites qui n'existent que chez ces parasites et qui sont impliqués dans la virulence du parasite. Les protéines hypothétiques nécessaires ou importantes au trafic intracellulaire chez les parasites Apicomplexa pourraient être le résultat de l'évolution des Apicomplexa vers le parasitisme. L'étude de ces protéines et de leurs rôles dans le trafic intracellulaire pourrait permettre de mieux comprendre l'évolution des mécanismes de trafic intracellulaire chez les parasites Apicomplexa. D'autre part, ces protéines inédites pourraient constituer des cibles thérapeutiques de choix car n'étant pas présentes chez l'Homme, des inhibiteurs spécifiques ne pourraient en aucun cas interagir avec l'homologue humain et provoquer des effets indésirables.

Nous avons identifié le récepteur cargo, TgSORTLR, permettant de trier les protéines et les amener vers ces organites apicaux micronèmes et de rhoptries. Nous avons établi un modèle hypothétique impliquant des protéines du manteau des vésicules dans le trafic intracellulaire des protéines de rhoptries et de micronèmes. Néanmoins, il reste à déterminer comment les molécules régulant les mécanismes de transport et de biogenèse des organites de sécrétion chez les autres eucaryotes comme les protéines Rab ou les protéines SNAREs pourraient intervenir chez le parasite. Les résultats préliminaires des immuno-précipitations réalisées sur les souches parasitaires transgéniques exprimant les protéines de la machinerie vésiculaire étiquetées avec le HA nous ont permis de purifier notamment la protéine TgNSF (N-ethylmaleimide sensitive factor), qui fait partie du complexe de fusion/arrimage des vésicules chez les eucaryotes. L'étude de la protéine NSF pourrait amener à l'identification des protéines SNAREs chez *T. gondii* qui sont connues chez l'Homme comme étant indispensables au transport des vésicules.

Récemment, une méchanoenzyme spécifique des alvéolés, de type dynamine (DrpB, Dynamine-related protein B) a été démontré pour son rôle essentiel dans la biogenèse des organites de

sécrétion (rhoptries, micronèmes et potentiellement granules denses) (Breinich et al., 2009). Nous n'avons pu établir une interaction directe entre TgSORTLR et DrpB ni une incidence possible entre les deux protéines car lorsque TgSORTLR est perturbée par l'expression d'un dominant négatif, cela n'entraîne aucune conséquence pour la localisation de DrpB suggérant qu'il n'y a pas de lien physique entre ces deux protéines. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que DrpB et TgSORTLR aient des fonctions peut-être complémentaires. DrpB pourrait intervenir dans la même voie que TgSORTLR mais à un niveau différent pour permettre la scission des vésicules.

TgSORTLR semble donc être l'unique récepteur au niveau du TGN permettant le tri des protéines de rhoptries et de micronèmes qui vont être sécrétées de manière régulée. Il y a donc une partie commune dans la voie de biogenèse des organites apicaux et la spécificité ou l'orientation des vésicules vers un organite cible spécifique pourrait dépendre de multiples facteurs qui seraient dédiés à la biogenèse d'un type d'organite et au transport d'un type de protéines. A l'heure actuelle nous ne savons pas quels sont facteurs qui orientent les vésicules vers la voie des rhoptries ou celle des micronèmes. La plupart des acteurs protéiques connus à ce jour pour réguler la biogenèse d'organites interviennent dans la formation d'une seule structure subcellulaire unique. A titre d'exemple, le trafic vésiculaire pour la formation et la maturation du complexe membranaire interne (CMI) implique la protéine GTPase Rab11B qui se comporte de manière très dynamique entre l'appareil de Golgi et le CMI et est requise pour la biogenèse du complexe membranaire interne en régulant le transport des vésicules recouvertes de clathrine (Agop-Nersesian et al., 2010). La protéine Rab11A est impliquée dans la maturation finale du CMI et notamment dans l'association du glideosome au CMI (Agop-Nersesian et al., 2009).

Un modèle séduisant permettant d'expliquer qu'un récepteur unique intervient dans deux voies de biogenèse différentes repose sur l'existence d'une compartimentalisation ou d'un enrichissement d'un type de protéine, de rhoptries ou de micronèmes, au niveau de l'appareil de Golgi. Ainsi, ce n'est pas le récepteur qui dicterait la future orientation des protéines mais plutôt l'environnement protéique et lipidique. TgSORTLR serait présente dans les deux cas à la fois pour les rhoptries et les micronèmes et lierait les ligands à proximité pour les empaqueter dans des vésicules où l'on ne retrouve donc qu'un type de protéines. Dans ce modèle TgSORTLR agirait comme un transporteur de protéine de rhoptries ou de micronèmes. Une autre hypothèse serait qu'un récepteur unique puisse assurer la biogenèse des deux organites distincts reposerait sur le « timing » différent de la formation des

rhoptries et des micronèmes. Ainsi, TgSORTLR pourrait d'abord assurer la biogenèse des rhoptries avant de prendre en charge les protéines de micronèmes au moment de la formation des micronèmes. Des protéines hypothétiques, dont peut-être HP20, pourraient également constituer des marqueurs des vésicules dirigées vers les micronèmes ou vers les rhoptries en intervenant par exemple comme des facteurs d'arrimage pour les vésicules.

PERSPECTIVES

De nos travaux et résultats obtenus, nous pouvons dégager les perspectives suivantes :

- Elargir et approfondir les connaissances du système endolysosomal chez *T. gondii*

_ L'observation des différentes souches parasitaires exprimant les protéines TgSec23-HA, Tg μ 1-adaptine-HA, TgVps26-HA, TgVps35-HA, TgVps9-HA et TgHP20-HA en microscopie électronique permettra de déterminer leur localisation subcellulaire précise. Nous avons récemment produit un anticorps polyclonal de rat dirigé spécifiquement contre la partie C-terminale de TgSORTLR qui sera utilisé pour des expériences de codistributions de TgSORTLR avec chacune des protéines partenaires afin d'observer l'agencement du domaine cytosolique de TgSORTLR et des protéines de la machinerie de transport au niveau des vésicules du système endolysosomal.

_ Des expériences *in vitro* avec les protéines partenaires recombinantes, dont la production est en cours, permettront de savoir si leur interaction avec le domaine C-terminal de TgSORTLR est directe ou indirecte et de caractériser cette interaction de manière plus approfondie.

_ L'obtention de parasites mutants conditionnels (iKO) pour les gènes codant les différents partenaires et l'observation de leurs phénotypes permettra de mettre en évidence l'importance du rôle de ces protéines dans le trafic intracellulaire et les mécanismes précis dans lesquels elles sont impliquées.

_ L'identification des partenaires de TgSec23-HA, Tg μ 1-adaptine-HA, TgVps26-HA, TgVps35-HA, TgVps9-HA et TgHP20-HA et la quantification des protéines au sein des complexes grâce à des analyses protéomiques permettra de déterminer la quantité de partenaires nécessaires pour la formation des réseaux d'interactions du système endolysosomal ainsi que la quantité de TgSORTLR et le nombre de protéines de rhoptries et micronèmes que le récepteur peut transporter afin de fabriquer ces organites apicaux chez *T. gondii*.

- Caractérisation des versions tronquées de TgSORTLR Δ 1SORT202-962 et Δ 2SORT-446-962

_ Nous avons inoculé les différentes souches parasitaires iKO-SORT complémentées (SORT-FL ; Δ 1SORT202-962 et Δ 2SORT-446-962) avec les différentes versions de TgSORTLR transgéniques dans un modèle animal de toxoplasmose afin d'étudier la virulence des parasites chez la souris et

d'analyser les réponses immunitaires mises en jeu. Nous espérons ainsi pouvoir déterminer les acteurs indispensables à l'induction d'une réponse immune efficace et à la protection stérilisante contre *T. gondii*.

_ Les protéines recombinantes Δ 1SORT202-789 et Δ 2SORT-446-789 sont capables *in vitro* de lier les protéines de micronèmes et de rhoptries. L'utilisation des souches parasitaires transgéniques exprimant les protéines mutées Δ 1SORT202-962 et Δ 2SORT-446-962 qui sont déléetées des mêmes domaines N-terminaux que les protéines recombinantes Δ 1SORT202-789 et Δ 2SORT-446-789 permettra de déterminer si les interactions observées *in vitro* sont également valables *in cellulo*.

- Développer de nouvelles stratégies d'imageries pour l'étude du système dynamique de transport vésiculaire

Définir le compartiment précis dans lequel TgSORTLR délivre ses ligands, si les protéines de rhoptries et de micronèmes sont présentes en même temps ou non dans un même compartiment, si dans l'appareil de Golgi on observe des clusters de protéines de rhoptries et des clusters de protéines de micronèmes séparés, étudier simultanément la localisation de nombreuses protéines rapidement sont autant de questions qui nécessitent que nous développons les nouvelles techniques qui sont décrites ci-dessous :

_ La microscopie corrélative combine la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique et permet de bénéficier de la simplicité de la microscopie à fluorescence pour repérer un évènement précis qui sera ensuite observé par la microscopie électronique. Par exemple, nous pourrions observer la codistribution des protéines de micronèmes et de rhoptries puis identifier en microscopie électronique si ces protéines sont bien localisées dans les mêmes vésicules ou compartiments.

_ La microscopie à super-résolution (30-40 nm) « PALM » ou « STORM » est basée sur la photo-activation intense de fluorochromes. Cette technique nous permettra d'obtenir de manière plus simple que la microscopie électronique la localisation précise des nombreuses protéines identifiées lors de la reconstitution du réseau du système endolysosomal et qui interviennent dans le trafic intracellulaire

_ La microscopie à intervalle de temps permet d'appréhender la dynamique de protéines au fur et à mesure du temps. On sera alors capable d'observer le trajet réalisé par TgSORTLR au cours du cycle parasite et la localisation du récepteur et de ses ligands au cours de la biogenèse des organites.

- Caractériser les constituants de la machinerie ESCRT chez *T. gondii*

Le complexe ESCRT-III et les protéines associées à ce complexe comme la protéine Vps4 pourraient jouer un rôle dans le trafic des protéines vers les rhoptries et les micronèmes pour l'acheminement des protéines entre les organites immatures et les organites apicaux cibles. Tout d'abord, nous chercherons à localiser précisément les protéines du complexe ESCRT-III et les protéines associées à ce complexe grâce à des stratégies de « Knock-In », puis à identifier les partenaires de ces protéines et caractériser les interactions des protéines du complexe. Ces expériences nous permettront de déterminer le rôle des protéines des ESCRT-III et pourrait nous permettre de compléter le modèle des voies endolysosomales impliquées dans la biogenèse des organites responsables de la virulence des parasites Apicomplexa.

- Déterminer les fonctions des séquences d'insertion présentes dans les sortilines des parasites Apicomplexa.

D'autres perspectives concernent l'étude des différentes insertions peptidiques retrouvées dans les récepteurs de type sortiline des parasites Apicomplexa.

Le domaine N-terminal de TgSORTLR contient trois séquences d'insertion qui forment des boucles lors d'une modélisation tri-dimensionnelle *in silico*. Ces séquences exclusivement parasitaires pourraient permettre à TgSORTLR de lier les protéines de rhoptries et de micronèmes qui sont des protéines existant exclusivement chez les parasites Apicomplexa. Le rôle de ces boucles n'est pas encore défini et de multiples questions demeurent : ces boucles permettent-elles au tunnel formé par les domaines beta-propeller d'augmenter et/ou de moduler la zone d'interaction du récepteur pour les différents ligands ? Sont-elles responsables de la capacité de TgSORTLR à lier de multiples ligands très différents structuralement ? Grâce à l'obtention du vecteur permettant de compléter la souche iKO-SORT, nous disposons dorénavant d'une matrice pour réaliser des constructions plasmidiques dans lesquels chaque boucle peut-être délétée de manière indépendante ou plusieurs boucles délétées simultanément. L'intégration de ces constructions dans le génome du parasite nous renseignera sur le rôle de chaque boucle ainsi que sur les mécanismes d'interaction précis entre TgSORTLR et les protéines de rhoptries et de micronèmes. Nous pourrions peut-être identifier les séquences protéiques qui permettent au récepteur TgSORTLR de différencier les protéines de

rhoptries et de micronèmes ou du moins les séquences responsables de la liaison des protéines de rhoptries ou de micronèmes.

Le domaine C-terminal de TgSORTLR possède également une insertion qui occupe plus de la moitié de sa longueur. Cette insertion pourrait permettre à TgSORTLR de recruter des partenaires protéiques spécifiques des parasites qui pourraient jouer un rôle majeur dans le trafic des protéines et la biogenèse des organites de sécrétion et déterminer la spécificité des vésicules pour les rhoptries et de celles destinées aux micronèmes. En d'autres termes, cette séquence d'insertion peptidique et les partenaires qui se lient spécifiquement aux peptides d'insertion pourraient déterminer comment un récepteur homologue à la sortiline chez les parasites Apicomplexa est nécessaire à la formation des organites apicaux qui sont impliqués dans la virulence parasitaire.

- Identifier des inhibiteurs à visée thérapeutique ciblant TgSORTLR ou ses partenaires

L'identification d'inhibiteurs parasitaires ciblant TgSORTLR ou ses partenaires est une perspective pour laquelle nous envisageons deux stratégies :

_ La première consiste à cribler à haut débit des banques de molécules connues sur des parasites exprimant une version étiquetée de la protéine TgSORTLR par la GFP. Les parasites transgéniques exprimant TgSORTLR-GFP seront alors cultivés en présence des différentes molécules de manière indépendante. La lecture par un microscope à fluorescence nous permettra alors de sélectionner les molécules perturbant la localisation de TgSORTLR et ses fonctions dans la biogenèse des organites apicaux et la virulence parasitaire.

_ La seconde méthode consistera à étudier les mécanismes d'interaction entre le domaine C-terminal de TgSORTLR et ses partenaires par l'utilisation de peptides couvrant chacun une partie du domaine C-terminal de TgSORTLR. Les résultats nous permettront non seulement de connaître les motifs C-terminaux responsables des différentes interactions mais également les peptides capables d'inhiber ces interactions et qui doivent donc bloquer les fonctions de TgSORTLR pour la formation des rhoptries et des micronèmes.

A plus long terme, des études de cristallographie et de co-cristallographie peuvent être envisagées pour déterminer les structures 3D ainsi que les zones d'interactions des protéines afin de cribler des inhibiteurs spécifiques adaptés.

Les inhibiteurs identifiés pourront ensuite être testés dans un modèle animal de toxoplasmose mais également sur les autres parasites apicomplexes comme *Plasmodium falciparum*.

- Comprendre l'induction d'une immunité protectrice contre *T. gondii*.

L'activité fonctionnelle des protéines de rhoptries et de micronèmes dans l'induction d'une immunité protectrice contre *T. gondii* a été largement décrite. L'étude de l'activité de la protéine ROP16 et d'autres protéines connues pour être impliquée dans la virulence parasitaire et pour moduler les réponses immunitaires chez le parasite iKO-SORT ainsi que les réponses immunitaires mises en jeu lors de l'infection des souris par les différents parasites complémentés participera à relier la présence des organites apicaux du toxoplasme et le développement de la protection de l'hôte.

- Identifier les modifications post-traductionnelles potentiellement impliquées dans le trafic intracellulaire des protéines de rhoptries et de micronèmes.

Afin de déterminer la nature des modifications post-traductionnelles putatives sur les protéines de rhoptries et de micronèmes, nous réaliserons des immuno-précipitations de différentes protéines ROP et MIC issues des parasites sauvages ou dépourvus de TgSORTLR en utilisant des anticorps spécifiques de ces protéines, puis les différentes protéines seront soumises à des analyses en spectrométrie de masse.

- Déterminer si le propeptide putatif de TgSORTLR possède un rôle important pour l'activité fonctionnelle de TgSORTLR.

Le rôle du propeptide putatif de TgSORTLR peut-être exploré par l'intégration dans les parasites iKO-SORT d'une version tronquée de TgSORTLR dépourvue du pro-domaine putatif ou d'une version de la protéine où le site de reconnaissance théorique par la furine est muté

L'identification d'un récepteur homologue à la sortiline chez l'organisme modèle *T. gondii* pourrait permettre de répondre à des questions de biologie cellulaire quant aux rôles des sortilines dans le trafic des protéines et dans la prise en charge des ligands. Le développement des connaissances sur le trafic intracellulaire et la biogenèse des organites responsables de la virulence des parasites Apicomplexa ainsi que la découverte de TgSORTLR mais aussi de nouveaux acteurs du système de

transport vésiculaire exclusivement d'origines parasitaires, constituent peut être des éléments clés de l'histoire évolutive des parasites Apicomplexa qui pourraient également représenter de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pertinentes contre les infections parasitaires.

MATERIELS ET METHODES

Tableau 2. Amorces oligonucléotidiques utilisées

Nom de l'amorce	Séquence oligonucléotidique	Utilisation	Commentaire
Sort_recomb F	ggccGGATCCAGTGAAGACGCGCAGAAGCGTGAA	protéine recombinante (anticorps)	pGex
Sort_recomb R	ccggCGCCGGCGGCACTGGGTGGACCCGATGGC	protéine recombinante (anticorps)	pGex
Fulllength_TgSORTLR_F	ccggGGATCCATGGCGCACAGCTTCGCACGAGG	TgSORTLR	pMAH14-HA/pMAH14-GFP
TgSortNt_F	ccggGGATCCCGCAGAAGCGTGAA	TgSORTLRΔCt	pMAH14-HA/pMAH14-GFP
Sort_Tmb_R	ccggGAATTCTCTCCAGTTTTCCGCCAGATAGTTGATG	TgSORTLRΔCt	pMAH14-HA/pMAH14-GFP
PS_Sortilin_F	ccggGGATCCATGGCGCACAGCTTCGCACGAGGCCGCCACCGCGGCCGCGAACAACACTCGCGGTTTTCCCTTGCT	Peptide Signal	pMAH14-HA/pMAH14-GFP
Sort_PS_AS	ccggTCTAGAGAAGAATCCCGGCAGAAGCGAAG	Peptide Signal	pMAH14-HA/pMAH14-GFP
TgSortCt_R	ccggGAATTCAAGAAGTTCGACGTTATCCTCGTCAATCG	TgSORTLRΔnt	pMAH14-HA/pMAH14-GFP
TgSort_Tmb_F	ccggGGATCCcccgggTCTAGAGTCAGTCGAGGAGGAAAAGACAGTGTT	TgSORTLRΔnt	pMAH14-HA/pMAH14-GFP

SORT_c-myc_F	CCGGGAATTCATGGCGCACAGCTTCGCACGA	SORT-c-myc ectopique	pTetO7Sag1
SORT_c-myc_R	ccggTTAATTAAGGCCATGGCCAGGTCCTCCTCGGAGATGAGCTTCTGCTCCTGCATGAGGTCAAGAAGTTCGACGTT	SORT-c-myc ectopique	pTetO7Sag1
Tub5Bléo_Kpnl_F	GGCCGGTACCGTCCCGGTTTCGTGAAATTCTCTG	SORT-c-myc ectopique, cassette de résistance	pTetO7Sag1
Tub5Bléo_Kpnl_R	GGCCGGTACCGGCGATCAACATCAGCCAGGTC	SORT-c-myc ectopique, cassette de résistance	pTetO7Sag1
5'TgSORTLR_F	ccggCATATGATGTCATCAGGAGCCCTCTGCC	plasmide iKO (ADN 5' flanquant)	Clonage dans le pG13-DTS4
5'TgSORTLR_R	ccggCATATGGGTGACTGTCTGTACACCGGAGG	plasmide iKO (ADN 5' flanquant)	Clonage dans le pG13-DTS4
3'TgSORTLR_F	ccggAGATCTATGGCGCACAGCTTCGCACGAG	plasmide iKO (ADN 3'flanquant)	Clonage dans le pG13-DTS4
3'TgSORTLR_R	ccggCCTAGGCCGCGGTAGACCAGACGCGTG	plasmide iKO (ADN 3'flanquant)	Clonage dans le pG13-DTS4
Test_iKO_TgSORT_F	CCGGCGTAGACGTGCTAAGTCTGTGCCA	Criblage des clones iKO par PCR	
DHFR_IntR	GGCGTTGAATCTCTTGCCGACTGATGGAGAGGGAAGTCC	Criblage des clones iKO par PCR	
recomb_NtSORT_F	ggccGGATCCAGTGAAGACGCGCAGAAGCGTGAA	Protéine recombinante	pGex-6P3
Recomb_Δ1SORT_F	ggccGGATCCAACCACCAGCTCTTCTACACGCGG	Protéine recombinante	pGex-6P3
Recomb_Δ12SORT_F	ggccGGATCCGAAGAGGTGATTCGCACAGTGATCTCC	Protéine recombinante	pGex-6P3

Recomb_Δ123SORT_F	ggccGGATCCGAATCAGACGCCGACGCCGCC	Protéine recombinante	pGex-6P3
Recomb_mutSORT_R	ccggGAATTTCATGTCTTCTCCTCGACTGACGGG	Protéine recombinante	pGex-6P3
Recomb_CtSORT_F	ggccGGATCCGCGAAAAGTGAAGACTGAAGAAGTTC	Protéine recombinante	pGex-6P3
Recomb_CtSORT_R	ccggGAATTCTCAAAGAAGTTCGACGTTATCCTCGTCGAA	Protéine recombinante	pGex-6P3
Recomb_Rop1_F	GATCGCGCTTATTTAGGTGACACTATAGAACAGACCACCATGGTAGACTTCGACACCATGGAGCAAAGGCTG	Expression des protéines <i>in vitro</i>	
Recomb_Rop1_R	TCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATTGCGATCCATCATCCTGCTCTCTTCC	Expression des protéines <i>in vitro</i>	
Recomb_Mic5_F	GATCGCGCTTATTTAGGTGACACTATAGAACAGACCACCATGGTATTAGCCTCGCATTTACGCTCCAGACAC	Expression des protéines <i>in vitro</i>	
Recomb_Mic5_R	TCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATGCGAGTTTCACCTCGGAGTCGAG	Expression des protéines <i>in vitro</i>	
KI_vps26_F	TACTTCCAATCCAATTTAATGCCGCGGCTGTCTCTGCATAGGTG	Knock-In vps26	pLic-HA_DHFR
KI_vps26_R	TCCTCCACTTCCAATTTAGCCCCGATCTTCTCCTCCACATTGTGAT	Knock-In vps26	pLic-HA_DHFR
BamHI_vps26_F	ccggGGATCCATGTTGGCTACTCTGTTCGGCAGTGTCTGT	Expression transitoire de Vps 26	pMAH14-GFP
EcoRI_vps26_R	ccggGAATTCCTCCGATCTTCTCCTCCACATTGTGATTC	Expression transitoire de Vps 26	pMAH14-GFP
F_KI_Sec23	TACTTCCAATCCAATTTAATGCTCAGAAACGCCTCCCTCTGTGCATCTTTTC	Knock-In Sec23	pLic-HA_DHFR

R_KI_Sec23	TCCTCCACTTCCAATTTAGCGCTCTGGACTGCCAGTTTGATGAGGTG	Knock-In Sec23	pLic-HA_DHFR
F_KI_Vps9	TACTTCCAATCCAATTTAATGCCCTGCTTGCCCTCGCCT	Knock-In Vps9	pLic-HA_DHFR
R_KI_Vps9	TCCTCCACTTCCAATTTAGCTTTCCTGTCACTATGTTTCGCGTCCG	Knock-In Vps9	pLic-HA_DHFR
F_KI_Vps35	TACTTCCAATCCAATTTAATGCCAAGAGTGGGTGTCACAGTTACCTGCC	Knock-In Vps35	pLic-HA_DHFR
R_KI_Vps35	TCCTCCACTTCCAATTTAGCAGATGTTGAAACACTGATTCATTAGTCCAGTGAGTCC	Knock-In Vps35	pLic-HA_DHFR
F_KI_μ1-adaptine	TACTTCCAATCCAATTTAATGCGGATCTTCCTAGTTCGCGCCAGTCAC	Knock-In Sec23	pLic-HA_DHFR
R_KI_μ1-adaptine	TCCTCCACTTCCAATTTAGCGGAGAGTCTCAGTTGGTACTCTCCATTTGAGT	Knock-In Sec23	pLic-HA_DHFR
F_KI_HP20	TACTTCCAATCCAATTTAATGC GCTTCTTGGCCCTCCTCGTCCG	Knock-In Sec23	pLic-HA_DHFR
R_KI_HP20	TCCTCCACTTCCAATTTAGCCAATCTGTCAAGTCTTCCTCCAGTCAG	Knock-In Sec23	pLic-HA_DHFR
PromSORT_Hpal_F	CCGGGTTAACTCACTTGGTGTGATACATTTGCGCGACAC	complémentation	p5'/3'UPRT
promSORT_NotI_R	ccggGCGGCCGAGTGACTGTCTGTACACCGGAGGAGGC	complémentation	p5'/3'UPRT
ORFSortilin_NotI_F	CcggGCGGCCGATGGCGCACAGCTTCGCACGAGGC	complémentation	p5'/3'UPRT
3'UTRSag1PmeI_R	ccgggtttaaacGACGATCGCCATCGGGGTCTG	complémentation	p5'/3'UPRT

PS_SORT_NotI_R	CCGGGCGGCCGCGAAGAATCCCGGCAGAAGCGAAGG	complémentation	p5'/3'UPRT
ORFSORTΔ1_F	CCGGGCGGCCGCAACCACCAGCTCTTCTACACGCGG	complémentation	p5'/3'UPRT
ORFSORTΔ12_F	CCGGGCGGCCGCGAAGAGGTGATTTCGCACAGTGATCTCC	complémentation	p5'/3'UPRT

I. Culture cellulaire

1. Culture des fibroblastes humains

La lignée primaire de fibroblastes (HFF ou «Human Foreskin Fibroblast») est cultivée en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 10 000 unités/ml de Penicilline/Streptomycine et 2 mM de L-glutamine (Gibco). L'entretien cellulaire est réalisé par passages d'une portion du tapis cellulaire confluant décollé à l'aide d'une solution trypsique (0,05% trypsine ; 0,1% EDTA). Les cellules HFF sont cultivées en atmosphère humide sous 5% de CO₂ à 37°C.

2. Entretien des parasites

Les parasites utilisés sont des tachyzoïtes virulents de type I. Les parasites sont maintenus par l'infection régulière d'une monocouche de cellules HFF. En général, les parasites sont inoculés tous les 2 ou 3 jours avec un changement du milieu 4 heures post-infections (p.i.). Les souches parasitaires utilisées dans ce travail sont : la souche RH sauvage, RHTaTi (Transactivator trap identified, une souche inductible sensible à l'AnhydroTetracycline ou ATc ; Meissner et al, 2002), RHΔKu80 (une souche génétiquement modifiée permettant un taux élevé de recombinaison homologue, Huynh and Carruthers, 2009), RHΔKu80TaTi (qui regroupe les deux caractéristiques : intégration homologue élevée et induction par l'ATc, Sheiner et al, 2011), RH GRASP-RFP, RH HDEL-RFP, deux souches présentant un marqueur fluorescent de compartiments subcellulaires (respectivement l'appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) et RH-DrpB-YFP où une copie du gène de DrpB (Dynamin Related Protein B) fusionnée avec la séquence codant YFP.

3. Purification des parasites

Lors de la lyse des cellules, le contenu de la boîte infectée est gratté, passé en seringue pour l'éclatement totale des cellules, puis filtré à l'aide de membranes millipore 3μm (polycarbonate de porosité 3μm, Whatman). Une fraction des parasites est énumérée sur une lame de Malassez et le reste est alors centrifugé à 400g pendant 15 minutes. Dans certains cas, notamment lors de la purification de quantités importantes de parasites, la suspension est passée dans un

homogénéisateur de Dounce, puis une première filtration sur laine de verre (non traitée) est nécessaire avant la filtration (filtre de 3µm). Les parasites ainsi purifiés peuvent être utilisés pour toutes les techniques de biochimie ou de biologie cellulaire décrites ci-dessous. Les lavages des parasites se déroulent par des étapes de centrifugations successives à 400g pendant 15 minutes.

II. **Biologie moléculaire**

1. **Extraction des ARNm**

Les tachyzoïtes purifiés sont lysés dans un tampon de lyse sans RNases [1% SDS, 50 mM d'acétate de sodium (NaOAc), pH 5,2, 10 mM EDTA]. Un volume identique de phénol est ajouté puis la solution est incubée 15 minutes (min) à 65°C en agitant fréquemment au vortex. Après centrifugation de 5 min à 14 000 rpm, la phase aqueuse (phase supérieure) est conservée puis soumise à une seconde extraction phénolique avant de réaliser deux extractions consécutives par du chloroforme (volume/volume). Les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont précipités sur la nuit à -20°C par de l'acétate de sodium 0,3 M (pH 5,2) et deux volumes et demi d'éthanol 100%. Le culot d'ARN obtenu après centrifugation de 30 minutes à 14000 rpm à 4°C est lavé deux fois de suite à l'éthanol 80% (v/v). Les culots séchés sont repris par de l'eau milli Q stérile contenant de la RNAsine (Promega). Les contaminations par de l'ADN génomique (ADNg) sont évaluées par PCR (Polymerase Chain Reaction) sur des gènes de ménages (SOD, SuperOxyde Dismutase et/ou actine). Par exemple, une contamination par de l'ADNg détectée par une électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant du BET 0,5 µg/mL (Bromure d'Ethidium) se traduit par l'apparition d'une bande à environ 700 pb correspondant à l'intron et exon de la SOD. Les contaminants d'ADN génomique sont alors digérés par la DNase I (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) à raison d'une unité de DNase par µg d'acides nucléiques, durant 30 min à 37°C. Les ARN totaux sont alors de nouveaux extraits par phénol/chloroforme et précipités par de l'éthanol 80% puis conservés à - 80°C.

2. **Synthèse des ADNc par rétro-transcription (RT)**

Les ARN totaux sont repris par de l'eau milli Q stérile et avec 10 µM d'oligoDT avant une incubation pendant 2 min à 72°C puis 2 min dans la glace. La réaction de RT est réalisée en présence de 125 unités de Boehringer RT AMV (Reverse Transcriptase AMV, Avian Myeloblastis Virus », Roche) en

présence de RNAsine et de 25mM de dNTP pendant 1h à 42°C. Après un refroidissement de 10 min dans la glace, les ADNc sont extraits par du phénol/chloroforme puis précipités. Les ADNc lavés et repris dans l'eau milli Q sont ensuite testés par PCR. On utilise également la SOD pour cela et on est capable d'observer en gel d'agarose la différence de taille entre la SOD amplifiée à partir d'ADNc qui est une bande d'ADN de 200pb et celle amplifiée à partir d'ADNg contaminant.

3. **Extraction de l'ADN génomique des tachyzoïtes**

L'ADN génomique (ADNg) des parasites est extrait à l'aide du kit commercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Le culot de parasites purifié est repris par la solution de lyse (EDTA/Nuclei Lysis solution), et 1 µL d'une solution de RNase, puis incubé à 37°C pendant 20 minutes. Une fois revenu à température ambiante, la solution de précipitation des protéines est ajoutée. Puis le mélange est agité par un Vortex et incubé dans la glace pendant 5 minutes. Ce précipitât est centrifugé à 14000g pendant 10 minutes. Le surnageant est transféré dans un tube contenant de l'isopropanol afin de précipiter l'ADNg. Après une précipitation d'une heure à -20°C, l'ADN génomique est centrifugé pendant 30 minutes à 4°C à 13000g. Le culot d'ADNg est ensuite lavé par de l'éthanol 80% puis centrifugé à nouveau pendant 20 minutes à 13000g. L'ADNg est séché, repris dans de l'eau milli Q et solubilisé pendant 15 minutes à 65°C avant une conservation à -20°C.

4. **Construction des plasmides**

a. **Sous-clonages dans le plasmide pMAH14**

- Amplification des inserts

Les amplifications par PCR sont réalisées grâce au kit Phusion Enzyme (Fermentas) contenant une ADN polymérase de haute fidélité. Le plasmide pMAH14 est un vecteur d'expression de *T. gondii* contenant 920 paires de bases (pb) d'un promoteur du gène GRA1 et 389 bp de la région 3' non traduite du gène SAG1 (Saksouk et al., 2005). Les inserts correspondent donc à la séquence codante d'une protéine d'intérêt (ORFs, Open Reading Frame). Le mélange comprend : 100 -200 ng d'ADNc, utilisé comme matrice, 10 µl du tampon de réaction fourni et 1 unité d'enzyme pour un volume final de PCR de 50 µL. Les amorces synthétisées (par la société Sigma-Aldrich) sont reprises dans de l'eau mQ à une concentration de 100 µM, puis diluées à la concentration finale de 1 µM. Dans certains cas,

3 % de DMSO sont également ajoutés. Les amorces utilisées sont indiquées pour chaque clonage dans le tableau ci-dessus (tableau 2).

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- 98°C pendant 3 min
- 98°C pendant 15 sec
- température d'hybridation (TM)
spécifique des amorces (entre 58 et 63°C), 15 sec- 72°C 30 secondes/kb
- et une élongation finale :
 - 72°C pendant 10 min



35 cycles

Après la PCR, le 1/10 des échantillons est déposé dans un gel d'agarose 1% en TAE (Tris 40 mM ; acétate 40 mM ; EDTA 1 mM, pH 8) contenant du BET. Après électrophorèse, l'ADN amplifié par PCR est purifié grâce au kit d'extraction d'ADN Nucleospin Extract II (Machery-Nagel). Si un degré de pureté supérieure est requis, la totalité du volume de PCR est déposée puis la bande attendue est découpée et l'ADN soumis à extraction avec le même kit. Les ORFs des différents gènes clonés au cours de ce travail ont été amplifiés à partir d'ADNc de tachyzoïtes de 76K (type II).

- Digestion des inserts et du vecteur pMAH14

Ce vecteur de clonage dérive d'un plasmide pBluescript SK- avec une cassette de résistance à l'ampicilline, le promoteur TgGRA1 comme indiqué précédemment et qui a été cloné entre les sites de restriction SacI et BamHI, une étiquette HA-FLAG (HA pour HemAgglutinine) entre les sites EcoRI et BglII, et enfin une partie de la séquence 3' du gène de TgSag1 entre les sites BglII et KpnI. Nous avons modifié ce plasmide pMAH14 en y introduisant la séquence codant une GFP. La GFP a été amplifiée par PCR puis introduite grâce aux enzymes EcoRI et BglII en remplacement de l'épitope HA-FLAG. Au cours de ce travail, nous avons choisi d'étiqueter les ORFs d'intérêts du côté 3'(C-terminal de la protéine).

Le plasmide pMAH14 a été utilisé pour sous-cloner TgSORTLR mais aussi les versions tronquées de TgSORTLR (TgSORTLR-ΔCt, TgSORTLR-ΔNt) et l'ORF de Vps26. Dans le tableau ci-dessous (tableau 3) figurent les enzymes de restriction utilisées pour chaque clonage dans le pMAH14.

Tableau 3. Sites de restrictions utilisés pour les clonages dans le plasmide pMAH14	
<u>Insert cloné</u>	<u>Enzymes utilisées</u>
TgSORTLR	BamHI/EcoRI
TgSORTLR-ΔCt	BamHI/EcoRI
TgSORTLR-ΔNt	BamHI/EcoRI
vps26	BamHI/EcoRI

La partie N-terminale a été amplifiée par PCR avec un couple d'amorce allant du signal peptidique ou «peptide signal» (PS) à la fin de la région transmembranaire (TM). L'insert a été inséré dans le pMAH14 en fusion avec la GFP ou l'étiquette HA. Les vecteurs pMAH14- TgSORTLR-ΔNt -GFP/HA ont été obtenus en deux étapes. Tout d'abord, le sous-clonage de l'insert TgSORTLR-ΔNt (allant de 20 nucléotides en amont du TM à la fin de l'ORF) et l'ajout du peptide signal en 5' de la séquence clonée.

- Déphosphorylation des plasmides digérés

Après digestion enzymatique, les plasmides sont purifiés puis déphosphorylés pendant minimum 15 min à 37°C avec 5 µL de tampon 10X FastAP et 1 µL d'enzyme FastAP (Fermentas), dans un volume total de 50 µL. La phosphatase alcaline est ensuite inactivée en incubant la réaction 10 min à 70°C. Les plasmides ainsi déphosphorylés sont ensuite purifiés par colonne avec le kit Macherey-Nagel.

- Ligation des plasmides pMAH14 préparés avec les inserts

Les échantillons, plasmides et inserts, digérés et purifiés sont dosés au NanoView. Toutes les ligations sont réalisées avec un rapport insert/plasmide compris entre 3/1 et 6/1 avec pour référence 50 ng d'ADN plasmidique. Les réactions se font dans un volume final de 20 µL, avec 2 µL du tampon de ligation et 0,5 µL d'enzyme T4 DNA ligase (Fermentas), avec une incubation à 22°C pendant 10 min.

- Transformation des bactéries compétentes Top10F'

Les bactéries *Escherichia coli* Top10F' compétentes par choc thermique après un traitement au chlorure de rubidium sont utilisées. Cinq µL de la ligation contenant le mélange de plasmide et insert

avec 50 μL de bactéries compétentes sont incubés dans la glace pendant 30 min. Un choc thermique de 45 secondes à 37°C est réalisé, puis les bactéries sont remises immédiatement sur la glace pendant 2 min. Après ajout de 250 μl de LB (Luria-Bertani, Tryptone 1% , extrait de levure 0,5% , NaCl 1%), les bactéries sont incubées 1H à 37° et sont étalées sur un milieu sélectif, LB agar complémenté en ampicilline, à 37°C sur la nuit.

- Criblage des colonies par PCR

Les colonies formées sur les boîtes de Pétri sont criblées par PCR afin de vérifier la présence des inserts. En effet, les colonies résistantes à l'ampicilline sont repiquées sur le même milieu sélectif et le reste de la colonie est rincé directement dans le tube de PCR contenant le mélange de réaction. Ce mélange contient 2,5 μL de 10X DreamTaq™ Green Buffer, 0,2 mM de dNTP, 0,1 μL de DreamTaq™DNA Polymerase (Fermentas) puis 1 μM de chaque amorce sont ajoutés puis le mélange est complété avec de l'eau milli Q pour un volume final de 25 μL .

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- 95°C pendant 5 min

- 95°C pendant 30 sec

- TM pendant 30 sec

- 72°C 1min/kb

- 72°C pendant 10 min



30 cycles

La totalité des produits de PCR est déposée, séparée et analysée dans un gel d'agarose 1% contenant du BET. Les colonies positives sont inoculées en culture liquide dans 5 mL de milieu de culture LB ampicilline à 37°C sur la nuit.

- Extraction plasmidique et validation des plasmides

Les plasmides mis en culture sur la nuit sont extraits avec le kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel) ou par une extraction par chauffage comme suit : le culot bactérien est soumis à l'action du lysozyme 25mg/ml, puis du tampon de lyse (8% sucrose, 20 mM Tris.HCL pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 0,5% Triton X100) est ajouté. Après une incubation à 100°C pendant 45 secondes, le surnageant est précipité

avec 0,3M d'acétate de sodium et d'isopropanol. Afin de confirmer la présence de l'insert dans le plasmide, des digestions par différentes enzymes de restriction sont réalisées. Soit avec les enzymes utilisées pour cloner ces inserts, soit en utilisant une enzyme présente à l'intérieur de l'insert. Les ADN extraits de trois clones positifs distincts sont alors séquencés (Société Genoscreen, Institut Pasteur de Lille) afin de vérifier l'exactitude des inserts clonés dans la banque de données www.toxodb.org. Un aliquot de la culture bactérienne est congelé à -20°C en présence d'une concentration finale de 25% glycérol.

c. **Sous-clonage dans le vecteur pGex pour la production de protéines recombinantes**

Le plasmide pGex-6P3-GST (Pharmacia) a été utilisé pour l'expression de protéines recombinantes chez *E.coli*. Ce plasmide permet de sous-cloner la séquence d'intérêt en phase avec la séquence de la GST et donc d'obtenir une protéine fusionnée, en position N-terminale avec la GST. Les fragments d'ADN correspondant aux différentes protéines ont été amplifiés grâce aux amorces décrites dans le tableau 2. La protéine recombinante rSORT₃₇₋₇₁₄ correspond à la boucle extra-membranaire allant de l'acide aminé 37 à 714 de TgSORTLR. Cette protéine rSORT₃₇₋₇₁₄ couplée à la GST sert aux immunisations des souris afin d'obtenir les anticorps polyclonaux spécifiques contre TgSORTLR (production de la protéine recombinante et obtention de l'anticorps décrit dans le paragraphe IV.3 et 4). La protéine recombinante rSORT₃₇₋₇₈₉ correspond à la partie de TgSORTLR allant de l'acide aminé 37 à 789 c'est-à-dire de la fin du peptide signal jusqu'au domaine transmembranaire couvrant ainsi l'entièreté du domaine N-terminal. La protéine recombinante rSORT₈₀₈₋₉₆₂ contient l'entièreté du domaine C-terminal de TgSORTLR. Les trois dernières constructions rΔ1SORT₃₇₋₇₈₉, rΔ2SORT₄₄₆₋₇₈₉, rΔ3SORT₇₃₆₋₇₈₉ constituent des protéines mutantes au niveau du domaine N-terminal où les délétions respectives des domaines B à D, B à H, et B à 10CCb de TgSORTLR (voir ces domaines dans la Figure 1 de l'article et dans les figures 1,2 et 4 des résultats) ont été réalisées. Tous les clonages ont été réalisés avec les enzymes BamHI et EcoRI.

d. **Sous-clonage dans le plasmide pTetO7Sag1 pour l'intégration ectopique de TgSORTLR**

Le plasmide utilisé est le pT7S1 pour pTetO7Sag1 (Meissner et al., 2002). Pour réaliser l'intégration aléatoire d'une seconde copie de TgSORTLR étiquetée avec l'épitope c-myc, nous avons procédé à

deux sous-clonages successifs. Le premier clonage a permis d'insérer une copie de TgSORTLR avec les enzymes EcoRI/PacI. L'amplification par PCR de l'ADNc correspondant permet également d'y ajouter l'étiquette c-myc dont les nucléotides codant sont présent dans l'amorce antisens (tableau 2). Le second sous-clonage consiste à introduire la cassette de sélection Tub5-Bléo-Sag1 (promoteur Tubuline, gène de résistance à la bléomycine et la séquence 3'UTR du gène Sag1) avec l'enzyme KpnI.

e. Sous-clonages dans le vecteur pLIC-HA-DHFR pour les stratégies de « Knock-In »

Le plasmide pLIC-HA-DHFR (Huynh et Carruthers, 2009) et les inserts d'ADN génomique correspondant à 1 à 4 kb en amont du codon STOP pour chaque gène d'intérêt amplifié par PCR ont été utilisés. Les séquences sont choisies avec un site de restriction unique qui est absent du plasmide, ce qui permet la linéarisation en vue de l'intégration dans le génome parasite (voir le tableau 4). Environ 500 pb (paires de bases) sont nécessaires en amont de ce site de restriction dans les inserts. Les amorces utilisées (voir tableau 2) comportent à la fois la séquence spécifique de la région à amplifier mais aussi une séquence permettant d'utiliser le système LIC (Ligase Independent Cloning). Le plasmide est linéarisé par PacI. Inserts et plasmide sont alors traités par la T4 DNA Polymerase. Pour le plasmide, cette réaction est réalisée avec 7,5 U d'enzyme T4 DNA Polymerase (Fermentas) pour environ 1,5 µg d'ADN, 5mM DTT, 4mM dGTP (volume final 60 µl). Pour l'insert, le mélange comporte 5mM DTT, 4mM dCTP, 2,5 U d'enzyme, 0,2pmol d'insert (volume final 20µl). Ces réactions se déroulent à 22°C pendant 30 min puis l'enzyme est désactivée à 75°C pendant 20 min, ce qui génère des bouts protubérants compatibles entre l'insert et le plasmide. Un µl de vecteur est alors incubé avec 2 µl d'insert pendant 10 min à température ambiante. Après l'ajout de 1µl d'EDTA, 25 mM et 5 min à température ambiante, 1µl du volume de réaction est utilisé pour transformer les cellules compétentes. Les colonies sont criblées par PCR puis par digestion sur le plasmide purifié. L'enzyme utilisé pour le criblage correspond à celle qui a servi à digérer le plasmide afin de le rendre linéaire avant la transfection (spécifique de l'insert, voir le tableau 4 ci-dessous).

Tableau 4. Enzymes de restrictions utilisées pour la linéarisation des différentes constructions « Knock-In »

Gène ciblé	Taille de l'insert amplifié (pb)	Enzyme de linéarisation utilisée
------------	----------------------------------	----------------------------------

Sec23	2153	SnaBI
Vps9	4053	BstBI
Vps26	2113	EcoRV
Vps35	4004	EcoRV
μ 1-adaptine	2613	SnaBI
HP20	1579	EcoRV

f. Sous-clonages dans le plasmide p5'/3'UPRT (pUPRT) pour les expériences de complémentations

Le plasmide pURRT est un vecteur contenant deux fragments de 1kb, 5' et 3' qui correspondent respectivement aux séquences flanquantes du gène parasite UPRT pour « Uracil PhosphoRibosyl Transferase ». Ainsi, l'ADN inséré entre ces fragments dans le plasmide sera intégré dans le génome du parasite en lieu et place du gène UPRT par double recombinaison homologue. Le gène UPRT code une enzyme non-essentielle impliquée dans la voie de récupération de nucléotides (UMP) à partir de la cellule hôte et peut donc être utilisé comme un marqueur sélectif négatif. En effet, le parasite est capable de synthétiser de novo ses propres métabolites (Donald et Roos, 1995) Le plasmide permet de cibler cette région génique et la suppression allélique du gène UPRT va également conférer la résistance au FUDR (5'-fluoro-2'-deoxyuridine) (Donald et Roos, 1995). Afin de construire, les vecteurs pour les expériences de complémentations dans le parasite mutant iKOSORT, deux à trois étapes de clonage successifs ont été nécessaires. La première étape consiste à introduire la région promotrice de la sortiline de 1700 pb en amont du codon d'initiation (ATG) qui a été amplifié par PCR à partir d'ADN génomique de la souche de type I avec les amorces indiquées dans le tableau 2. Les enzymes utilisées pour le clonage sont HpaI et NotI. Ensuite, trois inserts portants respectivement l'entièreté de TgSORTLR (SORT-FL, TgSORTLR Full Length) ou les versions tronquées Δ 1SORT₂₀₂₋₉₆₂ et Δ 2SORT₄₄₆₋₉₆₂ ont été amplifiés et sous-clonés dans le plasmide par les enzymes NotI et PmeI. Dans les trois cas, l'ADN matrice utilisé pour l'amplification est le pMAH14-TgSORTLR-HA et la sortiline entière est ainsi étiquetée avec un peptide HA- FLAG puis suivie de la région 3'UTR du gène SAG1. Pour les versions tronquées de TgSORTLR, Δ 1SORT₂₀₂₋₉₆₂ et Δ 2SORT₄₄₆₋₉₆₂, une dernière étape de sous-clonage a permis d'insérer le signal peptidique de 36

acides aminés nécessaires pour l'adressage correcte dans le réticulum endoplasmique du parasite. Les amorces « ORFSortilin_NotI_F et PS_SORT_NotI_R » ont été utilisées puis la séquence a été introduite à l'aide d'une enzyme de restriction NotI. Lors du criblage des clones, l'orientation du signal peptidique a alors été vérifiée par PCR puis par séquençage.

g. Sous-Clonage dans le plasmide pG13-D-T7S4 (pDTS4)

Le plasmide pDTS4 (Sheiner et al., 2011) comporte une cassette de résistance à la pyriméthamine (DHFR-TS) ainsi que le promoteur parasitaire de TgSag4 sous le contrôle d'une séquence répétée « TetO7 » qui confère l'induction par l'ATc. En effet, deux fragments sont clonés de part et d'autre dans ce vecteur pour permettre le ciblage du gène TgSORTLR et le contrôle par le promoteur inducible TetO7-Sag4. Le premier fragment qui correspond à 2kb de TgSORTLR à partir de l'ATG (inclus) est inséré en aval du promoteur TetO7-Sag4 par les enzymes BgIII/AvrII. Le second fragment qui correspond au 2kb précédant l'ATG de TgSORTLR est inséré dans le plasmide en amont de la cassette DHFR-TS avec les enzymes BgIII/AvrII.

III. Biologie cellulaire

1. Transfection transitoire des tachyzoïtes de *T. gondii*

La transfection transitoire de tachyzoïtes consiste à l'électroporation de 5 millions parasites par des quantités relativement importantes, entre 20-100 µg, d'ADN plasmidique. Cette technique permet d'observer une protéine dont la séquence est portée par un vecteur d'expression parasitaire comme le pMAH14. Cette quantité de plasmide est obtenue par extraction plasmidique sur une culture liquide LB de 200mL de bactéries, grâce au kit Nucleobon Xtra Midi (Macherey-Nagel). Les parasites sont purifiés puis lavés à deux reprises dans le cytomix, c'est-à-dire le tampon de transfection [120mM KCL ; 10mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,4 ; 25mM Hepes pH 7,6 ; 2mM EGTA pH 7,6 ; 5mM MgCl₂ ; 0,15mM CaCl₂ ; pH ajusté à 7,6 avec du KOH]. Les parasites sont ensuite comptés sur cellule de Malassez et repris par le volume adéquat dans du cytomix complété par 2mM final d'ATP et 5mM final de glutathion. L'ADN et 400 µl de parasites sont alors disposés dans la cuvette d'électroporation de 2mm (Eurogentec). L'électroporation est effectuée dans un électroporateur BTX Electro Cell Manipulator

600, réglé sur un voltage de 1,5kV.cm⁻¹, une capacitance de 25µF et résistance de 24Ω. Les parasites transfectés sont déposés sur des lamelles de verres contenant des cellules HFF confluentes. La croissance des parasites intracellulaire est alors arrêtée, généralement 24h post-infection, par une fixation avec une solution contenant 4% de paraformaldéhyde. Les parasites ainsi fixés sont alors analysés par de l'immunofluorescence indirecte ou IFA (voir paragraphe IV.4.).

2. **Obtention de lignées stables de parasites mutants**

a. **Obtention des parasites stables résistant à la bléomycine exprimant une copie hétérologue de TgSORTLR**

Des tachyzoïtes (10⁷ parasites) de la souche RH sont transfectés par 100 µg de plasmide pT7S1-SORT-myc linéaire suite à une digestion avec BamHI. Pour cette lignée de parasites stables, la stratégie dite REMI (Restriction-Enzyme Mediated Integration) a été utilisée selon le protocole décrit par Black et al., (Black et al., 1995). Lors de la transfection, 20 U d'enzyme BamHI ont été introduit dans la cuvette d'électroporation dans le but d'augmenter l'efficacité d'intégration du plasmide. Les transfectants sont ensuite déposés sur un tapis de cellule HFF confluentes en boîte de 25 cm². Le milieu est changé 4h p.i (post-infection). 48h à 72h après la transfection, les parasites sont purifiés. Après centrifugation à 400g pendant 15 min à 4°C, le culot parasitaire est alors repris par du DMEM incomplet supplémenté en Hepes 10mM, et 5 µg/mL de phléomycine. Les parasites extracellulaires sont alors incubés pendant 10 h à 37°C. Après la sélection, les parasites sont inoculés sur un nouveau tapis de cellules HFF confluentes. Le milieu de culture est changé 6 h p.i par du milieu complet supplémenté de 5µg/ml de phléomycine. Une seconde sélection en extracellulaire en présence de phléomycine est nécessaire. En effet, une partie des parasites de la première sélection est vérifiée pour l'expression de la protéine transgénique par IFA et l'autre partie mise en culture pendant 48 à 72h sera sélectionnée une seconde fois en présence de la même concentration de phléomycine. Les parasites résistants sont testés par fluorescence puis clonés par dilution limite en plaques 96 puits jusqu'à obtenir un parasite par puits. Après 5-6 jours d'infection, les plaques de 96 puits sont criblées. Plusieurs clones sont alors testés par IFA avec l'anticorps anti-myc. Les clones choisis sont alors amplifiés puis cultivés *in vitro* comme décrit précédemment. Plusieurs lots des

souches parasitaires stables sont resuspendus par 90% de SVF et 10% de DMSO 10% puis congelés à -80°C dans des cryotubes (1,5 ml) avant d'être stockés dans l'azote liquide.

b. Obtention des parasites iKO-TgSORTLR

Des tachyzoïtes (10 millions) sont purifiés puis électroporés en présence de 50µg d'ADN linéaire du plasmide pDTS4 (pDHFR-TS-TetO7-Sag4)-5'SORT-3'SORT. La linéarisation du plasmide par Apal est contrôlée dans un gel d'agarose. L'ADN est extrait par du phénol/chloroforme (2 phenol vol/vol, 1 chloroforme vol/vol) puis précipité par de l'éthanol 100% (2,5 fois le volume en présence de 0,3M NaCl). Après un lavage à l'éthanol 70%, le culot d'ADN est resuspendu directement avec du cytomix. Après la transfection, 2µM de pyriméthamine (Sigma) sont ajoutés au milieu de culture. La pression sélective est gardée durant 5 à 7 jours jusqu'à l'émergence d'une population résistante. Les parasites transgéniques (iKO-SORT) ainsi obtenus posséderont le promoteur inductible TetO7Sag4 (sensible à l'ATc) intégré juste devant le codon d'initiation du gène endogène TgSORTLR en lieu et place du promoteur endogène de TgSORTLR. Ainsi, l'expression de TgSORTLR peut-être contrôlée par l'ajout d'ATc dans le milieu de culture conduisant à l'extinction du gène TgSORTLR.

c. Obtention des parasites complémentés

Des parasites iKO-TgSORTLR (10 millions) sont transfectés avec 50µg des plasmides pUPRT-SORTFL, pUPRT-Δ1SORT₂₀₂₋₉₆₂, pUPRT-Δ2SORT₄₄₆₋₉₆₂. 5µM de FUDR sont ajoutés au milieu de culture 24h après la transfection. La sélection est alors maintenue pendant 6 à 8 jours jusqu'à l'émergence d'une population résistante. Les parasites sont alors clonés en plaques 96 puits comme décrit précédemment puis testés par IFA en utilisant un anticorps monoclonal anti-HA de rat (anti-HA monoclonal de rat 3F10, Roche) au 1/500.

d. Obtention des parasites Knock-in

Des parasites RHΔKu80 (10 millions) sont électroporés avec 10 à 25 µg d'ADN linéaire de plasmides pLic-DHFR-Vps26-HA, pLic-DHFR-Vps9-HA, pLic-DHFR-Vps35-HA, pLic-DHFR-Sec23-HA, pLic-DHFR-µ1adaptine-HA ou pLic-DHFR-HP20-HA. La sélection avec 2 µM µg/ml de pyriméthamine se

déroule comme décrit en III.2.b.et les clones sont obtenus par dilution limite et criblés par IFA en utilisant l'anticorps polyclonal de lapin ou souris anti-HA (Invitrogen) à une dilution au 1/500.

3. Préparation des parasites pour des observations ultrastructurales en microscopie électronique

Des tachyzoïtes (10 à 40 millions) sont utilisés afin d'infecter une boîte de culture de 75 cm² contenant des HFF confluentes. Le milieu complet est renouvelé 4h post-infection. Après 18h à 72h pi, les HFF infectés sont lavés une fois par du PBS et directement fixés avec du PAF 8% complété de 0,01% de glutaraldéhyde pour des observations immuno-ultrastructurales. Nous avons également fixé les cultures de parasites avec du 2,5% glutaraldéhyde et 0,1M cacodylate pour des observations morphologiques directes en microscopie électronique. Les marquages et les images de microscopies électroniques ont été réalisés par le Dr Christian Slomianny (Laboratoire de physiologie cellulaire, Inserm U1003, Univ. Lille Nord de France, Villeneuve d'Ascq, France).

4. Immunofluorescence indirecte avec les parasites intracellulaires

Les cellules confluentes sur des lamelles en verre sont infectées par des tachyzoïtes de manière générale (sauf explicitement décrit) pendant 20 à 24h. Les parasites intracellulaires sont fixés au paraformaldéhyde 4% pendant 15-30 min à température ambiante. Les lamelles sont ensuite lavées par du DPBS. Les cellules HFF et les parasites perméabilisés par du PBS-Triton X100 0,2% en présence de 0,1M de glycine (blocage du PAF) pendant 30 min. Les lamelles sont ensuite saturées par du PBS-Triton X100 0,1% et 10% de SVF durant 30 minutes. Toutes les incubations se font à 37°C. Quatre lavages sont réalisés au DPBS entre chaque anticorps et avant le montage sur lame de verre. Les anticorps sont incubés dans un tampon PBS Triton X100 0,1%, SVF 5% pendant 30-60 min. Dans ce travail divers anticorps secondaires de lapin, de chèvre ou d'âne, anti IgG de souris, anti-lapin ou anti-rat ont été utilisés. Ces anticorps sont couplés à l'Alexa Fluor 594, à l'Alexa Fluor 488 ou l'Alexa Fluor 633 nm (8 µg/ml, Invitrogen). Pour ces derniers, les incubations sont faites en présence de bleu Evans et de DAPI durant 30-45 min. Les lamelles sont montées avec du mowiol puis observées au microscope confocal LSM 170 (ZEISS).

5. Tests phénotypiques *in vitro*

a. Réplication et développement intracellulaires des parasites mesurés par la formation de plages de lyses

Tous les tests ont été effectués en triplicata avec les parasites mutants RHTaTi-iKOSORT et le parasite RHTaTi (contrôle) avec ou sans ATc puis de la même manière pour les mutants complémentés iKO+SORTFL, iKO+ Δ 1SORT ; iKO+ Δ 2SORT.

Les expériences de plage de lyse «ou « plaque assays » ont été effectués dans des chambres d'incubation Labtek à 8 puits. Cent parasites purifiés sont utilisés pour infecter les fibroblastes confluents dans un milieu de culture contenant ou dépourvu d'ATc (1 μ g/ml). Les plaques ou lamelles contenant les HFF infectées sont incubés de manière statique pendant 7 jours sans être déplacés ou observés. La formation des plages de lyse qui en découle est le résultat d'infections se traduisant par des successions d'invasions, lyses et réinvasion des cellules HFF. Les tapis cellulaires infectés sont fixées avec du Méthanol froid (-20°C) pendant 5 min puis marquées au Crystal violet (Sigma). La poudre de Crystal violet est reprise dans l'éthanol et est utilisée pour colorer les tapis cellulaires infectés pendant 1 min afin d'observer les plages de lyses. Ces expériences de plages de lyses indépendantes ont été réalisées 3 fois.

b. La mesure de la motilité parasitaire ou « Gliding »

Les parasites traités ou non avec l'ATc (1 μ g/ml) durant 48h sont libérés mécaniquement des cellules par 6 passages successifs à travers des seringues de 17 et 27G. Ils sont ensuite filtrés et centrifugés à 1000 rpm pendant 10 min à température ambiante. Les culots sont repris dans du milieu de culture DMEM incomplet contenant 10 mM Hepes et 1 mM EGTA. Les parasites (5.10⁶ tachyzoïtes) sont déposés sur des lamelles de verre rondes (diamètre 1 cm) préalablement incubées une nuit avec du SVF 50%(dans du PBS) et 10 min a 37°C dans une étuve à CO₂. Les lamelles infectées sont ensuite incubées 15-20 min à 37°C sous CO₂ puis fixées au PAF 4%. Ensuite, la motilité des parasites est visualisée par des traces linéaires et circulaires (Fauquenoy et al., 2008 ; Fauquenoy et al.,2011)

laissés sur les lamelles de verre et qui contiennent des antigènes majeurs de surface (SAGs) détectés par IFA en utilisant, par exemple, l'anticorps monoclonal spécifique anti-SAG1 dilué au 1/50.

c. L'entrée des cellules hôtes par les parasites ou Invasion

Après 48h de traitement ATc (1µg/ml), 250 000 parasites sont utilisés pour infecter les lamelles de verre recouverte de cellules HFFs. Après 24h post-infection, les lamelles sont fixées avec du PAF 4%. Les parasites intracellulaires sont visualisés et détectés par IFA en utilisant l'anticorps monoclonal anti-SAG1 utilisé au 1/100 et par une coloration des noyaux cellulaires et parasitaires par du DAPI dilué au 1/500. Ensuite, un comptage des parasites intracellulaires a été effectué sur 500 à 600 cellules infectées en triplicata et ces expériences ont été réalisées indépendamment en trois reprises. Les images pour le comptage ont été prises en utilisant le procédé de prise d'image MozaiX du microscope Zeiss.

d. Mesure de la sortie des parasites intracellulaires ou échappement (« Egress »)

Les parasites intracellulaires ont été cultivés dans cellules HFF sur des lamelles de verre pendant 40h avec ou sans ATc. L'échappement est induit par l'utilisation de 4µM d'Ionophore de calcium A23187 (Sigma) à 37°C (ajouté dans le milieu de culture sans rouge de phénol). Les vidéos ont été enregistrées avec le microscope AxioObserver Z1 de Zeiss (Olguin-Lamas et al, 2011).

6. Etudes *in vivo* d'infection dans un modèle de toxoplasmose murin

Quatre groupes de souris Balb/C femelles de 6 à 8 semaines ont été injectées dans la cavité péritonéale pour étudier les phénotypes des mutants qui ont été comparés avec les parasites sauvages. Un premier groupe de souris a été infecté avec les mutants pour des doses allant de 5×10^3 à 2×10^6 parasites iKOSORT. Un second groupe de souris est infecté de la même manière mais l'eau de boisson a été remplacée par un mélange eau, 5% sucrose, ATc 0,2 mg/ml pendant 10 à 15 jours, ce qui permet la déplétion complète de TgSORTLR dans les parasites mutants. Les deux autres groupes de souris sont des contrôles où la souche parasitaire utilisée est la lignée parentale RHTaTiΔKu80. Les deux groupes de souris sont injectés avec 5×10^3 à $2,5 \times 10^4$ parasites et sont mis en présence ou non d'ATc. Ces expériences *in vivo* ont été répétées au moins trois fois.

IV. Biochimie

1. Électrophorèse en gel d'acrylamide

Les gels de polyacrylamide sont préparés selon la méthode de Laemmli. Le gel inférieur (séparation) contient 8 à 12% d'acrylamide (acrylamide/bisacrylamide, 29/1), du tampon Tris-HCl 375 mM pH 8,8, du SDS 0,01% , du Persulfate d'Ammonium (APS) 0,5% et du Temed 0,05%). Le gel supérieur (concentration) est de 5% d'acrylamide (acrylamide/bisacrylamide, 29/1, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,01%, APS 0,75%, Temed 0,075%). Les protéines et les extraits parasitaires sont analysés en SDS-PAGE dans du tampon de reprise [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2% (p/v) ; saccharose 10% (p/v) ; bleu de bromophenol 0,2% (p/v)]. Sous conditions réductrices, du DTT (DiThioThréitol) est ajouté à 0,1M de concentration finale. Avant les dépôts dans le gel d'acrylamide, les échantillons sont chauffés pendant 5 min à 100°C, puis centrifugés pendant 5 min à 13000g. Les mini-gels d'acrylamide sont coulés entre une plaque d'alumine et une plaque de verre puis introduit dans le système Mighty Small SE250 (Hoefer).

Des grands gels préparatifs d'acrylamide de concentrations 10-15 % sont coulés entre deux plaques de verre pour les expériences de protéomique. Ces plaques de verre ainsi que le système de montage sont préalablement lavés au SDS 5% sur la nuit puis rincés à l'eau milli Q et à l'alcool 70%. Les gels préparatifs de protéomique et les solutions nécessaires à leur composition sont réalisés sous PSM de manière à limiter la présence de contaminants comme la kératine.

La migration des gels d'acrylamide se déroule dans un tampon contenant 25 mM de HCl à pH 8,3, du SDS 0,1% et de 192 mM glycine.

2. Immuno-empreinte ou « Western-blot »

Les protéines du gel d'électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,2 µm (Hybond, Amersham Biosciences).

Le mini-gel est placé sur la membrane de nitrocellulose et inséré entre deux feuilles de papier Whatmann. L'ensemble est au préalable imprégné du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, glycine 190 mM, éthanol 20% , pH 8,3-8,5). Le transfert est réalisé dans le même tampon à un voltage de 80 V pendant 1 h.

Pour les grands gels d'acrylamide le transfert est exécuté dans des conditions semi-sèches dans du tampon Tris-HCl 25 mM, glycine 250 mM et éthanol 15%. Le gel est alors placé contre la membrane de nitrocellulose entre six feuilles de papier Whatmann. Ce transfert est effectué à raison de 1,1 mA/cm² pendant 1 h.

La membrane est ensuite colorée au rouge Ponceau (rouge Ponceau 0,2%, acide trichloracétique 3%), puis saturée pendant 30 min par du TNT (Tris-HCl 15 mM pH 8, NaCl 140 mM, Tween-20 0,05%) contenant 5% de lait écrémé (Regilait™). Les anticorps primaires monoclonaux ou polyclonaux sont alors incubés sur la membrane dans le TNT-lait 5% pendant 1h à température ambiante. Après trois lavages de 10 min au TNT, les anticorps secondaires anti-IgG de souris, de lapin (au 1/10000) ou de rat (au 1/2000), couplés à la peroxydase (Sigma) sont ajoutés dans du TNT-lait et incubés pendant 1h. Après trois lavages de 10 min, de l'ECL Plus (Enhanced ChemiLuminescence Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) est déposé sur la membrane durant 5 min avant la révélation.

3. Production de la protéine recombinante rSORT₃₇₋₇₁₄

Nous avons transformé des bactéries BL21 avec le plasmide pGEX-rSORT37-714. Après, la transformation, une pré-culture en LB complémenté de 100µg/ml d'ampicilline est réalisée sur la nuit à 37°C. Le lendemain, 10 ml de pré-culture sont utilisés pour ensemercer 1 litre de LB-ampicilline à 37°C jusqu'à DO=0,6. Ensuite, un ajout de 0,5 mM d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) est effectué afin d'induire la synthèse de la protéine recombinante sur la nuit à température ambiante. Une fraction aliquote de bactéries non induites et induites est déposée dans un gel d'acrylamide 12% qui est coloré ensuite au bleu de Coomassie afin de vérifier l'induction effective de la protéine d'intérêt. Le reste de la culture est centrifugé à 5000g pendant 15 minutes. Les culots sont congelés à -20°C et après décongélation sur de la glace et suspension avec 5ml de PBS (NaCl 1,4M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 101 mM, KH₂PO₄ 18 mM, pH 7,3) contenant 1mg/ml de lysozyme, pendant une demie heure, l'ensemble est soumis à plusieurs cycles de sonication (6 impulsions de 10 sec puis 5 impulsions de 15 sec et enfin 4 impulsions de 30 secondes). Un ajout d'une solution à 1% de Triton X-100 est alors effectué puis l'ensemble est incubé pendant 30 minutes dans la glace. Après une centrifugation de 30 minutes à 13000g à 4°C, une fraction aliquote du surnageant et du culot repris par du SDS 2% est analysée par électrophorèse en gel d'acrylamide.

4. Purification de la protéine recombinante rSORT₃₇₋₇₁₄ par électro-élution

La protéine recombinante rSORT₃₇₋₇₁₄ est insoluble, et est donc retrouvée dans le culot bactérien qui est alors repris par du tampon d'électrophorèse ou de reprise : 62,5mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2%, glycérol 10% , β -mercaptoéthanol 0,02% , bleu de bromophénol 0,0001%) puis chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Après une centrifugation à 13000g pendant 5 minutes, le surnageant contenant la sortiline recombinante est déposé dans un grand gel d'acrylamide SDS-PAGE de 10%. Ensuite, 5,14g de CuCl₂ repris dans 100ml d'eau milli Q sont utilisés pour colorer les protéines contenues dans le gel. Après 5 minutes d'incubation, et plusieurs rinçages à l'eau milli Q, la bande d'intérêt (environ 100kD) a été découpée. La décoloration du gel est réalisée sous agitation à l'aide d'un tampon Tris-HCl pH8, 0,25M EDTA. La sortiline recombinante est extraite du gel par électroélution dans un système Hoeffer à 3 Watt durant 3 heures. La purification de l'électroéluat a ensuite été vérifiée par SDS-PAGE. Le gel est alors coloré dans une solution de bleu de Coomassie R250 (Merck) [bleu de Coomassie 0,08%, acide acétique, isopropanol, eau (1/2,5/6,5 v/v)] puis décoloré par de l'acide acétique 10%, ce qui permet de visualiser les bandes protéiques.

5. Production d'anticorps polyclonaux anti-TgSORTLR

100 μ g de protéine recombinante rSORT₃₇₋₇₁₄ purifiée (estimation de pureté par gel d'acrylamide et dosage colorimétrique de Bradford) sont repris avec 100 μ l d'adjuvant de Freund complet (Sigma) puis injectés par voie intra-péritonéale aux souris BALB/C femelles de 6 à 8 semaines. Trois rappels avec la même quantité de protéine recombinante fois en présence d'adjuvant incomplet de Freund (Sigma) à 3 semaines d'intervalles ont été réalisés. Après la dernière injection, les sérums sont testés par immuno-empreinte et immunofluorescence indirecte.

6. Purification des IgG spécifiques anti-TgSORTLR

Les IgG spécifiques anti-TgSORTLR ont été purifiés sur une colonne de Sépharose 4B-CNBr sur lesquelles sont fixées de manière covalente les protéines rSORT₃₇₋₇₁₄ recombinantes. Pour réaliser cette colonne, 100 μ g de protéines rSORT₃₇₋₇₁₄ purifiées sont dialysées contre du tampon de couplage bicarbonate (0,1M bicarbonate de sodium + 0,5M NaCl à pH8) puis incubées sur les billes de Sépharose 4B-CNBr (GE Healthcare) durant 2 heures préalablement activées par 1mM d'HCl pendant 15 minutes.

Après 5 lavages des billes au PBS, les sérums anti-TgSORTLR (2 ml) sont ajoutés sur la colonne dans un volume de 7 ml de PBS durant toute la nuit à 4°C. Cinq lavages avec du PBS sont exécutés et les IgG sont élués deux fois successivement avec une solution de 0,1 M glycine/HCl pH 2,5 pendant 15 minutes à température ambiante. Les deux éluats sont regroupés et neutralisés avec du Tris 1M pH9 puis dialysés contre du PBS. 1mg/ml de BSA est rajouté à l'éluat avant la concentration et la dialyse des IgG purifiés. Le mélange est concentré par un système « Amicon ultra » (Millipore).

7. Production des protéines recombinantes portant les différentes versions tronquées de TgSORTLR

Toutes les protéines recombinantes rSORT37-789, rSORT202-789, rSORT446-789, rSORT736-789 fusionnées à la GST ont été produites chez *E. coli* BL21 et purifiées de manière similaire à la protéine rSORT₃₇₋₇₁₄-GST décrite ci-dessus. Après induction IPTG, les surnageants bactériens contenant les protéines recombinantes sont ensuite incubés sur les billes glutathione-Sépharose-4B (Pharmacia) sur la nuit à 4°C en présence d'inhibiteurs de protéases (Fermentas) et de PMSF à 1mM. Le lendemain, les billes sont lavées au PBS (NaCl 140 mM ; KCl 2,7 mM ; Na₂HPO₄ 10,1 mM ; KH₂PO₄ 1,8 mM ; pH 7,3) trois fois 10 minutes, puis une fois en présence de 0,5 M de NaCl avant un dernier lavage au PBS. Les protéines sont ensuite éluées par compétition avec du glutathion libre à 10mM à température ambiante (5 éluations par un volume équivalent à deux fois celui de la colonne). Les protéines sont alors concentrées et dialysées contre du PBS en Amicon ultra (Millipore).

8. Identification des partenaires de la sortiline par chromatographie d'affinité

a. Préparation de la colonne anti-TgSORTLR-Sépharose 4B

Une solution contenant 1,5 mL de sérum anti-TgSORTLR dans 7 mL de PBS est incubé avec un mélange contenant 1 mL (en volume-sec) de billes de sépharose 4B-protéine A et 100 µL de protéines G sur la nuit à 4°C. La colonne est lavée par du PBS puis éluee par 0,1M de glycine/HCL pH 2,5 contenant 0,5M NaCl pendant 20 minutes à température ambiante. L'éluat est neutralisé par du Tris-HCl pH 9 1M, concentré, dialysé contre du PBS puis couplé de manière covalente à un mélange contenant 2 ml de billes de sépharose-4B-CNBr préalablement activées par l'HCl (1mM).

b. « Cross-linking » des parasites et co-Immuno-précipitation des partenaires sur la colonne anti-TgSORTLR

Une quantité importante de trois milliards de tachyzoïtes sont purifiés puis lavés par un tampon KRP (12,5 mM Hepes, 120 mM NaCl, 6 mM KCl, 1,2mM MgSO₄, 1mM CaCl₂, 0,6 mM Na₂HPO₄, 0,4mM NaH₂PO₄, 2,5 mM D-glucose, pH 7,4). Le culot de parasite est ensuite repris par un volume défini de tampon KRP de manière à obtenir 1.10^9 parasites par ml de tampon KRP. Le dithiobis-succinimidyl propionate (DSP), c'est-à-dire l'agent pontant est ensuite ajouté à une concentration finale de 2 mM. Les parasites sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante avec le DSP. Ensuite, le blocage de la réaction est réalisé en ajoutant le même volume de tampon de « quenching » (Tris-HCl 50 mM, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, inhibiteurs de protéases, PMSF 1mM) que de tampon KRP et en incubant les parasites 15 minutes à 4°C. Après deux lavages avec le tampon de « quenching », les parasites sont lysés dans le même tampon contenant 1% de Triton X100 pendant 1 heure à 4°C. Après une centrifugation à 13000g pendant 30 minutes, le surnageant est incubé sur la colonne anti-TgSORTLR sur la nuit. La colonne est lavée plusieurs fois par le tampon de quenching avant l'élution à 4°C pendant 20 minutes par un tampon glycine-HCl (0,1 M glycine-HCl pH 2,5) contenant 0,01% de Triton X100. L'éluat est alors neutralisé par du Tris-HCl pH9 puis concentré. L'échantillon concentré est repris par du tampon de reprise SDS-PAGE avec 0,1M de DTT.

c. Coloration du gel au nitrate d'argent

Dans un premier temps, un mini-gel d'acrylamide analytique a été réalisé. Le gel est fixé dans une solution contenant 5% d'acide acétique, 30% d'éthanol, laissée sur la nuit. Ensuite nous avons mis le gel dans du thiosulfate 0,02% puis incubé celui-ci dans le bain de coloration (0.1% nitrate d'argent, 0.04% formaldéhyde) pendant 30 minutes. Le gel est ensuite révélé par une solution de 0.04% formaldéhyde, 2% sodium carbonate, 62,5µl de thiosulfate de Na 10% dans 500 ml final. La révélation est arrêtée par 500 mL d'une solution contenant 20g de Tris, 10 ml d'acide acétique. Afin d'identifier les partenaires de TgSORTLR par spectrométrie de masse, un grand gel préparatif d'acrylamide à 10% a été réalisé puis coloré de la même manière. Les bandes protéiques colorées ont été découpées puis incubées avec une solution de décoloration (50 mM sodium thiosulfate, 15 mM de potassium ferricyanure) avant une analyse protéomique (nano-LC-MS/MS, à l'IPHC de Strasbourg).

9. Purification des partenaires du domaine C-terminal de TgSORTLR par chromatographie d'affinité

a. Préparation des colonnes portant la protéine recombinante « GST-Cter-SORT »

La protéine rSORT₈₀₈₋₉₆₂ ou « Cter-SORT » est produite comme décrit précédemment mais une fois couplée via la GST aux billes de sépharose-4B-glutathion, la protéine n'est pas éluée. Une fraction de la colonne est déposée dans un gel d'acrylamide afin d'apprécier la pureté et de normaliser la colonne « Cter-SORT » par rapport à une colonne où les billes sont couplées à la GST seule et qui sera ensuite utilisée comme contrôle négatif lors de la chromatographie d'affinité. Les chromatographies d'affinité sont alors réalisées avec un volume de billes qui correspond à 200µg de protéines (« Cter-SORT » ou GST) pour chaque colonne.

b. Extraction du cytoplasme des parasites

« L'extraction cytoplasmique » réalisée est en fait un extrait protéique enrichi en protéines cytosoliques parasitaires et débarrassé de la majeure partie des protéines nucléaires. Le protocole mis au point chez *T. gondii* permet de séparer les protéines nucléaires des autres protéines contenues dans le cytosol ou dans d'autres organites que le noyau (Kibe et al., 2005). Après la purification de 4 milliards de tachyzoïtes et centrifugation, le culot parasitaire est repris par 4 ml de Tampon contenant : 10 mM Hepes pH 7,9 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 10 mM KCl ; 0,5 mM DTT ; 0,1 mM EDTA ; 0,65% NP40 ; 0,5 mM PMSF à 4°C. Après 20 min d'incubation dans la glace, les échantillons sont centrifugés à 1500 g pendant 10 min à 4°C et les noyaux des parasites sont présents dans le culot. Le surnageant contient alors les protéines cytoplasmiques et des protéines transmembranaires (grâce au détergent NP40)

c. Chromatographie d'affinité sur le domaine C-terminal de TgSORTLR

L'extrait cytoplasmique parasitaire est incubé sur les colonnes Cter-SORT-GST et GST seul (contrôle négatif) sur la nuit à 4°C, sous agitation rotative. Le lendemain, les billes sont lavées 5 fois avec du tampon Tris 10mM, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100 (tampon IP). Un dernier lavage rapide avec du Tris 62,5 mM pH 6,8 est réalisé avant l'éluion des complexes protéiques par du Tampon de reprise

contenant du DTT. Les échantillons ont ensuite été déposés dans un mini gel analytique puis dans un gel préparatif de 12% d'acrylamide/bis. Les bandes ont été découpées « en regard » dans les pistes « contrôle » versus « Cter-SORT », puis soumis en spectrométrie de masse (nano-LC-MS/MS, à l'IPHC de Strasbourg).

10. Chromatographie d'affinité sur colonne anti-HA

Un extrait cytoplasmique correspondant à 2 milliards de parasites de chaque souche (RH Δ Ku80-Vps9-HA, RH Δ Ku80-Vps26-HA, RH Δ Ku80-Vps35-HA, RH Δ Ku80-Sec23HA, RH Δ Ku80- μ 1adapline-HA, RH Δ Ku80-HP20-HA) est incubé avec 75 μ l de billes d'agarose-anti-HA (Pierce Anti-HA Agarose) sous agitation rotative, sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les billes sont lavées 5 fois pendant 10 minutes avec du tampon IP et une dernière fois rapidement avec du Tris 62,5 mM pH 6,8. Les billes sont ensuite éluées par 150 μ l de tampon de reprise SDS-DTT. Deux μ l de l'éluat sont déposés dans un gel d'acrylamide 10% pour les immuno-empreintes.

11. Tests d'interactions entre le domaine N-terminal de TgSORTLR et les protéines de rhoptries et de micronèmes

a. Préparation des colonnes portant les protéines recombinantes TgSORTLR tronquées

3 à 6 μ g des différentes protéines recombinantes (dosage bradford) correspondant aux versions tronquées du domaine N-terminal de TgSORTLR (rSORT37-789, rSORT202-789, rSORT446-789, rSORT736-789, rGST comme contrôle) sont couplées à 30-40 μ l de billes de Sépharose-4B sur la nuit à 4°C en présence d'inhibiteurs de protéases. Après 5 lavages au tampon IP, les colonnes sont prêtes à l'usage.

b. Synthèse *in vitro* des protéines et test d'interactions *in vitro*

Les protéines Mic5 et Rop1 ont été synthétisées *in vitro* à l'aide du kit de Promega « TNT SP6 Wheat germ expression system ». Outre la partie spécifique du gène, l'oligo-nucléotide sens contient une séquence pour la reconnaissance de l'ARN polymérase SP6 ainsi que la séquence de KOZAK pour permettre la traduction correcte de l'ARN (Tableau 2). L'oligonucléotide antisens contient toujours en

plus de la séquence spécifique du gène, une étiquette HA afin de visualiser la protéine produite (Tableau 2). La PCR est réalisée à l'aide de ces oligonucléotides sur de l'ADNc avec l'enzyme polymérase DreamTaq (fermentas) (volume final 50µl : ADNc 150 ng ; dNTP 0,2mM ; Tampon DreamTaq incolore ; oligo-nucléotides 1µM ; enzyme 0,5µl). Les conditions de la PCR sont les conditions classiques liées à cette enzyme (voir dans la partie II) avec une température d'hybridation de 60°C et une élongation de 2 minutes pendant 35 cycles.

Les PCR sont contrôlées pour leur efficacité et leur pureté dans un gel d'agarose 1% puis 8µl de la PCR sont ajoutés à 30 µl du kit de synthèse protéique (qsp 50µl). La synthèse se déroule alors pendant 2 heures à 25 °C. 1/10 du volume de réaction est déposé en gel d'acrylamide 11% puis révélé par immuno-empreinte (anti-HA de lapin).

Les colonnes rSORT₃₇₋₇₈₉, rSORT₂₀₂₋₇₈₉, rSORT₄₄₆₋₇₈₉, rSORT₇₃₆₋₇₈₉ et rGST (contrôle) sont alors incubées dans 1mL de tampon Tris HCl 10mM ; NaCl 150 mM ; Triton X-100 1% avec 20 µl du mélange de réaction (protéines synthétisées) pendant toute la nuit à 4°C. Après 5 lavages avec ce tampon, les billes sont éluées par 50µl du tampon de reprise SDS en présence de 0,1M DTT. 12,5 µl de l'éluat est déposé en gel d'acrylamide 10% et analysé par immuno-empreinte (anti-HA de lapin, invitrogene).

c. Chromatographie d'affinité avec des extraits protéiques des mutants déficients pour TgSORTLR.

Les parasites mutants « iKO-SORT » sont traités avec 1µg/ml d'ATc durant 48h puis purifiés. Le culot parasitaire est repris par un tampon Tris HCl 10mM ; NaCl 150 mM ; Triton X-100 1% puis incubé 1h à 4°C sous agitation rotative (en présence de PMSF à 1mM et d'inhibiteurs de protéases, fermentas). Les échantillons sont alors centrifugés 30 min à 14000 rpm et les extraits protéiques contenus dans le surnageant sont alors utilisés sur les différentes colonnes rSORT₃₇₋₇₈₉, rSORT₂₀₂₋₇₈₉, rSORT₄₄₆₋₇₈₉, rSORT₇₃₆₋₇₈₉ et rGST, (cette dernière colonne étant le contrôle négatif). Après une nuit d'incubation à 4°C, les colonnes sont lavées 5 fois par le tampon IP puis une fois par du Tris 62,5mM pH 6,5. L'éluat est réalisée avec 50µl de tampon de reprise contenant du DTT 0,1M.

d. Chromatographie sur des extraits de protéines dissociées issus de parasites sauvages

Une quantité de 1 milliard de tachyzoïtes purifiés est lysée directement par 200µl de PBS contenant 1% SDS. Les complexes protéiques sont ainsi dissociés pendant 5 minutes. Ensuite 10 ml de tampon IP contenant 1% de Triton X-100 sont ajoutés afin de neutraliser le SDS. Le mélange est directement incubé sur les différentes colonnes rSORT37-789, rSORT202-789, rSORT446-789, rSORT736-789 et rGST en présence d'inhibiteurs de protéases et de PMSF (1mM) à 4°C sur la nuit. Après 5 lavages avec le tampon IP et un dernier lavage par du Tris 62,5mM pH 6,5, les billes sont éluées par le tampon de reprise contenant du 0,1 M DTT.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abazeed, M.E., and Fuller, R.S. (2008). Yeast Golgi-localized, gamma-Ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins are but adaptor protein-1 is not required for cell-free transport of membrane proteins from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4826–4836.
- Adisa, A., Albano, F.R., Reeder, J., Foley, M., and Tilley, L. (2001). Evidence for a role for a *Plasmodium falciparum* homologue of Sec31p in the export of proteins to the surface of malaria parasite-infected erythrocytes. *J. Cell. Sci.* *114*, 3377–3386.
- Adisa, A., Rug, M., Foley, M., and Tilley, L. (2002). Characterisation of a delta-COP homologue in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *123*, 11–21.
- Agop-Nersesian, C., Egarter, S., Langsley, G., Foth, B.J., Ferguson, D.J.P., and Meissner, M. (2010). Biogenesis of the inner membrane complex is dependent on vesicular transport by the alveolate specific GTPase Rab11B. *PLoS Pathog.* *6*, e1001029.
- Agop-Nersesian, C., Naissant, B., Ben Rached, F., Rauch, M., Kretzschmar, A., Thiberge, S., Menard, R., Ferguson, D.J.P., Meissner, M., and Langsley, G. (2009). Rab11A-controlled assembly of the inner membrane complex is required for completion of apicomplexan cytokinesis. *PLoS Pathog.* *5*, e1000270.
- Aicart-Ramos, C., Valero, R.A., and Rodriguez-Crespo, I. (2011). Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 2981–2994.
- Ajioka, J.W., Boothroyd, J.C., Brunk, B.P., Hehl, A., Hillier, L., Manger, I.D., Marra, M., Overton, G.C., Roos, D.S., Wan, K.L., et al. (1998). Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res.* *8*, 18–28.
- Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., and Dardé, M.-L. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* *186*, 684–689.
- Albano, F.R., Berman, A., La Greca, N., Hibbs, A.R., Wickham, M., Foley, M., and Tilley, L. (1999). A homologue of Sar1p localises to a novel trafficking pathway in malaria-infected erythrocytes. *Eur. J. Cell Biol.* *78*, 453–462.
- Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., and Boothroyd, J.C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* *1*, e17.
- Alonso, A.M., Coceres, V.M., De Napoli, M.G., Nieto Guil, A.F., Angel, S.O., and Corvi, M.M. (2012). Protein palmitoylation inhibition by 2-bromopalmitate alters gliding, host cell invasion and parasite morphology in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *184*, 39–43.

- Amessou, M., Fradagrada, A., Falguières, T., Lord, J.M., Smith, D.C., Roberts, L.M., Lamaze, C., and Johannes, L. (2007). Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J. Cell. Sci.* *120*, 1457–1468.
- Arighi, C.N., Hartnell, L.M., Aguilar, R.C., Haft, C.R., and Bonifacino, J.S. (2004). Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Cell Biol.* *165*, 123–133.
- Attal, G., and Langsley, G. (1996). A *Plasmodium falciparum* homologue of a rab specific GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biochem. Parasitol.* *79*, 91–95.
- Ayong, L., Pagnotti, G., Tobon, A.B., and Chakrabarti, D. (2007). Identification of *Plasmodium falciparum* family of SNAREs. *Mol. Biochem. Parasitol.* *152*, 113–122.
- Baker, R.P., Wijetilaka, R., and Urban, S. (2006). Two *Plasmodium rhomboid* proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria. *PLoS Pathog.* *2*, e113.
- Baldi, D.L., Andrews, K.T., Waller, R.F., Roos, D.S., Howard, R.F., Crabb, B.S., and Cowman, A.F. (2000). RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* *19*, 2435–2443.
- Banerjee, S., Vishwanath, P., Cui, J., Kelleher, D.J., Gilmore, R., Robbins, P.W., and Samuelson, J. (2007). The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 11676–11681.
- Banning, A., Tomasovic, A., and Tikkanen, R. (2011). Functional aspects of membrane association of reggie/flotillin proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* *12*, 725–735.
- Barragan, A., Brossier, F., and Sibley, L.D. (2005). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell. Microbiol.* *7*, 561–568.
- Beaman, M.H., Araujo, F.G., and Remington, J.S. (1994). Protective reconstitution of the SCID mouse against reactivation of toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* *169*, 375–383.
- Beckers, C.J., Dubremetz, J.F., Mercereau-Puijalon, O., and Joiner, K.A. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* *127*, 947–961.
- Behnke, M.S., Khan, A., Wootton, J.C., Dubey, J.P., Tang, K., and Sibley, L.D. (2011). Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 9631–9636.
- Berdoy, M., Webster, J.P., and Macdonald, D.W. (2000). Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc. Biol. Sci.* *267*, 1591–1594.

- Bermudes, D., Peck, K.R., Afifi, M.A., Beckers, C.J., and Joiner, K.A. (1994). Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* *269*, 29252–29260.
- Besteiro, S., Dubremetz, J.-F., and Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell. Microbiol.* *13*, 797–805.
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.-F., and Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. *PLoS Pathog.* *5*, e1000309.
- Binder, E.M., and Kim, K. (2004). Location, location, location: trafficking and function of secreted proteases of *Toxoplasma* and *Plasmodium*. *Traffic* *5*, 914–924.
- Blackman, M.J., and Bannister, L.H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol.* *117*, 11–25.
- Blumenschein, T.M.A., Friedrich, N., Childs, R.A., Saouros, S., Carpenter, E.P., Campanero-Rhodes, M.A., Simpson, P., Chai, W., Koutroukides, T., Blackman, M.J., et al. (2007). Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* *26*, 2808–2820.
- Boehm, M., and Bonifacino, J.S. (2001). Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2907–2920.
- Bonifacino, J.S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 23–32.
- Bonifacino, J.S., Cosson, P., Shah, N., and Klausner, R.D. (1991). Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* *10*, 2783–2793.
- Bonifacino, J.S., and Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* *116*, 153–166.
- Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2008). Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 427–436.
- Boothroyd, J.C., and Dubremetz, J.-F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 79–88.
- Bottova, I., Sauder, U., Olivieri, V., Hehl, A.B., and Sonda, S. (2010). The P-glycoprotein inhibitor GF120918 modulates Ca²⁺-dependent processes and lipid metabolism in *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE* *5*, e10062.
- Bowers, K., Lottridge, J., Helliwell, S.B., Goldthwaite, L.M., Luzio, J.P., and Stevens, T.H. (2004). Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* *5*, 194–210.
- Bradley, P.J., and Boothroyd, J.C. (1999). Identification of the pro-mature processing site of *Toxoplasma* ROP1 by mass spectrometry. *Mol. Biochem. Parasitol.* *100*, 103–109.

- Bradley, P.J., and Boothroyd, J.C. (2001). The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal. *Int. J. Parasitol.* *31*, 1177–1186.
- Bradley, P.J., Li, N., and Boothroyd, J.C. (2004). A GFP-based motif-trap reveals a novel mechanism of targeting for the *Toxoplasma* ROP4 protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* *137*, 111–120.
- Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, S.J., Alexander, D.L., Collier, S., Coombs, G.H., Dunn, J.D., Ferguson, D.J., Sanderson, S.J., Wastling, J.M., et al. (2005). Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* *280*, 34245–34258.
- Breinich, M.S., Ferguson, D.J.P., Foth, B.J., van Dooren, G.G., Lebrun, M., Quon, D.V., Striepen, B., Bradley, P.J., Frischknecht, F., Carruthers, V.B., et al. (2009). A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. *Curr. Biol.* *19*, 277–286.
- Brossier, F., Jewett, T.J., Lovett, J.L., and Sibley, L.D. (2003). C-terminal processing of the *Toxoplasma* protein MIC2 is essential for invasion into host cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 6229–6234.
- Brossier, F., Jewett, T.J., Sibley, L.D., and Urban, S. (2005). A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 4146–4151.
- Brydges, S.D., Zhou, X.W., Huynh, M.-H., Harper, J.M., Mital, J., Adjogble, K.D.Z., Däubener, W., Ward, G.E., and Carruthers, V.B. (2006). Targeted deletion of MIC5 enhances trimming proteolysis of *Toxoplasma* invasion proteins. *Eukaryotic Cell* *5*, 2174–2183.
- Buguliskis, J.S., Brossier, F., Shuman, J., and Sibley, L.D. (2010). Rhomboid 4 (ROM4) affects the processing of surface adhesins and facilitates host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* *6*, e1000858.
- Burd, C.G., Mustol, P.A., Schu, P.V., and Emr, S.D. (1996). A yeast protein related to a mammalian Ras-binding protein, Vps9p, is required for localization of vacuolar proteins. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2369–2377.
- Cabrera, A., Herrmann, S., Warszta, D., Santos, J.M., John Peter, A.T., Kono, M., Debrouver, S., Jacobs, T., Spielmann, T., Ungermann, C., et al. (2012). Dissection of Minimal Sequence Requirements for Rhoptry Membrane Targeting in the Malaria Parasite. *Traffic*.
- Cai, G., Radzanowski, T., Villegas, E.N., Kastelein, R., and Hunter, C.A. (2000). Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *165*, 2619–2627.
- Canuel, M., Bhattacharyya, N., Balbis, A., Yuan, L., and Morales, C.R. (2009). Sortilin and prosaposin localize to detergent-resistant membrane microdomains. *Exp. Cell Res.* *315*, 240–247.

- Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K., and Morales, C.R. (2008a). Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *373*, 292–297.
- Canuel, M., Lefrancois, S., Zeng, J., and Morales, C.R. (2008b). AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *366*, 724–730.
- Carey, K.L., Donahue, C.G., and Ward, G.E. (2000). Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *105*, 25–37.
- Carey, K.L., Jongco, A.M., Kim, K., and Ward, G.E. (2004). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryotic Cell* *3*, 1320–1330.
- Carne, B., Demar, M., Ajzenberg, D., and Dardé, M.L. (2009). Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerging Infect. Dis.* *15*, 656–658.
- Carney, D.S., Davies, B.A., and Horazdovsky, B.F. (2006). Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol.* *16*, 27–35.
- Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P., and Pfeffer, S.R. (2001). Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* *292*, 1373–1376.
- Carruthers, V.B. (2006). Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. *Int. J. Parasitol.* *36*, 595–600.
- Carruthers, V.B., Giddings, O.K., and Sibley, L.D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell. Microbiol.* *1*, 225–235.
- Carruthers, V.B., Sherman, G.D., and Sibley, L.D. (2000). The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J. Biol. Chem.* *275*, 14346–14353.
- Carruthers, V.B., and Sibley, L.D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* *73*, 114–123.
- Carruthers, V.B., and Tomley, F.M. (2008). Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell. Biochem.* *47*, 33–45.
- Cérède, O., Dubremetz, J.F., Bout, D., and Lebrun, M. (2002). The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *EMBO J.* *21*, 2526–2536.
- Cérède, O., Dubremetz, J.F., Soète, M., Deslée, D., Vial, H., Bout, D., and Lebrun, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J. Exp. Med.* *201*, 453–463.

Cereghino, J.L., Marcusson, E.G., and Emr, S.D. (1995). The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol. Biol. Cell* 6, 1089–1102.

Chadda, R., and Mayor, S. (2008). PTRF triggers a cave in. *Cell* 132, 23–24.

Chardin, P., and McCormick, F. (1999). Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* 97, 153–155.

Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P.I., Striepen, B., Roos, D.S., and Joiner, K.A. (1999). Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J. Biol. Chem.* 274, 2424–2431.

Chen, Z.-Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C.-X., Herrera, D.G., Nykjaer, A., Hempstead, B.L., and Lee, F.S. (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J. Neurosci.* 25, 6156–6166.

Coppens, I. (2006). Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 8, 1–9.

Coppens, I., Andries, M., Liu, J.L., and Cesbron-Delauw, M.F. (1999). Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 463–472.

Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C., and Joiner, K.A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125, 261–274.

Coppens, I., and Joiner, K.A. (2003). Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Mol. Biol. Cell* 14, 3804–3820.

Coppens, I., Sinai, A.P., and Joiner, K.A. (2000). *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J. Cell Biol.* 149, 167–180.

Coppens, I., and 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.

Coppin, A., Dzierszinski, F., Legrand, S., Mortuaire, M., Ferguson, D., and Tomavo, S. (2003). Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie* 85, 353–361.

Corvi, M.M., Berthiaume, L.G., and De Napoli, M.G. (2011). Protein palmitoylation in protozoan parasites. *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 1067–1079.

Costaguta, G., Stefan, C.J., Bensen, E.S., Emr, S.D., and Payne, G.S. (2001). Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol. Biol. Cell* *12*, 1885–1896.

Coutinho, M.F., Prata, M.J., and Alves, S. (2012). A shortcut to the lysosome: The mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol. Genet. Metab.*

Di Cristina, M., Spaccapelo, R., Soldati, D., Bistoni, F., and Crisanti, A. (2000). Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 7332–7341.

Cullen, P.J., and Korswagen, H.C. (2012). Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat. Cell Biol.* *14*, 29–37.

Daboussi, L., Costaguta, G., and Payne, G.S. (2012). Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* *14*, 239–248.

Dacks, J.B., Poon, P.P., and Field, M.C. (2008). Phylogeny of endocytic components yields insight into the process of nonendosymbiotic organelle evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 588–593.

Deloche, O., and Schekman, R.W. (2002). Vps10p cycles between the TGN and the late endosome via the plasma membrane in clathrin mutants. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4296–4307.

Denkers, E.Y., and Butcher, B.A. (2005). Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.* *21*, 35–41.

Derby, M.C., Lieu, Z.Z., Brown, D., Stow, J.L., Goud, B., and Gleeson, P.A. (2007). The trans-Golgi network golgin, GCC185, is required for endosome-to-Golgi transport and maintenance of Golgi structure. *Traffic* *8*, 758–773.

Dessens, J.T., Sidén-Kiamos, I., Mendoza, J., Mahairaki, V., Khater, E., Vlachou, D., Xu, X.-J., Kafatos, F.C., Louis, C., Dimopoulos, G., et al. (2003). SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Mol. Microbiol.* *49*, 319–329.

Díaz, E., and Pfeffer, S.R. (1998). TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* *93*, 433–443.

Dittmer, F., Ulbrich, E.J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R., and von Figura, K. (1999). Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J. Cell. Sci.* *112 (Pt 10)*, 1591–1597.

Dobrowolski, J.M., Carruthers, V.B., and Sibley, L.D. (1997). Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* *26*, 163–173.

Donahue, C.G., Carruthers, V.B., Gilk, S.D., and Ward, G.E. (2000). The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein

secreted in response to elevated intracellular calcium levels. *Mol. Biochem. Parasitol.* *111*, 15–30.

Donald, R.G.K., Allocco, J., Singh, S.B., Nare, B., Salowe, S.P., Wiltsie, J., and Liberator, P.A. (2002). *Toxoplasma gondii* cyclic GMP-dependent kinase: chemotherapeutic targeting of an essential parasite protein kinase. *Eukaryotic Cell* *1*, 317–328.

Doray, B., Bruns, K., Ghosh, P., and Kornfeld, S. (2002). Interaction of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor with GGA proteins. *J. Biol. Chem.* *277*, 18477–18482.

Dores, M.R., Paing, M.M., Lin, H., Montagne, W.A., Marchese, A., and Trejo, J. (2012). AP-3 regulates PAR1 ubiquitin-independent MVB/lysosomal sorting via an ALIX-mediated pathway. *Molecular Biology of the Cell*.

Dou, Z., and Carruthers, V.B. (2011). Cathepsin proteases in *Toxoplasma gondii*. *Adv. Exp. Med. Biol.* *712*, 49–61.

Dowse, T.J., Pascall, J.C., Brown, K.D., and Soldati, D. (2005). Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. *Int. J. Parasitol.* *35*, 747–756.

Drin, G., and Antonny, B. (2005). Cell biology: Helices sculpt membrane. *Nature* *437*, 1247–1249.

Drozdowicz, Y.M., Shaw, M., Nishi, M., Striepen, B., Liwinski, H.A., Roos, D.S., and Rea, P.A. (2003). Isolation and characterization of TgVP1, a type I vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase from *Toxoplasma gondii*. The dynamics of its subcellular localization and the cellular effects of a diphosphonate inhibitor. *J. Biol. Chem.* *278*, 1075–1085.

Dubey, J.P., and Lindsay, D.S. (2006). Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* *22*, 645–671.

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.

Dubremetz, J.F. (2007). Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell. Microbiol.* *9*, 841–848.

Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Bermudes, D., and Joiner, K.A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol. Res.* *79*, 402–408.

Dvorin, J.D., Martyn, D.C., Patel, S.D., Grimley, J.S., Collins, C.R., Hopp, C.S., Bright, A.T., Westenberger, S., Winzeler, E., Blackman, M.J., et al. (2010). A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science* *328*, 910–912.

Dzierszynski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M.F., and Tomavo, S. (2000). Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in

Toxoplasma gondii decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Mol. Microbiol.* 37, 574–582.

El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galéotti, N., Fourmaux, M.N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G., et al. (2006). The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6, 5773–5784.

El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S.T., Vial, H., Labesse, G., and Dubremetz, J.F. (2007a). ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 3, e14.

El Hajj, H., Lebrun, M., Fourmaux, M.N., Vial, H., and Dubremetz, J.F. (2007b). Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cell. Microbiol.* 9, 54–64.

El Hajj, H., Papoin, J., Cérède, O., Garcia-Réguet, N., Soète, M., Dubremetz, J.-F., and Lebrun, M. (2008). Molecular signals in the trafficking of *Toxoplasma gondii* protein MIC3 to the micronemes. *Eukaryotic Cell* 7, 1019–1028.

Epp, N., Rethmeier, R., Krämer, L., and Ungermann, C. (2011). Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles--Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 779–785.

Evans, S.F., Irmady, K., Ostrow, K., Kim, T., Nykjaer, A., Saftig, P., Blobel, C., and Hempstead, B.L. (2011). Neuronal brain-derived neurotrophic factor is synthesized in excess, with levels regulated by sortilin-mediated trafficking and lysosomal degradation. *J. Biol. Chem.* 286, 29556–29567.

Farrell, A., Thirugnanam, S., Lorestani, A., Dvorin, J.D., Eidell, K.P., Ferguson, D.J.P., Anderson-White, B.R., Duraisingh, M.T., Marth, G.T., and Gubbels, M.-J. (2012). A DOC2 protein identified by mutational profiling is essential for apicomplexan parasite exocytosis. *Science* 335, 218–221.

Fast, N.M., Xue, L., Bingham, S., and Keeling, P.J. (2002). Re-examining alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 30–37.

Fauquenoy, S., Hovasse, A., Sloves, P.-J., Morelle, W., Dilezitoko Alayi, T., Dilezitoko Ayali, T., Slomianny, C., Werkmeister, E., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., et al. (2011). Unusual N-glycan structures required for trafficking *Toxoplasma gondii* GAP50 to the inner membrane complex regulate host cell entry through parasite motility. *Mol. Cell Proteomics* 10, M111.008953.

Fauquenoy, S., Morelle, W., Hovasse, A., Bednarczyk, A., Slomianny, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Tomavo, S. (2008). Proteomics and glycomics analyses of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*--host cell interactions. *Mol. Cell Proteomics* 7, 891–910.

- Feng, C.G., and Sher, A. (2010). Parasites paralyze cellular host defense system to promote virulence. *Cell Host Microbe* 8, 463–464.
- Feng, D., Kim, T., Ozkan, E., Light, M., Torkin, R., Teng, K.K., Hempstead, B.L., and Garcia, K.C. (2010). Molecular and structural insight into proNGF engagement of p75NTR and sortilin. *J. Mol. Biol.* 396, 967–984.
- Ferguson, D. (2002). *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol.* 18, 351.
- Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 75–88.
- Fiore, P.P.D., Polo, S., and Hofmann, K. (2003). When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 491–497.
- Fjorback, A.W., Seaman, M., Gustafsen, C., Mehmedbasic, A., Gokool, S., Wu, C., Militz, D., Schmidt, V., Madsen, P., Nyengaard, J.R., et al. (2012). Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J. Neurosci.* 32, 1467–1480.
- Fleckenstein, M.C., Reese, M.L., Könen-Waisman, S., Boothroyd, J.C., Howard, J.C., and Steinfeldt, T. (2012). A *Toxoplasma gondii* Pseudokinase Inhibits Host IRG Resistance Proteins. *PLoS Biol.* 10, e1001358.
- Fomovska, A., Huang, Q., El Bissati, K., Mui, E.J., Witola, W.H., Cheng, G., Zhou, Y., Sommerville, C., Roberts, C.W., Bettis, S., et al. (2012). Novel N-benzoyl-2-hydroxybenzamide disrupts unique parasite secretory pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2666–2682.
- Foussard, F., Leriche, M.A., and Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology* 102 Pt 3, 367–370.
- Fréna, K., Polonais, V., Marq, J.-B., Stratmann, R., Limenitakis, J., and Soldati-Favre, D. (2010). Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. *Cell Host Microbe* 8, 343–357.
- Fricker-Hidalgo, H., Pelloux, H., Bost, M., Goullier-Fleuret, A., and Ambroise-Thomas, P. (1996). [Congenital toxoplasmosis: contribution of postnatal biological follow-up]. *Presse Med* 25, 1868–1872.
- Friedrich, R., Yeheskel, A., and Ashery, U. (2010). DOC2B, C2 domains, and calcium: A tale of intricate interactions. *Mol. Neurobiol.* 41, 42–51.
- Fukao, T., Frucht, D.M., Yap, G., Gadina, M., O’Shea, J.J., and Koyasu, S. (2001). Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 166, 4446–4455.
- Furtado, J.M., Winthrop, K.L., Butler, N.J., and Smith, J.R. (2012). Ocular toxoplasmosis I: parasitology, epidemiology and public health. *Clinical & Experimental Ophthalmology*.

- Gaji, R.Y., Flammer, H.P., and Carruthers, V.B. (2011). Forward targeting of *Toxoplasma gondii* proproteins to the micronemes involves conserved aliphatic amino acids. *Traffic* 12, 840–853.
- Gajria, B., Bahl, A., Brestelli, J., Dommer, J., Fischer, S., Gao, X., Heiges, M., Iodice, J., Kissinger, J.C., Mackey, A.J., et al. (2008). ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. *Nucleic Acids Res.* 36, D553–556.
- Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., and Beckers, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* 165, 383–393.
- Gavrilescu, L.C., and Denkers, E.Y. (2003). Interleukin-12 p40- and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 71, 2577–2583.
- Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., and Sher, A. (1992). Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 149, 175–180.
- Ghosh, P., Dahms, N.M., and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 202–212.
- Ghosh, P., and Kornfeld, S. (2004). The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 257–262.
- Gill, D.J., Clausen, H., and Bard, F. (2011). Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends in Cell Biology* 21, 149–158.
- Giraud, C.G., Garcia-Diaz, A., Eng, W.S., Yamamoto, A., Melia, T.J., and Rothman, J.E. (2008). Distinct domains of complexins bind SNARE complexes and clamp fusion in vitro. *J. Biol. Chem.* 283, 21211–21219.
- Glickman, J.N., Conibear, E., and Pearse, B.M. (1989). Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *EMBO J.* 8, 1041–1047.
- Govero, J., Doray, B., Bai, H., and Kornfeld, S. (2012). Analysis of Gga null mice demonstrates a non-redundant role for mammalian GGA2 during development. *PLoS ONE* 7, e30184.
- Grigg, M.E., Bonnefoy, S., Hehl, A.B., Suzuki, Y., and Boothroyd, J.C. (2001). Success and Virulence in *Toxoplasma* as the Result of Sexual Recombination Between Two Distinct Ancestries. *Science* 294, 161–165.
- Groffen, A.J., Martens, S., Díez Arazola, R., Cornelisse, L.N., Lozovaya, N., de Jong, A.P.H., Goriounova, N.A., Habets, R.L.P., Takai, Y., Borst, J.G., et al. (2010). Doc2b is a high-affinity Ca²⁺ sensor for spontaneous neurotransmitter release. *Science* 327, 1614–1618.

- Gubbels, M.-J., Vaishnava, S., Boot, N., Dubremetz, J.-F., and Striepen, B. (2006). A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J. Cell. Sci.* *119*, 2236–2245.
- Gubbels, M.-J., Wieffer, M., and Striepen, B. (2004). Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa. *Mol. Biochem. Parasitol.* *137*, 99–110.
- Hager, K.M., Striepen, B., Tilney, L.G., and Roos, D.S. (1999). The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* *112 (Pt 16)*, 2631–2638.
- Hajagos, B.E., Turetzky, J.M., Peng, E.D., Cheng, S.J., Ryan, C.M., Souda, P., Whitelegge, J.P., Lebrun, M., Dubremetz, J.-F., and Bradley, P.J. (2012). Molecular dissection of novel trafficking and processing of the *Toxoplasma gondii* rhoptry metalloprotease toxolysin-1. *Traffic* *13*, 292–304.
- Håkansson, S., Charron, A.J., and Sibley, L.D. (2001). *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* *20*, 3132–3144.
- Halonen, S.K., and Weidner, E. (1994). Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J. Eukaryot. Microbiol.* *41*, 65–71.
- Hanna, J., Carroll, K., and Pfeffer, S.R. (2002). Identification of residues in TIP47 essential for Rab9 binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 7450–7454.
- Harper, J.M., Huynh, M.-H., Coppens, I., Parussini, F., Moreno, S., and Carruthers, V.B. (2006). A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Mol. Biol. Cell* *17*, 4551–4563.
- Harper, J.M., Zhou, X.W., Pszenny, V., Kafsack, B.F.C., and Carruthers, V.B. (2004). The novel coccidian micronemal protein MIC11 undergoes proteolytic maturation by sequential cleavage to remove an internal propeptide. *Int. J. Parasitol.* *34*, 1047–1058.
- Hartmann, J., Hu, K., He, C.Y., Pelletier, L., Roos, D.S., and Warren, G. (2006). Golgi and centrosome cycles in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *145*, 125–127.
- Hayashi, M., Taniguchi, S., Ishizuka, Y., Kim, H.S., Wataya, Y., Yamamoto, A., and Moriyama, Y. (2001). A homologue of N-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin A-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* *276*, 15249–15255.
- He, C.Y., Shaw, M.K., Pletcher, C.H., Striepen, B., Tilney, L.G., and Roos, D.S. (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* *20*, 330–339.
- He, X., Grigg, M.E., Boothroyd, J.C., and Garcia, K.C. (2002). Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 606–611.

- Hehl, A.B., Lekutis, C., Grigg, M.E., Bradley, P.J., Dubremetz, J.F., Ortega-Barria, E., and Boothroyd, J.C. (2000). Toxoplasma gondii homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect. Immun.* *68*, 7078–7086.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev. Cell* *21*, 77–91.
- Henriquez, S.A., Brett, R., Alexander, J., Pratt, J., and Roberts, C.W. (2009). Neuropsychiatric disease and Toxoplasma gondii infection. *Neuroimmunomodulation* *16*, 122–133.
- Hermey, G. (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 2677–2689.
- Herm-Götz, A., Weiss, S., Stratmann, R., Fujita-Becker, S., Ruff, C., Meyhöfer, E., Soldati, T., Manstein, D.J., Geeves, M.A., and Soldati, D. (2002). Toxoplasma gondii myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *EMBO J.* *21*, 2149–2158.
- Hierro, A., Rojas, A.L., Rojas, R., Murthy, N., Effantin, G., Kajava, A.V., Steven, A.C., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2007). Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* *449*, 1063–1067.
- High, K.P., Joiner, K.A., and Handschumacher, R.E. (1994). Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of Toxoplasma gondii. *J. Biol. Chem.* *269*, 9105–9112.
- Hill, D., and Dubey, J.P. (2002). Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* *8*, 634–640.
- Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V.M.J., Martin, S., et al. (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* *132*, 113–124.
- Hirst, J., Barlow, L.D., Francisco, G.C., Sahlender, D.A., Seaman, M.N.J., Dacks, J.B., and Robinson, M.S. (2011). The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol.* *9*, e1001170.
- Hirst, J., and Carmichael, J. (2011). A potential role for the clathrin adaptor GGA in Drosophila spermatogenesis. *BMC Cell Biol.* *12*, 22.
- Hirst, J., Sahlender, D.A., Choma, M., Sinka, R., Harbour, M.E., Parkinson, M., and Robinson, M.S. (2009). Spatial and functional relationship of GGAs and AP-1 in Drosophila and HeLa cells. *Traffic* *10*, 1696–1710.
- Hoppe, H.C., and Joiner, K.A. (2000). Cytoplasmic tail motifs mediate endoplasmic reticulum localization and export of transmembrane reporters in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Cell. Microbiol.* *2*, 569–578.
- Hoppe, H.C., Ngô, H.M., Yang, M., and Joiner, K.A. (2000). Targeting to rhoptry organelles of Toxoplasma gondii involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nat. Cell Biol.* *2*, 449–456.

- Hoppenrath, M., and Leander, B.S. (2009). Molecular phylogeny of Parvilucifera procoacti (Alveolata, Myzozoa): Insights into perkinsid character evolution. *J. Eukaryot. Microbiol.* *56*, 251–256.
- Howe, D.K., Honoré, S., Derouin, F., and Sibley, L.D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* *35*, 1411–1414.
- Howell, S.A., Hackett, F., Jongco, A.M., Withers-Martinez, C., Kim, K., Carruthers, V.B., and Blackman, M.J. (2005). Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. *Mol. Microbiol.* *57*, 1342–1356.
- Hsu, V.W., Lee, S.Y., and Yang, J.-S. (2009). The evolving understanding of COPI vesicle formation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 360–364.
- Hu, F., Padukkavidana, T., Vægter, C.B., Brady, O.A., Zheng, Y., Mackenzie, I.R., Feldman, H.H., Nykjaer, A., and Strittmatter, S.M. (2010). Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* *68*, 654–667.
- Hu, K. (2008). Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* *4*, e10.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D.S., and Murray, J.M. (2006). Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* *2*, e13.
- Hu, K., Roos, D.S., and Murray, J.M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* *156*, 1039–1050.
- Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* *91*, 119–149.
- Huynh, M.-H., and Carruthers, V.B. (2006). *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog.* *2*, e84.
- Huynh, M.-H., Rabenau, K.E., Harper, J.M., Beatty, W.L., Sibley, L.D., and Carruthers, V.B. (2003). Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO J.* *22*, 2082–2090.
- Iwaki, T., Hosomi, A., Tokudomi, S., Kusunoki, Y., Fujita, Y., Giga-Hama, Y., Tanaka, N., and Takegawa, K. (2006). Vacuolar protein sorting receptor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology (Reading, Engl.)* *152*, 1523–1532.
- Jacobsen, L., Madsen, P., Nielsen, M.S., Geraerts, W.P.M., Gliemann, J., Smit, A.B., and Petersen, C.M. (2002). The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and -2 and defines minimum requirements for GGA binding. *FEBS Lett.* *511*, 155–158.
- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J.R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S.S., Breiderhoff, T., Gotthardt, M., Lin, F., Eilers, A., et al. (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat. Neurosci.* *10*, 1449–1457.

- Jensen, D., and Schekman, R. (2011). COPII-mediated vesicle formation at a glance. *J. Cell. Sci.* *124*, 1–4.
- Jewett, T.J., and Sibley, L.D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol. Cell* *11*, 885–894.
- Jin, L., Pahuja, K.B., Wickliffe, K.E., Gorur, A., Baumgärtel, C., Schekman, R., and Rape, M. (2012). Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature* *482*, 495–500.
- Johannes, L., and Popoff, V. (2008). Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell* *135*, 1175–1187.
- Johnson, K.F., and Kornfeld, S. (1992). A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. *J. Biol. Chem.* *267*, 17110–17115.
- Johnson, L.L. (1992). SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infect. Immun.* *60*, 3719–3724.
- Johnson, T.M., Rajfur, Z., Jacobson, K., and Beckers, C.J. (2007). Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3039–3046.
- Joiner, K.A., Fuhrman, S.A., Miettinen, H.M., Kasper, L.H., and Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* *249*, 641–646.
- Joiner, K.A., and Roos, D.S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J. Cell Biol.* *157*, 557–563.
- Jones, T.C., and Hirsch, J.G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* *136*, 1173–1194.
- Jortzik, E., Mailu, B.M., Preuss, J., Fischer, M., Bode, L., Rahlfs, S., and Becker, K. (2011). Glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase: a unique bifunctional enzyme from *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* *436*, 641–650.
- Kaddai, V., Jager, J., Gonzalez, T., Najem-Lendom, R., Bonnafous, S., Tran, A., Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Tanti, J.-F., and Cormont, M. (2009). Involvement of TNF- α in abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans. *Diabetologia* *52*, 932–940.
- Kajiho, H., Sakurai, K., Minoda, T., Yoshikawa, M., Nakagawa, S., Fukushima, S., Kontani, K., and Katada, T. (2011). Characterization of RIN3 as a guanine nucleotide exchange factor for the Rab5 subfamily GTPase Rab31. *J. Biol. Chem.* *286*, 24364–24373.
- Kang, H., Remington, J.S., and Suzuki, Y. (2000). Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN- γ , TNF- α , and inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* *164*, 2629–2634.

- Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., and Ménard, R. (1999). Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J. Cell Biol.* *147*, 937–944.
- Kar, N., and Misra, B. (2004). Toxoplasma seropositivity and depression: a case report. *BMC Psychiatry* *4*, 1.
- Karsten, V., Qi, H., Beckers, C.J., Reddy, A., Dubremetz, J.F., Webster, P., and Joiner, K.A. (1998). The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J. Cell Biol.* *141*, 1323–1333.
- Kasper, L.H., and Buzoni-Gatel, D. (1998). Some Opportunistic Parasitic Infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* *14*, 150–156.
- Kats, L.M., Cooke, B.M., Coppel, R.L., and Black, C.G. (2008). Protein trafficking to apical organelles of malaria parasites - building an invasion machine. *Traffic* *9*, 176–186.
- Kawase, O., Nishikawa, Y., Bannai, H., Igarashi, M., Matsuo, T., and Xuan, X. (2010). Characterization of a novel thrombospondin-related protein in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Int.* *59*, 211–216.
- Keeley, A., and Soldati, D. (2004). The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.* *14*, 528–532.
- Kessler, H., Herm-Götz, A., Hegge, S., Rauch, M., Soldati-Favre, D., Frischknecht, F., and Meissner, M. (2008). Microneme protein 8--a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* *121*, 947–956.
- Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A.J., Boyle, J., Cole, R., Glover, D., Tang, K., Paulsen, I.T., Berriman, M., et al. (2005). Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2980–2992.
- Khan, I.A., Matsuura, T., and Kasper, L.H. (1994). Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect. Immun.* *62*, 1639–1642.
- Kim, E., Lee, Y., Lee, H.-J., Kim, J.S., Song, B.-S., Huh, J.-W., Lee, S.-R., Kim, S.-U., Kim, S.-H., Hong, Y., et al. (2010). Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *403*, 167–171.
- Kim, J.Y., and Kandror, K.V. (2012). The first luminal loop confers insulin responsiveness to glucose transporter 4. *Mol. Biol. Cell* *23*, 910–917.
- Kim, T., and Hempstead, B.L. (2009). NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *EMBO J.* *28*, 1612–1623.
- Köhler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D., and Roos, D.S. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* *275*, 1485–1489.

- Koumandou, V.L., Klute, M.J., Herman, E.K., Nunez-Miguel, R., Dacks, J.B., and Field, M.C. (2011). Evolutionary reconstruction of the retromer complex and its function in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell. Sci.* *124*, 1496–1509.
- Labesse, G., Gelin, M., Bessin, Y., Lebrun, M., Papoin, J., Cerdan, R., Arold, S.T., and Dubremetz, J.-F. (2009). ROP2 from *Toxoplasma gondii*: a virulence factor with a protein-kinase fold and no enzymatic activity. *Structure* *17*, 139–146.
- Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C., and Sibley, L.D. (1999). Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *102*, 311–324.
- Lagal, V., Binder, E.M., Huynh, M.-H., Kafsack, B.F.C., Harris, P.K., Diez, R., Chen, D., Cole, R.N., Carruthers, V.B., and Kim, K. (2010). *Toxoplasma gondii* protease TgSUB1 is required for cell surface processing of micronemal adhesive complexes and efficient adhesion of tachyzoites. *Cell. Microbiol.* *12*, 1792–1808.
- Lal, K., Prieto, J.H., Bromley, E., Sanderson, S.J., Yates, J.R., 3rd, Wastling, J.M., Tomley, F.M., and Sinden, R.E. (2009). Characterisation of *Plasmodium* invasive organelles; an ookinete microneme proteome. *Proteomics* *9*, 1142–1151.
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.-F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B.W., et al. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.* *7*, e1001276.
- Lamarque, M.H., Papoin, J., Finizio, A.-L., Lentini, G., Pfaff, A.W., Candolfi, E., Dubremetz, J.-F., and Lebrun, M. (2012). Identification of a new rhoptry neck complex RON9/RON10 in the Apicomplexa parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE* *7*, e32457.
- Langsley, G., van Noort, V., Carret, C., Meissner, M., de Villiers, E.P., Bishop, R., and Pain, A. (2008). Comparative genomics of the Rab protein family in Apicomplexan parasites. *Microbes Infect.* *10*, 462–470.
- Larsen, J.V., Hansen, M., Møller, B., Madsen, P., Scheller, J., Nielsen, M., and Petersen, C.M. (2010). Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 4175–4187.
- Lauvrak, S.U., Torgersen, M.L., and Sandvig, K. (2004). Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *J. Cell. Sci.* *117*, 2321–2331.
- Leander, B.S., Clopton, R.E., and Keeling, P.J. (2003). Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *53*, 345–354.
- Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P.J., Vial, H., and Dubremetz, J.F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell. Microbiol.* *7*, 1823–1833.

- Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A.J., Canuel, M., and Morales, C.R. (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J.* *22*, 6430–6437.
- Lehle, L., Strahl, S., and Tanner, W. (2006). Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *45*, 6802–6818.
- Lekutis, C., Ferguson, D.J., Grigg, M.E., Camps, M., and Boothroyd, J.C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* *31*, 1285–1292.
- Lemgruber, L., De Souza, W., and Vommaro, R.C. (2008). Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. *Micron* *39*, 177–183.
- Leriche, M.A., and Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* *45*, 249–259.
- Leung, K.F., Dacks, J.B., and Field, M.C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* *9*, 1698–1716.
- Liendo, A., Stedman, T.T., Ngo, H.M., Chaturvedi, S., Hoppe, H.C., and Joiner, K.A. (2001). *Toxoplasma gondii* ADP-ribosylation factor 1 mediates enhanced release of constitutively secreted dense granule proteins. *J. Biol. Chem.* *276*, 18272–18281.
- Lim, L., Kalanon, M., and McFadden, G.I. (2009). New proteins in the apicoplast membranes: time to rethink apicoplast protein targeting. *Trends Parasitol.* *25*, 197–200.
- Lin, B.Z., Pilch, P.F., and Kandrór, K.V. (1997). Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* *272*, 24145–24147.
- Linder, M.E., and Deschenes, R.J. (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 74–84.
- Linsel-Nitschke, P., Heeren, J., Aherrahrou, Z., Bruse, P., Gieger, C., Illig, T., Prokisch, H., Heim, K., Doering, A., Peters, A., et al. (2010). Genetic variation at chromosome 1p13.3 affects sortilin mRNA expression, cellular LDL-uptake and serum LDL levels which translates to the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* *208*, 183–189.
- Liu, S., and Storrie, B. (2012). Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*.
- Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., Ghassemian, M., Nycz, D., Hay, J., Ghosh, P., and Ferro-Novick, S. (2011). Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature* *473*, 181–186.
- Lorentz, A., Baumann, A., Vitte, J., and Blank, U. (2012). The SNARE Machinery in Mast Cell Secretion. *Front Immunol* *3*, 143.

- Lourido, S., Shuman, J., Zhang, C., Shokat, K.M., Hui, R., and Sibley, L.D. (2010). Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. *Nature* *465*, 359–362.
- Lovett, J.L., Marchesini, N., Moreno, S.N.J., and Sibley, L.D. (2002). *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca²⁺ release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)/ryanodine-sensitive stores. *J. Biol. Chem.* *277*, 25870–25876.
- Lovett, J.L., and Sibley, L.D. (2003). Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *J. Cell. Sci.* *116*, 3009–3016.
- Luo, S., Ruiz, F.A., and Moreno, S.N.J. (2005). The acidocalcisome Ca²⁺-ATPase (TgA1) of *Toxoplasma gondii* is required for polyphosphate storage, intracellular calcium homeostasis and virulence. *Mol. Microbiol.* *55*, 1034–1045.
- Luo, S., Vieira, M., Graves, J., Zhong, L., and Moreno, S.N. (2001). A plasma membrane-type Ca²⁺-ATPase co-localizes with a vacuolar H⁺-pyrophosphatase to acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* *20*, 55–64.
- Luther, K.B., and Haltiwanger, R.S. (2009). Role of unusual O-glycans in intercellular signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1011–1024.
- de Macedo, C.S., Shams-Eldin, H., Smith, T.K., Schwarz, R.T., and Azzouz, N. (2003). Inhibitors of glycosyl-phosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Biochimie* *85*, 465–472.
- Magno, R.C., Lemgruber, L., Vommaro, R.C., De Souza, W., and Attias, M. (2005). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Tech.* *67*, 45–52.
- Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B., and Johannes, L. (2002). Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell Biol.* *156*, 653–664.
- Manger, I.D., Hehl, A.B., and Boothroyd, J.C. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.* *66*, 2237–2244.
- Mann, T., and Beckers, C. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *115*, 257–268.
- Mari, M., Bujny, M.V., Zeuschner, D., Geerts, W.J.C., Griffith, J., Petersen, C.M., Cullen, P.J., Klumperman, J., and Geuze, H.J. (2008). SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors. *Traffic* *9*, 380–393.
- Martin, S., Navarro, V., Vincent, J.P., and Mazella, J. (2002). Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* *123*, 1135–1143.

- Martin, S., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2003). Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J. Neurosci.* *23*, 1198–1205.
- Masclaux, F.G., Galaud, J.-P., and Pont-Lezica, R. (2005). The riddle of the plant vacuolar sorting receptors. *Protoplasma* *226*, 103–108.
- Mazella, J., Pétrault, O., Lucas, G., Deval, E., Béraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., et al. (2010). Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS Biol.* *8*, e1000355.
- Mazella, J., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J.P., et al. (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* *273*, 26273–26276.
- McCormick, C.J., Tuckwell, D.S., Crisanti, A., Humphries, M.J., and Hollingdale, M.R. (1999). Identification of heparin as a ligand for the A-domain of Plasmodium falciparum thrombospondin-related adhesion protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* *100*, 111–124.
- McCormick, P.J., Dumaresq-Doiron, K., Pluviose, A.-S., Pichette, V., Tosato, G., and Lefrançois, S. (2008). Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking. *Traffic* *9*, 1984–1997.
- McFadden, G.I., Reith, M.E., Munholland, J., and Lang-Unnasch, N. (1996). Plastid in human parasites. *Nature* *381*, 482.
- McGough, I.J., and Cullen, P.J. (2011). Recent advances in retromer biology. *Traffic* *12*, 963–971.
- McMahon, H.T., and Mills, I.G. (2004). COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 379–391.
- Medigeschi, G.R., Krikunova, M., Radhakrishnan, K., Wenzel, D., Klingauf, J., and Schu, P. (2008). AP-1 membrane-cytoplasm recycling regulated by mu1A-adaptin. *Traffic* *9*, 121–132.
- Meissner, M., Reiss, M., Viebig, N., Carruthers, V.B., Toursel, C., Tomavo, S., Ajioka, J.W., and Soldati, D. (2002). A family of transmembrane microneme proteins of Toxoplasma gondii contain EGF-like domains and function as escorts. *J. Cell. Sci.* *115*, 563–574.
- Meissner, M., and Soldati, D. (2005). The transcription machinery and the molecular toolbox to control gene expression in Toxoplasma gondii and other protozoan parasites. *Microbes Infect.* *7*, 1376–1384.
- Melo, E.J., Carvalho, T.M., and De Souza, W. (2001). Behaviour of microtubules in cells infected with Toxoplasma gondii. *Biocell* *25*, 53–59.
- Ménard, R. (2001). Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite. *Cell. Microbiol.* *3*, 63–73.

- Mercier, C., Adjogble, K.D.Z., Däubener, W., and Delauw, M.-F.-C. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* *35*, 829–849.
- Mercier, C., Dubremetz, J.-F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L.D., and Cesbron-Delauw, M.-F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2397–2409.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K., and Schu, P. (2000). *mu1A*-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J.* *19*, 2193–2203.
- Micaroni, M. (2010). The role of calcium in intracellular trafficking. *Curr. Mol. Med.* *10*, 763–773.
- Miller, S.A., Thathy, V., Ajioka, J.W., Blackman, M.J., and Kim, K. (2003). TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase. *Mol. Microbiol.* *49*, 883–894.
- Miller, S.E., Collins, B.M., McCoy, A.J., Robinson, M.S., and Owen, D.J. (2007). A SNARE-adaptor interaction is a new mode of cargo recognition in clathrin-coated vesicles. *Nature* *450*, 570–574.
- Milosevic, I., Giovedi, S., Lou, X., Raimondi, A., Collesi, C., Shen, H., Paradise, S., O’Toole, E., Ferguson, S., Cremona, O., et al. (2011). Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron* *72*, 587–601.
- Mineo, J.R., and Kasper, L.H. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol.* *79*, 11–20.
- Miranda, K., Pace, D.A., Cintron, R., Rodrigues, J.C.F., Fang, J., Smith, A., Rohloff, P., Coelho, E., de Haas, F., de Souza, W., et al. (2010). Characterization of a novel organelle in *Toxoplasma gondii* with similar composition and function to the plant vacuole. *Mol. Microbiol.* *76*, 1358–1375.
- Mital, J., Meissner, M., Soldati, D., and Ward, G.E. (2005). Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol. Biol. Cell* *16*, 4341–4349.
- Montoya, J.G., Giraldo, L.F., Efron, B., Stinson, E.B., Gamberg, P., Hunt, S., Giannetti, N., Miller, J., and Remington, J.S. (2001). Infectious complications among 620 consecutive heart transplant patients at Stanford University Medical Center. *Clin. Infect. Dis.* *33*, 629–640.
- Montoya, J.G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* *363*, 1965–1976.
- Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M., and Sibley, L.D. (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* *190*, 1783–1792.
- Morris, M.T., and Carruthers, V.B. (2003). Identification and partial characterization of a second Kazal inhibitor in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *128*, 119–122.

- Morrisette, N.S., and Sibley, L.D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *66*, 21–38; table of contents.
- Mullins, C., and Bonifacino, J.S. (2001). Structural requirements for function of yeast GGAs in vacuolar protein sorting, alpha-factor maturation, and interactions with clathrin. *Mol. Cell Biol.* *21*, 7981–7994.
- Munck Petersen, C., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S.K., and Madsen, P. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J.* *18*, 595–604.
- Nagae, M., and Yamaguchi, Y. (2012). Function and 3D Structure of the N-Glycans on Glycoproteins. *Int J Mol Sci* *13*, 8398–8429.
- Nakamura, K., Namekata, K., Harada, C., and Harada, T. (2007). Intracellular sortilin expression pattern regulates proNGF-induced naturally occurring cell death during development. *Cell Death Differ.* *14*, 1552–1554.
- Nakayama, K., and Wakatsuki, S. (2003). The structure and function of GGAs, the traffic controllers at the TGN sorting crossroads. *Cell Struct. Funct.* *28*, 431–442.
- Nevin, W.D., and Dacks, J.B. (2009). Repeated secondary loss of adaptin complex genes in the Apicomplexa. *Parasitol. Int.* *58*, 86–94.
- Ngô, H.M., Yang, M., and Joiner, K.A. (2004). Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? *Mol. Microbiol.* *52*, 1531–1541.
- Ngô, H.M., Yang, M., Paprotka, K., Pypaert, M., Hoppe, H., and Joiner, K.A. (2003). AP-1 in *Toxoplasma gondii* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* *278*, 5343–5352.
- Ni, X., and Morales, C.R. (2006). The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* *7*, 889–902.
- Nichols, B.A., and Chiappino, M.L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* *34*, 217–226.
- Nichols, B.A., Chiappino, M.L., and O'Connor, G.R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* *83*, 85–98.
- Nichols, B.A., Chiappino, M.L., and Pavesio, C.E. (1994). Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* *80*, 91–98.
- Niedelman, W., Gold, D.A., Rosowski, E.E., Sprockholt, J.K., Lim, D., Farid Arenas, A., Melo, M.B., Spooner, E., Yaffe, M.B., and Saeij, J.P.J. (2012). The Rhoptry Proteins ROP18 and ROP5 Mediate *Toxoplasma gondii* Evasion of the Murine, But Not the Human, Interferon-Gamma Response. *PLoS Pathog.* *8*, e1002784.

- Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Olivecrona, G., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (1999). Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* *274*, 8832–8836.
- Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R., and Petersen, C.M. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* *20*, 2180–2190.
- Nishi, M., Hu, K., Murray, J.M., and Roos, D.S. (2008). Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* *121*, 1559–1568.
- Nothwehr, S.F., Bruinsma, P., and Strawn, L.A. (1999). Distinct domains within Vps35p mediate the retrieval of two different cargo proteins from the yeast prevacuolar/endosomal compartment. *Mol. Biol. Cell* *10*, 875–890.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* *427*, 843–848.
- Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends Neurosci.* *35*, 261–270.
- Ohya, T., Miaczynska, M., Coskun, U., Lommer, B., Runge, A., Drechsel, D., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2009). Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature* *459*, 1091–1097.
- Ong, Y.-C., Reese, M.L., and Boothroyd, J.C. (2010). *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *J. Biol. Chem.* *285*, 28731–28740.
- Opitz, C., Di Cristina, M., Reiss, M., Ruppert, T., Crisanti, A., and Soldati, D. (2002). Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* *21*, 1577–1585.
- Opitz, C., and Soldati, D. (2002). “The glideosome”: a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* *45*, 597–604.
- Paredes-Santos, T.C., de Souza, W., and Attias, M. (2012). Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *J. Struct. Biol.* *177*, 420–430.
- Parussini, F., Coppens, I., Shah, P.P., Diamond, S.L., and Carruthers, V.B. (2010). Cathepsin L occupies a vacuolar compartment and is a protein maturase within the endo/exocytic system of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* *76*, 1340–1357.
- Patterson (1999). The Diversity of Eukaryotes. *Am. Nat.* *154*, S96–S124.
- Peixoto, L., Chen, F., Harb, O.S., Davis, P.H., Beiting, D.P., Brownback, C.S., Ouloguem, D., and Roos, D.S. (2010). Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. *Cell Host Microbe* *8*, 208–218.

- Pelletier, L., Stern, C.A., Pypaert, M., Sheff, D., Ngô, H.M., Roper, N., He, C.Y., Hu, K., Toomre, D., Coppens, I., et al. (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature* *418*, 548–552.
- Perkins, M.E. (1991). Approaches to study merozoite invasion of erythrocytes. *Res. Immunol.* *142*, 662–665.
- Pernas, L., and Boothroyd, J.C. (2010). Association of host mitochondria with the parasitophorous vacuole during *Toxoplasma* infection is not dependent on rhoptry proteins ROP2/8. *Int. J. Parasitol.* *40*, 1367–1371.
- Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and Moestrup, S.K. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* *272*, 3599–3605.
- Pfeffer, S.R. (2001). Membrane transport: retromer to the rescue. *Curr. Biol.* *11*, R109–111.
- Pflugger, S.L., Goodson, H.V., Moran, J.M., Ruggiero, C.J., Ye, X., Emmons, K.M., and Hager, K.M. (2005). Receptor for retrograde transport in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell* *4*, 432–442.
- Piper, R.C., and Lehner, P.J. (2011). Endosomal transport via ubiquitination. *Trends Cell Biol.* *21*, 647–655.
- Progida, C., Nielsen, M.S., Koster, G., Bucci, C., and Bakke, O. (2012). Dynamics of rab7b-dependent transport of sorting receptors. *Traffic* *13*, 1273–1285.
- Pszenny, V., Angel, S.O., Duschak, V.G., Paulino, M., Ledesma, B., Yabo, M.I., Guarnera, E., Ruiz, A.M., and Bontempi, E.J. (2000). Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *107*, 241–249.
- Puertollano, R., Aguilar, R.C., Gorshkova, I., Crouch, R.J., and Bonifacino, J.S. (2001). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* *292*, 1712–1716.
- Qiu, W., Wernimont, A., Tang, K., Taylor, S., Lunin, V., Schapira, M., Fentress, S., Hui, R., and Sibley, L.D. (2009). Novel structural and regulatory features of rhoptry secretory kinases in *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* *28*, 969–979.
- Que, X., Ngo, H., Lawton, J., Gray, M., Liu, Q., Engel, J., Brinen, L., Ghosh, P., Joiner, K.A., and Reed, S.L. (2002). The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. *J. Biol. Chem.* *277*, 25791–25797.
- Quevillon, E., Spielmann, T., Brahim, K., Chattopadhyay, D., Yeramian, E., and Langsley, G. (2003). The *Plasmodium falciparum* family of Rab GTPases. *Gene* *306*, 13–25.
- Quistgaard, E.M., Madsen, P., Grøftehauge, M.K., Nissen, P., Petersen, C.M., and Thirup, S.S. (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 96–98.

- Rached, F.B., Ndjembo-Ezougou, C., Chandran, S., Talabani, H., Yera, H., Dandavate, V., Bourdoncle, P., Meissner, M., Tatu, U., and Langsley, G. (2012). Construction of a *Plasmodium falciparum* Rab-interactome identifies CK1 and PKA as Rab-effector kinases in malaria parasites. *Biol. Cell* *104*, 34–47.
- Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* *458*, 445–452.
- Reese, M.L., and Boothroyd, J.C. (2009). A helical membrane-binding domain targets the *Toxoplasma* ROP2 family to the parasitophorous vacuole. *Traffic* *10*, 1458–1470.
- Reiss, M., Viebig, N., Brecht, S., Fourmaux, M.N., Soete, M., Di Cristina, M., Dubremetz, J.F., and Soldati, D. (2001). Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* *152*, 563–578.
- Richard, D., Kats, L.M., Langer, C., Black, C.G., Mitri, K., Boddey, J.A., Cowman, A.F., and Coppel, R.L. (2009). Identification of rhoptry trafficking determinants and evidence for a novel sorting mechanism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.* *5*, e1000328.
- Risselada, H.J., and Grubmüller, H. (2012). How SNARE molecules mediate membrane fusion: recent insights from molecular simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *22*, 187–196.
- Robibaro, B., Stedman, T.T., Coppens, I., Ngô, H.M., Pypaert, M., Bivona, T., Nam, H.W., and Joiner, K.A. (2002). *Toxoplasma gondii* Rab5 enhances cholesterol acquisition from host cells. *Cell. Microbiol.* *4*, 139–152.
- Robinson, D.G., Pimpl, P., Scheuring, D., Stierhof, Y.-D., Sturm, S., and Viotti, C. (2012). Trying to make sense of retromer. *Trends Plant Sci.* *17*, 431–439.
- Robinson, M.S. (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol.* *14*, 167–174.
- Robinson, M.S., and Bonifacino, J.S. (2001). Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 444–453.
- Rodriguez-Gabin, A.G., Yin, X., Si, Q., and Larocca, J.N. (2009). Transport of mannose-6-phosphate receptors from the trans-Golgi network to endosomes requires Rab31. *Exp. Cell Res.* *315*, 2215–2230.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J.H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C.T., Cheng, R., Hasegawa, H., et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* *39*, 168–177.
- Roos, D.S., Crawford, M.J., Donald, R.G., Kissinger, J.C., Klimeczak, L.J., and Striepen, B. (1999). Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr. Opin. Microbiol.* *2*, 426–432.

- Roth, J. (2002). Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem. Rev.* *102*, 285–303.
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., and Boothroyd, J.C. (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* *314*, 1780–1783.
- Saeij, J.P.J., Collier, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., and Boothroyd, J.C. (2007). Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* *445*, 324–327.
- Saffer, L.D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J.F., and Schwartzman, J.D. (1992). Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* *39*, 526–530.
- Saint-Pol, A., Yélamos, B., Amessou, M., Mills, I.G., Dugast, M., Tenza, D., Schu, P., Antony, C., McMahon, H.T., Lamaze, C., et al. (2004). Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev. Cell* *6*, 525–538.
- Saouros, S., Edwards-Jones, B., Reiss, M., Sawmynaden, K., Cota, E., Simpson, P., Dowse, T.J., Jäkle, U., Ramboarina, S., Shivarattan, T., et al. (2005). A novel galectin-like domain from *Toxoplasma gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly, and transport of a cell adhesion complex. *J. Biol. Chem.* *280*, 38583–38591.
- Schwab, J.C., Beckers, C.J., and Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 509–513.
- Schwartzman, J.D., and Pfefferkorn, E.R. (1981). Pyrimidine synthesis by intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* *67*, 150–158.
- Schwartzman, J.D., and Pfefferkorn, E.R. (1982). *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp. Parasitol.* *53*, 77–86.
- Scott, P.M., Bilodeau, P.S., Zhdankina, O., Winistorfer, S.C., Hauglund, M.J., Allaman, M.M., Kearney, W.R., Robertson, A.D., Boman, A.L., and Piper, R.C. (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* *6*, 252–259.
- Seaman, M.N.J. (2004). Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J. Cell Biol.* *165*, 111–122.
- Seaman, M.N.J. (2005). Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol.* *15*, 68–75.
- Seaman, M.N.J., Harbour, M.E., Tattersall, D., Read, E., and Bright, N. (2009). Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J. Cell. Sci.* *122*, 2371–2382.
- Seidah, N.G., and Chrétien, M. (1997). Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* *8*, 602–607.

- Serup Andersen, O., Boisguerin, P., Glerup, S., Skeldal, S., Volkmer, R., Willnow, T.E., Nykjaer, A., and Andersen, O.M. (2010). Identification of a linear epitope in sortilin that partakes in pro-neurotrophin binding. *J. Biol. Chem.* *285*, 12210–12222.
- Shaw, M.K., Compton, H.L., Roos, D.S., and Tilney, L.G. (2000). Microtubules, but not actin filaments, drive daughter cell budding and cell division in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* *113 (Pt 7)*, 1241–1254.
- Shaw, M.K., Roos, D.S., and Tilney, L.G. (1998). Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* *117 (Pt 5)*, 435–443.
- Shaw, M.K., Roos, D.S., and Tilney, L.G. (2001). DNA replication and daughter cell budding are not tightly linked in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* *3*, 351–362.
- Shaw, M.K., Roos, D.S., and Tilney, L.G. (2002). Cysteine and serine protease inhibitors block intracellular development and disrupt the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* *4*, 119–132.
- Sheiner, L., Demerly, J.L., Poulsen, N., Beatty, W.L., Lucas, O., Behnke, M.S., White, M.W., and Striepen, B. (2011). A systematic screen to discover and analyze apicoplast proteins identifies a conserved and essential protein import factor. *PLoS Pathog.* *7*, e1002392.
- Sheiner, L., Santos, J.M., Klages, N., Parussini, F., Jemmely, N., Friedrich, N., Ward, G.E., and Soldati-Favre, D. (2010). *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Mol. Microbiol.*
- Sheiner, L., and Soldati-Favre, D. (2008). Protein trafficking inside *Toxoplasma gondii*. *Traffic* *9*, 636–646.
- Shen, B., and Sibley, L.D. (2012). The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 449–455.
- Sher, A., Oswald, I.P., Hieny, S., and Gazzinelli, R.T. (1993). *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* *150*, 3982–3989.
- Shi, J., and Kandror, K.V. (2005). Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Dev. Cell* *9*, 99–108.
- Shi, J., and Kandror, K.V. (2007). The luminal Vps10p domain of sortilin plays the predominant role in targeting to insulin-responsive Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* *282*, 9008–9016.
- Shiba, T., Takatsu, H., Nogi, T., Matsugaki, N., Kawasaki, M., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Earnest, T., Nakayama, K., et al. (2002). Structural basis for recognition of acidic-cluster dileucine sequence by GGA1. *Nature* *415*, 937–941.

- Shonukan, O., Bagayogo, I., McCrea, P., Chao, M., and Hempstead, B. (2003). Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene* 22, 3616–3623.
- Sibley, L.D. (2003). *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 4, 581–586.
- Sibley, L.D. (2004). Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 304, 248–253.
- Sibley, L.D., Niesman, I.R., Asai, T., and Takeuchi, T. (1994). *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* 79, 301–311.
- Sibley, L.D., Pfefferkorn, E.R., and Boothroyd, J.C. (1991). Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 7, 327–328.
- Sibley, L.D., Weidner, E., and Krahenbuhl, J.L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315, 416–419.
- Sinai, A.P., and Joiner, K.A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell Biol.* 154, 95–108.
- Sinai, A.P., Webster, P., and Joiner, K.A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 17), 2117–2128.
- Sloves, P.-J., Delhay, S., Mouveaux, T., Werkmeister, E., Slomianny, C., Hovasse, A., Dilezitoko Alayi, T., Callebaut, I., Gaji, R.Y., Schaeffer-Reiss, C., et al. (2012). *Toxoplasma* sortilin-like receptor regulates protein transport and is essential for apical secretory organelle biogenesis and host infection. *Cell Host Microbe* 11, 515–527.
- Soldati, D., Dubremetz, J.F., and Lebrun, M. (2001). Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1293–1302.
- Soldati, D., and Meissner, M. (2004). *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 32–40.
- Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., and Rothman, J.E. (1993a). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409–418.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993b). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318–324.
- Sommer, M.E., Hofmann, K.P., and Heck, M. (2012). Distinct loops in arrestin differentially regulate ligand binding within the GPCR opsin. *Nat Commun* 3, 995.

- Sossin, W.S., Fisher, J.M., and Scheller, R.H. (1990). Sorting within the regulated secretory pathway occurs in the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* *110*, 1–12.
- Spang, A. (2004). Vesicle transport: a close collaboration of Rabs and effectors. *Curr. Biol.* *14*, R33–34.
- Stedman, T.T., Sussmann, A.R., and Joiner, K.A. (2003). *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* *278*, 5433–5443.
- Straub, K.W., Cheng, S.J., Sohn, C.S., and Bradley, P.J. (2009). Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cell. Microbiol.* *11*, 590–603.
- Striepen, B., Soldati, D., Garcia-Reguet, N., Dubremetz, J.F., and Roos, D.S. (2001). Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *113*, 45–53.
- Strong, A., Ding, Q., Edmondson, A.C., Millar, J.S., Sachs, K.V., Li, X., Kumaravel, A., Wang, M.Y., Ai, D., Guo, L., et al. (2012). Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism. *J. Clin. Invest.* *122*, 2807–2816.
- Strong, A., and Rader, D.J. (2012). Sortilin as a regulator of lipoprotein metabolism. *Curr Atheroscler Rep* *14*, 211–218.
- Stwora-Wojczyk, M.M., Kissinger, J.C., Spitalnik, S.L., and Wojczyk, B.S. (2004). O-glycosylation in *Toxoplasma gondii*: identification and analysis of a family of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Int. J. Parasitol.* *34*, 309–322.
- Sullivan Jr., W.J., and Hakimi, M.-A. (2006). Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* *148*, 109–116.
- Takatsu, H., Katoh, Y., Shiba, Y., and Nakayama, K. (2001). Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains. *J. Biol. Chem.* *276*, 28541–28545.
- Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K., and Nakayama, K. (2002). GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *Biochem. J.* *365*, 369–378.
- Taraschi, T.F., O'Donnell, M., Martinez, S., Schneider, T., Trelka, D., Fowler, V.M., Tilley, L., and Moriyama, Y. (2003). Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* *102*, 3420–3426.
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., et al. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* *314*, 1776–1780.

- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75^{NTR} and sortilin. *J. Neurosci.* *25*, 5455–5463.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., and Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* *30*, 1217–1258.
- Tomavo, S., Schwarz, R.T., and Dubremetz, J.F. (1989). Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 4576–4580.
- Tonkin, C.J., Kalanon, M., and McFadden, G.I. (2008). Protein targeting to the malaria parasite plastid. *Traffic* *9*, 166–175.
- Tonkin, M.L., Roques, M., Lamarque, M.H., Pugnère, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., and Boulanger, M.J. (2011). Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science* *333*, 463–467.
- Tran, J.Q., de Leon, J.C., Li, C., Huynh, M.-H., Beatty, W., and Morrissette, N.S. (2010). RNG1 is a late marker of the apical polar ring in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton (Hoboken)* *67*, 586–598.
- Vaegter, C.B., Jansen, P., Fjorback, A.W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J.R., Tessarollo, L., et al. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat. Neurosci.* *14*, 54–61.
- Vaidya, A.B., and Mather, M.W. (2009). Mitochondrial evolution and functions in malaria parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* *63*, 249–267.
- Vallochi, A.L., Muccioli, C., Martins, M.C., Silveira, C., Belfort, R., Jr, and Rizzo, L.V. (2005). The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* *139*, 350–351.
- Varshavsky, A. (2012). The ubiquitin system, an immense realm. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 167–176.
- Villegas, E.N., Elloso, M.M., Reichmann, G., Peach, R., and Hunter, C.A. (1999). Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* *163*, 3344–3353.
- Villegas, E.N., Lieberman, L.A., Carding, S.R., and Hunter, C.A. (2002). Susceptibility of interleukin-2-deficient mice to *Toxoplasma gondii* is associated with a defect in the production of gamma interferon. *Infect. Immun.* *70*, 4757–4761.
- Vincent, J.P., Mazella, J., and Kitabgi, P. (1999). Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* *20*, 302–309.
- Vivier, E., and 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*, 329–342.

- Waguri, S., Dewitte, F., Le Borgne, R., Rouillé, Y., Uchiyama, Y., Dubremetz, J.-F., and Hoflack, B. (2003). Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol. Biol. Cell* *14*, 142–155.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* *92*, 759–772.
- Weight, C.M., and Carding, S.R. (2012). The protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* targets the paracellular pathway to invade the intestinal epithelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1258*, 135–142.
- Westergaard, U.B., Sørensen, E.S., Hermey, G., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Kirkegaard, K., Jacobsen, C., Gliemann, J., Madsen, P., and Petersen, C.M. (2004). Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J. Biol. Chem.* *279*, 50221–50229.
- Wickert, H., Rohrbach, P., Scherer, S.J., Krohne, G., and Lanzer, M. (2003). A putative Sec23 homologue of *Plasmodium falciparum* is located in Maurer's clefts. *Mol. Biochem. Parasitol.* *129*, 209–213.
- Wiersma, H.I., Galuska, S.E., Tomley, F.M., Sibley, L.D., Liberator, P.A., and Donald, R.G.K. (2004). A role for coccidian cGMP-dependent protein kinase in motility and invasion. *Int. J. Parasitol.* *34*, 369–380.
- Willnow, T.E., Petersen, C.M., and Nykjaer, A. (2008). VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 899–909.
- Xue, M., Giagtzoglou, N., and Bellen, H.J. (2011). Dueling Ca²⁺ sensors in neurotransmitter release. *Cell* *147*, 491–493.
- Yamamoto, M., Standley, D.M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., et al. (2009). A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp. Med.* *206*, 2747–2760.
- Yamamoto, M., and Takeda, K. (2012). Inhibition of ATF6 β -dependent host adaptive immune response by a *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *Virulence* *3*, 77–80.
- Yang, M., Coppens, I., Wormsley, S., Baevova, P., Hoppe, H.C., and Joiner, K.A. (2004). The *Plasmodium falciparum* Vps4 homolog mediates multivesicular body formation. *J. Cell. Sci.* *117*, 3831–3838.
- Yang, M., Lim, Y., Li, X., Zhong, J.-H., and Zhou, X.-F. (2011). Precursor of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) forms a complex with Huntingtin-associated protein-1 (HAP1) and sortilin that modulates proBDNF trafficking, degradation, and processing. *J. Biol. Chem.* *286*, 16272–16284.
- Yano, H., Torkin, R., Martin, L.A., Chao, M.V., and Teng, K.K. (2009). Proneurotrophin-3 is a neuronal apoptotic ligand: evidence for retrograde-directed cell killing. *J. Neurosci.* *29*, 14790–14802.

- Yao, J., Gaffaney, J.D., Kwon, S.E., and Chapman, E.R. (2011). Doc2 is a Ca²⁺ sensor required for asynchronous neurotransmitter release. *Cell* 147, 666–677.
- Yarovinsky, F., and Sher, A. (2006). Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 36, 255–259.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., et al. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626–1629.
- Zaliauskiene, L., Kang, S., Brouillette, C.G., Lebowitz, J., Arani, R.B., and Collawn, J.F. (2000). Down-regulation of cell surface receptors is modulated by polar residues within the transmembrane domain. *Mol. Biol. Cell* 11, 2643–2655.
- Zanetti, G., Pahuja, K.B., Studer, S., Shim, S., and Schekman, R. (2012). COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat. Cell Biol.* 14, 20–28.
- Zauner, G., Kozak, R.P., Gardner, R.A., Fernandes, D.L., Deelder, A.M., and Wuhrer, M. (2012). Protein O-glycosylation analysis. *Biol. Chem.* 393, 687–708.
- Zhou, X.W., Blackman, M.J., Howell, S.A., and Carruthers, V.B. (2004). Proteomic analysis of cleavage events reveals a dynamic two-step mechanism for proteolysis of a key parasite adhesive complex. *Mol. Cell Proteomics* 3, 565–576.
- Zhu, G., Marchewka, M.J., and Keithly, J.S. (2000). *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology (Reading, Engl.)* 146 (Pt 2), 315–321.
- Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V.P., and Kornfeld, S. (2001). Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science* 292, 1716–1718.