



HAL
open science

Le compartiment endosomale (ELC) non conventionnel et le complexe rétromère gouvernent l'intégrité du parasite et l'infection de l'hôte

Lamba Omar Sangare

► **To cite this version:**

Lamba Omar Sangare. Le compartiment endosomale (ELC) non conventionnel et le complexe rétromère gouvernent l'intégrité du parasite et l'infection de l'hôte. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S034 . tel-01661453

HAL Id: tel-01661453

<https://theses.hal.science/tel-01661453>

Submitted on 12 Dec 2017

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

SANGARE Lamba Omar

**Le compartiment endosomale (ELC) non
conventionnel et le complexe Rétromère gouvernent
l'intégrité du parasite et l'infection de l'hôte.**

Soutenue le 09 Décembre 2015

Composition du jury :

Monsieur le Docteur SIMONET Michel Président

Monsieur le Docteur LANGSLEY Gordon Rapporteur

Monsieur le Docteur JOHANNES Ludger Rapporteur

Monsieur le Docteur DRIN Guillaume Examineur

Monsieur le Docteur Hakimi MOHAMED-Ali Examineur

Madame le Docteur PIED Sylviane Directrice 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**

Résumé

Toxoplasma gondii, comme *Plasmodium falciparum* appartiennent au phylum des Apicomplexes. Ce groupe de parasites ont comme dénominateurs communs, trois organites apicaux : rhoptries, micronèmes et granules denses contenant des facteurs indispensables pour la reconnaissance, l'entrée et la survie du parasite au sein de la cellule hôte. Le récepteur transmembranaire de type 1 appelé *TgSORTLR* ("Toxoplasma gondii Sortilin-Like Receptor") est nécessaire à la biogenèse des organelles de sécrétion rhoptrie et micronème (Sloves et al., 2012). Le domaine C-terminale de la *TgSORTLR*, lie *TgVps26* et *TgVps35* deux protéines appartenant au complexe Rétromère essentiel au recyclage protéique chez les mammifères et *S. cerevisiae*. Nous avons construit le premier interactome du CRC de *T. gondii* et des autres Apicomplexes. Contrairement aux mammifères, le Rétromère de *T. gondii* est composé du CRC (Complexe de Reconnaissance du Cargo) *TgVps35-TgVps26-TgVsp29* et l'absence du dimère de Sorting Nexin (SNX). Nous avons identifié plusieurs protéines connues de l'ELC (Endosomal-like compartment) ainsi que des protéines parasitaires spécifiques. La déplétion conditionnelle de *TgVps35* démontre que le complexe Rétromère n'est pas seulement crucial pour la biogenèse des rhoptries, micronèmes et granules denses, mais aussi pour l'architecture et l'intégrité du parasite. Nous avons montré que le recyclage de la *TgSORTLR* entre l'ELC et le TGN (Trans-Golgi-Network) est essentiel au trafic des protéines de sécrétion rhoptries et micronèmes. Par ailleurs nous avons décrit deux nouvelles protéines hypothétiques *TgHP12* et *TgHP03* pouvant être impliquées respectivement dans le trafic vers l'ELC et vers la membrane plasmique. Afin nous avons identifié et caractérisé une protéine chimérique *TgHP25* avec les domaines BAR et SBF2, pouvant être impliquée dans la biogenèse de l'organite rhoptrie. En somme notre travail souligne l'importance du recyclage protéique et l'implication de protéines spécifiques dans la maturation des organites et l'intégrité du parasite.

Mots clefs : *T.gondii* ; Trafic ; Rétromère, Spectrométrie de masse ; Endosomes ; Protéine Hypothétique ; BAR

Abstract

Toxoplasma gondii, like *Plasmodium falciparum* are belong to the Apicomplexan phylum. This group of parasites have as a common denominator, three apical organelles: rhoptries, micronemes and dense granules containing the essential factors for recognition, entry and survival into the host cell. The *Toxoplasma gondii* Sortilin-Like Receptor (*TgSORTLR*), is essential for the biogenesis of apical secretory organelles rhoptries and micronemes (Sloves et al., 2012). The C-terminal tail of *TgSORTLR* specifically binds to *TgVps26* and *TgVps35* proteins, two components of a pentameric complex called retromer (RC), and known to play an essential role in retrograde transport in yeast and mammals. We now report the first retromer-trafficking interactome in *T. gondii* and other apicomplexan parasites. In contrast to yeast and mammals, *T. gondii* RC harbors a singular architecture typified by a Vps35-Vps26-Vps29 trimer complex and the absence of the dimer of sorting nexins. Rather, we identified several known endosomal-like compartment (ELC) proteins and unrelated parasite-specific proteins. The conditional ablation of *TgVps35* demonstrates that the Retromer complex is not only crucial for the biogenesis of rhoptries, micronemes and dense granules but also for maintaining a proper parasite architecture and integrity. We showed that the recycling of *TgSORTLR* between ELC and Trans-Golgi Network (TGN), is essential for proper protein trafficking to secretory organelles rhoptries and micronemes. Furthermore, we will describe two novel parasite-specific proteins *TgHP12* and *TgHP03*, whose functions are likely related to ELC and plasma membrane. So we identified and characterized a chimeric protein *TgHP25* with the BAR and SBF2 domains, may be involved in the biogenesis of the organelle rhoptrie. In short our work emphasizes the importance of protein recycling and involvement of specific proteins in the maturation of organelles and integrity of the parasite.

Key word: *T.gondii*; Traffic; Retromer, Mass spectrometry; Endosome; Hypothetical Protein; BAR

Remerciements

Pour commencer je remercie la Communauté Urbaine Lille Métropole pour avoir financé ma thèse durant ces trois années, et le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) pour les trois derniers mois de rédaction. L'Université Lille 2 et l'école doctorale (Biologie Santé) à travers Mme Fofana et Mr Delcroix, pour leur disponibilité dans toutes mes démarches administratives.

Je remercie l'institut Pasteur de Lille et le CIIL (Centre d'infectiologie et d'immunité de Lille) (CNRS UMR 8204 –INSERM U1019), qui m'ont permis d'effectuer ma thèse au sein du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Toxoplasme (LBCMT).

Je remercie vivement le Dr Stanislas Tomavo, pour m'avoir accepté en thèse dans son équipe. Je le remercie pour sa confiance, et toutes les opportunités que j'ai pu avoir à travers ce projet. Et je lui souhaite un retour rapide à la normale et à la science. Un grand merci au Dr Sylviane Pied, qui dans des conditions particulières a accepté sans hésiter à prendre la direction de ma thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Michel Simonet d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse, le Docteur Gordon Langsley et le Docteur Lugder Johannes pour l'évaluation de ce travail en tant que rapporteurs et un grand merci également au Docteur Mohamed Ali-Hakimi et au Docteur Guillaume Drin d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Au cours de ma thèse que je nomme affectueusement « Thérèse », j'ai rencontré et collaboré avec de nombreuses personnes, au sein de l'équipe, de l'institut Pasteur de Lille et en France.

Dans l'équipe Thomas qui m'a appris mon premier mot ch'ti « maloute », merci pour ta sympathie l'intégration dans le Nord ; Pierre-Julien dit « PJ », mon projet découle de tien, merci pour ton sens du partage et tes conseils. Mathieu et Sabrina pour l'expérience et leurs nombreux conseils. Merci à Maïka « DD » pour nos précieuses discussions scientifiques et philosophiques, pour les conseils et la critique. « My

brother from another mother », Kannan, courage pour cette dernière année, reste fidèle à la voie de ta GTPase. Flavie merci pour la bonne humeur, tes conseils et l'amitié. À Kevin le troisième du triplet de thésards, bon courage pour ses facteurs de transcriptions. Merci à « master Yoda », Takaya pour nos discussions sur ses fameuses Vps, à Eli pour l'amitié sincère et pour toutes les ionisations et fragmentations de peptides. Pour tous les anciens de l'équipe que j'ai eu l'occasion de connaître: Joëlle, Belinda merci pour les bon moments ensemble ; à Myriam, Manèle, Younes...

Un grand merci à la Plateforme d'imagerie de Pasteurs à travers Elisabeth et Antonino, au Docteur Christian Slomianny et Etienne Dewally pour la microscopie électronique. A nos collaborateurs de Strasbourg avec lesquels nous avons énormément échangé des « data ». Au Docteur Isabelle Callebaut à Paris, pour toutes les prédictions bio-informatiques.

Enfin je remercie toute ma famille dans le sens très large du terme. A Paris avec mes Tantes Awa et Pauline, mon Oncle Roger et la famille Very. A Chartres, Zénabou et Karim pour leurs soutiens et conseils depuis mon premier jour en France. Aïssata qui a montré un grand intérêt dans l'étude du *Toxoplasme* et son soutien au cours de la rédaction de cette thèse. Mariam en Egypte très présente avec moi durant les moments difficiles et toute la famille au Mali.

Je ne remercierai jamais assez mes parents pour tous ce que j'ai reçus d'eux. Ils m'ont toujours montré leur amour et encouragé dans la voie des études, merci pour votre confiance.

Et je vous dédis ce mémoire, vous avez toujours su me donner des ailes, tout en me montrant mes racines.

Communications scientifiques

Présentations Orales :

- «14eme Journée André Verbert» Université Lille 2, (France), le 11 septembre 2014 ***Toxoplasma* Retromer Functions: identification of novel parasite-specific trafficking proteins.**
- «1st International biannual PARAFRAP conference» (France), du 29 September au 02 October 2014.
***Toxoplasma* Retromer Functions: identification of novel parasite-specific trafficking proteins**
- « 13th International Toxoplasma Meeting Congress», Pennsylvanian, (USA), du 17 au 21 Juin 2015.
Unconventional endosomal-like compartment and retromer complex govern parasite integrity and host infection

Présentation de Poster:

- « 12th International Toxoplasma Meeting Congress», Oxford, (UK), du 22 au 26 Juin 2013.
Functional analysis of endosomal-like markers and hypothetical proteins that specifically linked to either the anterograde or the retrograde pathway in *Toxoplasma gondii*.

Articles:

- **Apical Organelle Secretion by Toxoplasma controls Innate and Adaptive Immunity and Mediates Long-Term Protection.** Sloves PJ, Mouveaux T, Ait-Yahia S, Vorng H, Everaere L, Sangare LO, Tsicopoulos A, Tomavo S. *Journal of Infectious Diseases*. 2015 Apr 24. pii: jiv250.
- **Unconventional Endosome-Like Compartment and Retromer Complex Govern Parasite Integrity and Host Infection.** Lamba Omar Sangaré, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, Agnes Hovasse, Benoit Westermann, Fabien Sindikubwabo, Isabelle Callebaut, Elisabeth Werkmeister, Frank Lafont, Christian Slomianny, Christine Schaeffer-Reiss, Mohamed-Ali Hakimi, Alain Van Dorsselaer, and Stanislas Tomavo. (*En cours de soumission*)

Table des matières

Table des figures	10
Table des tableaux	12
Abréviations.....	13
Introduction.....	16
Chapitre 1 : Généralités sur les Apicomplexes et <i>Toxoplasma gondii</i>	17
A. Les Apicomplexes et <i>Toxoplasma gondii</i>	18
I. Le phylum Apicomplexa	18
a. La babésiose.....	19
b. La coccidiose	19
c. La cryptosporidiose	19
d. Le paludisme.....	20
II. <i>Toxoplasma gondii</i>	20
B. Le cycle de vie de <i>Toxoplasma gondii</i>	22
I. La phase sexuée	22
II. La phase asexuée	23
C. La toxoplasmose	25
I. Modes de contamination	25
Les aliments contaminés.....	25
La transmission transplacentaire.....	25
II. La prévalence.....	25
III. L'infection et la réponse immunitaire.....	26
a. L'infection.....	26
(1) Chez le fœtus et le nouveau-né	26
(2) Les patients immunodéprimés,.....	26
(3) La toxoplasmose oculaire.....	27
b. La réponse immunitaire	27
(1) L'immunité innée :	27
(2) L'immunité adaptative.....	27
IV. Diagnostique et traitement de la maladie	28
a. Le diagnostique.....	28
(1) Chez la femme enceinte.....	28
(2) Chez le fœtus	28

(3) La toxoplasmose oculaire.....	28
b. Le traitement.....	29
V. Conclusion	29
Chapitre 2 : Contexte scientifique.....	30
A. Ultrastructure, invasion et développement du parasite au sein de la cellule hôte.....	31
I. Ultrastructure du tachyzoïte	31
a. La pellicule	32
(1) La membrane plasmique externe	32
(2) Le Complexe Membranaire Interne (IMC ou «inner membran complex»).....	32
b. Le cytosquelette.....	32
a. Les organites classiques.....	35
b. Les organites spécifiques	35
(1) Les micronèmes	35
(2) Les rhoptries.....	36
(3) Les granules denses	36
a. L'invasion.....	39
(1) L'attachement aux récepteurs	39
(2) La réorientation	39
(3) La formation de la jonction mobile (JM),.....	39
(4) La vacuole parasitophore	41
b. La réplication au sein de la cellule hôte	43
II. Nécessité d'un trafic vésiculaire chez <i>T. gondii</i>	45
a. La voie antérograde	45
(1) RE vers le Golgi	45
(2) Golgi vers les endosomes :.....	47
(3) Des Endosomes vers les organites apicaux :	47
b. La voie rétrograde.....	50
(1) L'endocytose	50
(2) La voie de recyclage.....	52
B. Le complexe Retromer chez les Mammifères et <i>S.cerevisiae</i>	53
I. La composition du complexe Rétromère.....	53
a. Le complexe de reconnaissance du Cargo (CRC).....	53
(1) La protéine Vps26	53
(2) La protéine Vps29	54

(3) La protéine Vps35	54
b. Les sorting nexins (SNX)	56
II. Fonctions, cargos et protéines accessoires du Rétromère.....	58
a. Les protéines accessoires du Rétromère.....	58
(1) Le mode de recrutement	58
(2) Le processus de scission	58
(3) Le transport des tubules	58
b. Les fonctions et cargos du complexe Rétromère	60
(1) Des récepteurs intracellulaires	60
(2) Le recyclage de certains transporteurs.....	60
C. Le complexe Rétromère chez <i>T. gondii</i> et les Apicomplexes	62
I. Les Protéines <i>TgVps35</i> , <i>TgVps26</i> et <i>TgVps29</i>	62
II. La question des «sorting nexins» ou SNX chez les Apicomplexes	64
D. Objectif des travaux de thèse	65
Matériel et Méthodes	67
Résultats	80
A. Le compartiment endosomale (ELC) non-conventionnel et le complexe Rétromère gouvernent l'intégrité du parasite et l'infection de l'hôte.....	81
B. Caractérisation d'une protéine atypique à domaine BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) et SBF2 (Set Binding Factor) <i>TgHP25</i> , chez <i>Toxoplasma gondii</i>	99
I. Identification de la protéine par immunoprecipitation de <i>TgVps35</i> -HA dans le parasite Iko <i>TgSORTLR</i>	99
II. Etudes fonctionnelles de la protéine <i>TgHP25</i>	105
a. La localisation de la protéine <i>TgHP25</i>	105
b. Caractérisation biochimique du domaine BAR de <i>TgHP25</i>	109
c. Rôle fonctionnel de la protéine <i>TgHP25</i>	112
d. Production d'anticorps anti- <i>TgHP25</i>	114
Perspectives.....	126
Bibliographie.....	129

Table des figures

Figure 1: Arbre phylogénétique des six règnes des Eucaryotes.....	18
Figure 2: Cycle de vie de <i>Toxoplasma gondii</i>	24
Figure 3: Ultrastructure du tachyzoïte de <i>Toxoplasma gondii</i>	31
Figure 4: Schéma de la structure du cytosquelette de <i>T. gondii</i>	34
Figure 5: Représentation schématique des motifs peptidiques des protéines de Denses granules.....	38
Figure 6: Schéma du processus d'invasion de la cellule hôte.	40
Figure 7 : Schéma de la vacuole parasitophore de <i>T. gondii</i>	42
Figure 8: Schéma de la réplication chez <i>T. gondii</i>	44
Figure 9: Le transport antérograde.	46
Figure 10: Les facteurs moléculaires du trafic vésiculaire chez <i>T. gondii</i>	49
Figure 11: Les mécanismes d'endocytoses chez les cellules mammifères..	51
Figure 12: Schéma de la structure en cristallographie du CRC.....	55
Figure 13: Modèle d'un homodimère de SNX1-BAR et schéma du tubule de Rétromère.....	57
Figure 14: Représentation schématique des interactions entre le complexe Rétromère et ses protéines accessoires.....	59
Figure 15: Représentation schématique du rôle du complexe Rétromère régulant la sortie de protéines endosomales.....	61
Figure 16: conservation des composants du Rétromère chez les Eucaryotes	63
Figure 17: Conservation des « Sorting Nexin » chez les Eucaryotes.	65
Figure 18 : Immunoprecipitation <i>TgVps35</i> en absence et en présence d'ATc.....	99
Figure 19 : Analyse protéomique des résultats d'IPs <i>TgVps35</i>	100
Figure 20 : Quantification « Label free » de la protéine <i>TgHP25</i> dans les IPs <i>TgVps35</i>	102

Figure 21 : Approche HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) de la protéine <i>TgHP25</i>	104
Figure 22 : Model du domaine F-BAR de <i>TgHP25</i>	104
Figure 23 : Amplification de l'insert <i>TgHP25</i> à partir de l'ADN génomique du parasite	105
Figure 24: La localisation de <i>TgHP25</i> est essentiellement cytoplasmique.	106
Figure 25 : Une partie de la protéine <i>TgHP25</i> présente une localisation au-dessus des compartiments <i>TgVps35</i> et TGN.....	106
Figure 26 : La protéine <i>TgHP25</i> co-localise avec les marqueurs endo-lysosomaux..	108
Figure 27 : Localisation de <i>TgHP25</i> par rapport aux organites de secretion.	108
Figure 28 : Purification des protéines recombinantes GST- <i>TgHP25</i> , GST, GST-BAR et GST-SBF2.	109
Figure 29 : Tests de « Lipid Overlay » des protéines recombinantes <i>TgHP25</i> ; BAR et SBF2.....	111
Figure 30 : La stratégie CRISPR/CAS9 sur le gène <i>TgHP25</i>	113
Figure 31 : Tests en Immuno-marquage des sérums de souris pour les protéines recombinantes BAR et SBF2 spécifique.....	115

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des anticorps	73
Tableau 2: Liste des plasmides	75
Tableau 3 : Liste des primers.....	75
Tableau 4 : Liste des protéines quantifiées en « Label free ».....	102

Abréviations

AMA1: **A**pical **M**embrane **A**ntigen

AP: **A**daptor **P**rotein

AQP1: **a**quaporin **P**rotein 1

ARF: **A**DP **R**ibosylation **F**actor

ATc: **a**nhydrotetracyclin

BAR: Bin-Amphiphysin-Rvs

BFA: **B**réfaldine **A**

CI-M6PR : manose-6 phosphate récepteur

COMT : **c**entre **o**rganisateur des **m**icrotubules

COP: **C**oat **P**rotein

CORVET: class C **c**ore **v**acuole/**e**ndosome **t**ethering

CPL: **C**athepsin **P**rotein-**L**ike

CRC: **C**argo **R**ecognition **C**omplex

CRISPR/CAS9: **c**lustered **r**egularly **i**nterspaced **s**hort **p**alindromic **r**epeats/**C**RISPR **a**ssociated **p**rotein **9**

DAPI: 4', 6-**d**iamidino-2-**p**henylindole

DHFR: **D**ihydrofolate reductase

DPAP-A: **d**i-peptidyl aminopeptidase **A**

DSCR: **D**own **s**ndrome **c**ritical **r**egion

DTT: **D**ithiothreitol

EDTA: Ethylenediaminetetraacetate

EGF: **E**pidermal **g**rowth **f**actor

EGTA: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

ELC: **E**ndosomal-**L**ike **C**ompartment

ESCORT: **E**ndosomal **S**orting **C**omplexes **R**equired for **T**ransport

GAP: **G**lideosome **A**ssociated **P**rotein

GD: **G**ranule **D**ense

GEF: **G**uanoside **E**xchange **F**actor

GFP: **G**reen **F**luorescent **P**rotein

GLUT1: **G**lucose **T**ransporter

GOLPH3: **G**olgi **p**hosphoprotein **3**
GPI: **G**lycosyl-**p**hosphatidylinositol
GRA: Dense granule protein
GRASP-RFP: **G**olgi **R**eassembly **S**tacking **P**rotein- **R**eed **F**luorescent **P**rotein
GST: **G**lutathion **S**-Transferase
GTP: **G**uanosine **T**riphosphate
HA: **H**emagglutinin
HFF: **H**uman **F**ibroblast **F**oreskin
His: **H**istidine
HOPS: **h**omotypic fusion and vacuole protein **s**orting
HP: **H**ypothetical **P**rotein
IFN: Interferon
IgG/M: Immunoglobulin
IL : Interleukine
IMC/CMI : Inner **M**embran **C**omplex/**C**omplexe de **M**embrane **I**nterne
IP: Immunoprécipitation
IRGs: Immunity **R**elated **G**uanosine Triphosphatases
iKo: inducible **K**nock **o**ut
ME/EM: **M**icroscope **E**lectronique/ **E**lectronic **M**icroscope
MFS: **m**ajor **f**acilitator **s**uperfamily
MIC: **M**icronème protein
MLC: **M**ysin **L**ight **C**hain
MS/MS: **M**ass **S**pectrometry/**M**ass **S**pectrometry
MT: **M**icrotubule
MTMRs: **m**ytubularin-related proteins
MVB: **M**ultivacuolar **B**odies
MyoA: **M**ysin **A**
NFkB: ***N**uclear **f**actor-**k**appa **B***
OMS: **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté
PAF: **P**araformaldehyde

PAN: **P**lasminogen, **a**pple, **n**ematode
PBS: **P**hosphate-**B**uffered **S**aline
PCR: **P**olymerase **C**hain **R**eaction
pLIC: **p**lasmid **L**inkage **I**ndependent **C**loning
PMSF: **P**henyl-**m**ethane- **s**ulfonyl fluoride
PtdInsP: **P**hosphatidyl**i**nositol -**p**hosphate
PVL: **P**lant **V**acuole-**L**ike
PX: **P**hoX homology
RE/ER : **R**éticulum **E**ndoplasmique/ **E**ndoplasmic **R**eticulum
RON: **R**hoptrie **N**eck protein
ROP: **R**hoptrie protein
SAG: **S**urface **A**ntigens
SBF2: **S**et **B**inding **F**actor **2**
SIM: **S**tructured **I**llumination **M**icroscopy
SNAREs: **S**oluble **N**SF **A**ttachment Protein **R**eceptors
SNF: **N**-ethylmaleimide **s**ensitive **f**usion proteins
SNX: **S**orting **N**exin
SPM1: **S**ub-**p**elliculaire microtubule protein **1**
STAT: **S**ignal **T**ransducer **a**nd **A**ctivator of **T**ranscription
TGN: **T**rans-**G**olgi **N**etwork
*Tg*SORTLR: *Toxoplasma gondii* **S**ortilin-**L**ike **R**eceptor
Th1: **T** helper cells
UPRT: **U**racil **P**hosphoribosyl **T**ransferase
VAC: **V**acuolar **C**ompartment
VARP: **V**ps29-domain **A**nkyrine **R**epeat **P**rotein
VIH: **V**irus de l'**I**mmunodéficience **H**umain
VP/PV: **V**acuole **P**arasitophore/ **P**arasitophorous **V**acuole
Vps: **V**acuolar **p**rotein **s**orting

Introduction

Chapitre 1 : Généralités sur les Apicomplexes et *Toxoplasma gondii*

A. Les Apicomplexes et *Toxoplasma gondii*

I. Le phylum Apicomplexa

L'Embranchement des *Apicomplexa* partage le même ancêtre commun avec les Dinoflagellés et les Ciliés (il y a 900 millions d'années) et forment ensemble des *Alveolata* (Figure 1). Cet ensemble a une architecture pelliculaire constituée de trois membranes sous-tendues par un réseau de microtubules (Patterson, 1999); (Fast et al., 2002), (Vaidya and Mather, 2009). La répartition en sous-classe dans l'embranchement est fonction de l'ADN mitochondriale. Ainsi donc nous avons les Gregarines, Coccidies, *Haemosporidiens*, *Piroplasmés*, *Eugregarines* et les *Cryptosporidium* (Hoppenrath and Leander, 2009); (Vaidya and Mather, 2009).

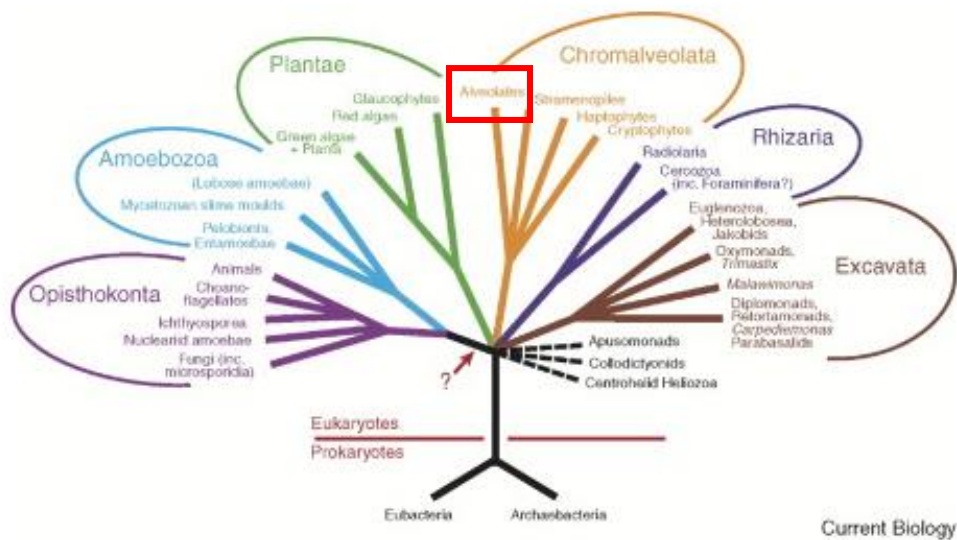


Figure 1: Arbre phylogénétique des six règnes des Eucaryotes, adapté de (Simpson and Roger, 2004). La classification est basée sur les données de phylogénétique moléculaire. La position de l'ancêtre commun hypothétique est indiquée par la flèche. Le groupe des Alveolates (encadré rouge).

Les Apicomplexes renferment plusieurs agents responsables de maladies vétérinaire et humaine telles que :

a. La babésiose

Aussi appelée fièvre de Nantucket, très présente en Amérique du Nord, elle affecte les mammifères sauvages et le bétail mais très rarement l'*Homme*. La maladie est provoquée par un *Babesia* (*B. divergens*, *B. microti* ou *B. divergens*) par l'intermédiaire d'une piqûre de tique (Ixodida). La physiopathologie de la maladie se manifeste par une anémie hémolytique. Chez les bovins, l'espèce impliquée semble généralement être *Babesia divergens* qui peut affecter des troupeaux entiers de bovins laitiers. Chez l'*Homme* en Europe et aux USA les patients les plus touchés sont porteurs d'une spléctomie.

b. La coccidiose

La coccidiose est causée par des parasites du genre *Eimeria*, qui se loge dans l'intestin des oiseaux, entraîne des hémorragies, des pertes de poids qui peuvent entraîner la mort. Ces parasites ont un fort impact sur l'économie de la filière aviaire.

c. La cryptosporidiose

La cryptosporidiose est une maladie intestinale grave chez les bovins et les oiseaux et peut être transmissible à l'*Homme* par les animaux domestiques. La maladie est causée par un parasite du genre *Cryptosporidium* dans les cellules épithéliales du tube digestif. Les symptômes chez l'*Homme* sont : diarrhée abondante, nausées, douleurs abdominales et faible fièvre. Le taux d'infection varie entre 0,6 % et 2 % dans les pays industrialisés contre 4 % à 32 % de la population dans les pays en développement.

d. Le paludisme

Le paludisme, aussi appelé malaria (du latin mal 'aria, « mauvais air »), est une maladie infectieuse due à l'infection par un parasite du genre *Plasmodium*, propagée par la piqûre du moustique femelle du genre Anophèle. L'Homme est l'hôte intermédiaire du parasite chez lequel se déroule la phase asexuée de son cycle. Au cours de cette phase le parasite infecte tout d'abord les cellules hépatiques ensuite érythrocytaires, entraînant leur lyse. La maladie se manifeste par des douleurs musculaires, maux de tête, forte fièvre et anémie pouvant entraîner la mort du patient. Il existe plusieurs espèces de *Plasmodium* pouvant infecter l'Homme: *Plasmodium vivax*, *malariae*, *ovale* et *falciparum* qui peuvent infecter l'Homme. Le *falciparum* est responsable de 80% des infections et de 90% des décès dans le monde. Selon l'OMS en 2013 sur 198 millions de personnes infectées, le paludisme a été à l'origine de 584 000 décès (avec une marge d'incertitude comprise entre 367 000 et 755 000), pour la plupart parmi les enfants africains. Des solutions médicamenteuses existent car le paludisme est une maladie dont on guérit lorsque la prise en charge hospitalière est rapide.

II. *Toxoplasma gondii*

En 1908 Simultanément, Charles Nicolle et Louis Herbert Manceaux de l'Institut Pasteur de Tunis et Alfonso Splendore à Sao Paulo au Brésil décrivent pour la première fois le parasite *Toxoplasma gondii*. Pour les premiers le parasite fut isolé lors d'une épidémie en laboratoire sur un rongeur sauvage d'Afrique du Nord le *Ctenodactylus gundi*. Pour le second sur des lapins morts en laboratoire. *Toxoplasma gondii* vient de « Toxoplasma » des termes grec *toxos* « arc » et *plasma* « forme ». De nouvelles espèces de ce même parasite vont être décrites chez différentes espèces animales dont l'Homme. Darling l'isole chez l'Homme en 1909, Janku en 1923 dans des kystes rétinien d'un enfant hydrocéphale. En 1937, premier cas de toxoplasmose congénitale humaine (encéphalomyélite chez un nouveau-né) par Wolf et Gowen. Ce n'est qu'en 1939 que Sabin et Olitsky apportent la preuve que toutes ces espèces correspondent à une seule et même espèce *Toxoplasma gondii*. Ils décrivent la symptomatologie de la toxoplasmose humaine, et émettent l'hypothèse

selon laquelle la différence de virulence est due aux différentes souches et au mode de contamination. Entre 1940 et 1942, les premiers cas mortels chez un *Homme* adulte sont référencés (Pinkerton et Weinman 1940 ; Sabin 1942). Sabin et Feldman mettent au point en 1948 le premier test immunologique (*Dye test*), qui permet le diagnostic sérologique de la maladie. Le cycle biologique sera finalement établi vers la fin des années 1960 par Hutchison et Work d'une part en 1965, et d'autre par Frenkel et Dubey en 1969.

La classification de *Toxoplasma gondii* est la suivante :

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

Espèce : *gondii* ; Nicolle et Manceaux, 1908

La plupart des souches de *Toxoplasma gondii* isolées en Europe et Amérique du Nord appartiennent à trois grandes lignées clonales ; Type I, Type II et Type III. Cependant d'autres lignées Atypiques (VAND, RAY, WTD3, GUY-KOE, P89, CASTELLS et COUGAR) ont été isolées en Afrique du Sud et en Amérique du Sud. Des croisements entre type I, II and III ont montré que la différence dans la virulence de ces types chez la souris peut s'expliquer par la combinaison allélique des gènes *rop18* et *rop5* (Melo et al., 2011). Ces gènes sont responsables de l'inhibition des GTPases (IRGs) induites par l'IFN λ . La différence allélique des gènes *rop16* et *gra15* est responsable de l'inhibition (Type I et III) ou l'activation (Type II) des voies de signalisations STAT et NFkB (Melo et al., 2011). La souche de type I est très virulente et entraîne rapidement la mort de l'animal, alors que les souches de type II et III sont plutôt kystogéniques et conduisent vers une infection chronique dans le cerveau et les muscles de l'animal infecté. Toutes les souches sont cultivées en laboratoire, celle pour laquelle nous disposons le plus d'outils génétiques est la souche RH (type I).

B. Le cycle de vie de *Toxoplasma gondii*

Le cycle de vie de *T. gondii* est très complexe comprenant une phase asexuée se déroulant chez un hôte intermédiaire (l'*Homme* ou tout autre mammifère) et une phase sexuée chez l'hôte définitif le chat (de la famille des *Felidae*). Au cours de ces phases, le parasite passe par différentes formes sporozoïte, tachyzoïte et bradyzoïte chez l'hôte intermédiaire ; mérozoïte (schizonte), gamonte et oocyste chez l'hôte définitif.

I. La phase sexuée

La phase sexuée se déroule dans les cellules épithéliales du tube digestif de l'hôte intermédiaire. Après ingestion de kystes toxoplasmiques lors d'un repas, la paroi kystique est digérée et libère les bradyzoïtes dans la lumière intestinale. Cette forme infecte très rapidement les cellules épithéliales et rentre dans un cycle de plusieurs divisions asexuées appelées schizogonie. Les schizontes résultant de ces divisions vont ensuite lysés les cellules et libèrent les mérozoïtes. Les mérozoïtes vont ensuite se différencier en gamétocytes mâle et femelle, après fécondation le zygote se transforme en oocyste. Cette dernière forme très résistante est larguée dans le milieu extérieur lors des défécations de l'hôte définitif. Lorsque cette forme est ingérée par l'hôte intermédiaire, cela conduit à une sporulation et à la libération de sporozoïtes infectants (Figure 2).

II. La phase asexuée

En général l'hôte intermédiaire se contamine par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire. Dans le tube digestif l'oocyste ingéré sporule et libère les sporozoïtes qui vont se transformer en tachyzoïtes, la forme virulente du parasite capable d'infecter tout type cellulaire nucléé. La dissémination rapide des tachyzoïtes dans l'organisme provoque une réponse immunitaire permettant d'éliminer une forte proportion des parasites. Cependant sous la pression du système immunitaire, une partie des tachyzoïtes se différencie en bradyzoïtes et s'enkystent dans les cellules musculaires et du système nerveux central ; ceci constitue la phase chronique de la maladie. Le bradyzoïte peut être réactivé et se différencier en tachyzoïte lorsque le système immunitaire de l'hôte est affaibli. Cette réactivation entraîne des dommages très graves au niveau des tissus nerveux pouvant entraîner des séquelles irréversibles ou la mort du patient (Figure 2).

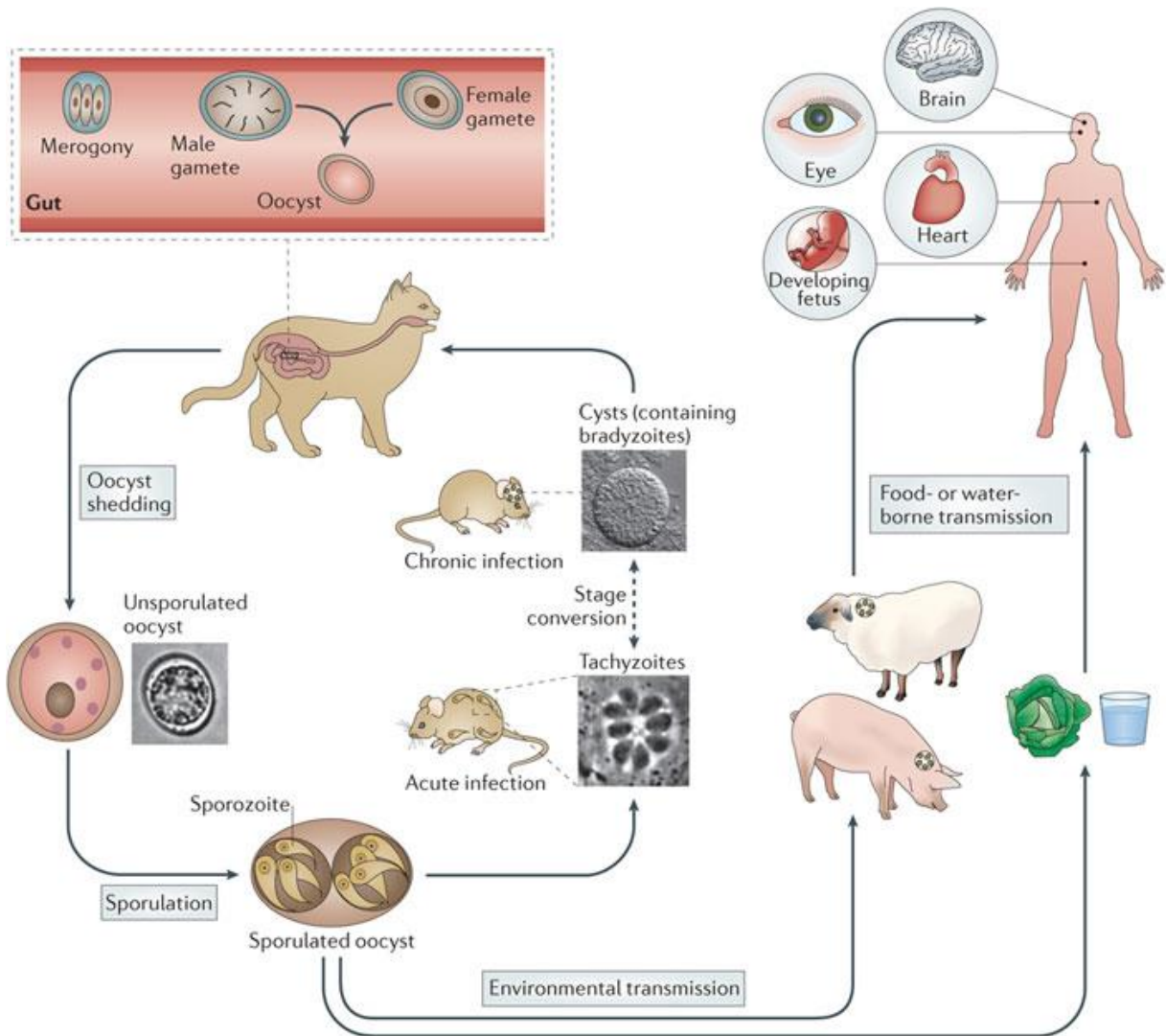


Figure 2: Cycle de vie de *Toxoplasma gondii*, adapté de (Nature reviews Microbiologie). A l'intérieure de la paroi intestinale du chat, le gamétocyte mâle et femelle fusionnent pour donner un oocyste non sporulé qui est rejeté lors des défécations de l'animal. Dans l'environnement extérieur, l'oocyste peut être ingéré par une souris, au sein de laquelle l'oocyste va rapidement sporuler en sporozoïtes, qui vont ensuite donner des tachyzoïtes très invasifs. Les tachyzoïtes vont provoquer l'infection aiguë chez la souris, et sous la pression du système immunitaire il y'aura une conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes qui vont s'enkyster dans le cerveau et les muscles ; c'est la phase chronique. Le chat peut se contaminer en ingérant une souris déjà contaminée. Dans le milieu extérieur les oocystes peuvent contaminer l'eau, les végétaux de culture et les animaux domestiques. C'est à travers ses aliments ou le contact direct avec les déjections du chat que l'Homme se contamine.

C. La toxoplasmose

I. Modes de contamination

La toxoplasmose est une infection parasitaire très répandue dans le monde, on estime que un tiers de la population mondiale est infectée par *T. gondii*. En général l'*Homme* peut être infecté par deux principales voies ; par la chaîne alimentaire ou transmission horizontale et transplacentaire.

Les aliments contaminés par des oocystes présents dans les déjections d'animaux infectés, ou le kyste toxoplasmique dans la viande mal cuite sont autant de voies de transmissions horizontales. Les oocystes sont très résistants dans le milieu extérieur ; ils peuvent très facilement contaminés les sols et l'eau. Les herbivores (mouton cabri..), porc, s'infectent par l'ingestion d'herbes. Le parasite va ensuite se retrouver dans la viande de ces animaux. L'*Homme* peut être contaminé par la consommation de viande mal cuite contenant des kystes, par consommation d'eau contaminée ou de produits frais mal lavés (fruits, légumes) ou directement à travers le contact avec les déjections du chat contaminé. Ce dernier mode de contamination en France est le plus répandu.

La transmission transplacentaire est la transmission au fœtus de tachyzoïtes qui ont pu traverser la barrière placentaire. Elle survient au cours de la grossesse entre le 13 et 36 mois. Les tachyzoïtes alors présents chez la mère infectée sont capables de traverser la barrière placentaire et infecter le fœtus dépourvu de système immunitaire propre.

II. La prévalence

La prévalence est variable d'un continent à l'autre. Très forte en Europe de l'Ouest (50 à 70%), moyenne en Europe du Sud et en Afrique humide (20 à 50%), faible en Europe du Nord (30%) et rare en Asie et en Amérique (McQuillan et al., 2004); (Jones et al., 2003). En France près de 45% des adultes ont déjà été infectés durant l'adolescence ou l'enfance ; 200 000 à 300 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Depuis les années 1980 le nombre des cas diminue progressivement grâce aux mesures de préventions prises par l'Institut de Veille Sanitaire (AFSSA, 2005).

III. L'infection et la réponse immunitaire

a. L'infection

L'infection par *T. gondii* peut se décomposer en deux phases : une phase aiguë au cours de laquelle les tachyzoïtes se disséminent rapidement dans les organes cibles tels que les muscles, le cœur et les poumons. Le parasite utilise ensuite de manière passive les cellules du système immunitaire pour atteindre le cerveau. Sous la pression du système immunitaire se déclenche la seconde phase dite chronique durant laquelle les bradyzoïtes vont s'enkyster dans les cellules du système nerveux central. La maladie est très souvent bénigne et les symptômes dans 10 à 20% des cas se manifestent par des faibles céphalées, maux de gorge, malaise, fièvre, et éruptions cutanées. Des symptômes plus sévères peuvent donner lieu à des myosites, myocardites, pneumopathies ou encore dans de rares cas des signes neurologiques. Lorsque le système immunitaire du patient est compromis ou absent il est possible d'avoir des complications si la prise en charge n'est pas rapide.

(1) Chez le fœtus et le nouveau-né. Les manifestations cliniques de la toxoplasmose congénitale sont sévères avant la 26ème semaine de grossesse (Dunn et al., 1999). En l'absence d'un système immunitaire mature, le parasite traverse la barrière placentaire et infecte le système nerveux central avec des signes non spécifiques incluant hydrocéphalie, retard mental, calcification intracrânienne, chorioretinite, ictère et parfois une atteinte de tous les organes. Dans certains cas l'infection peut provoquer l'avortement du fœtus.

(2) Les patients immunodéprimés, suite à un traitement immunosuppresseur (dans le cas d'une greffe d'organe) ou atteint par le VIH ; déclarent la toxoplasmose encéphalite due à une réactivation des kystes initialement présent dans le cerveau. Les bradyzoïtes se différencient en tachyzoïtes, se multiplient et cause des lésions grave dans le système nerveux central. L'infection peut aussi conduire à une toxoplasmose oculaire.

(3) La toxoplasmose oculaire. Elle se manifeste par la présence de flotteurs dans le liquide de l'œil et d'une diminution de l'acuité visuelle. L'infection du segment supérieur de l'œil, provoque des rougeurs, photophobie et douleurs. Il y'a alors une lésion active de la rétine qui devient crémeuse en apparence. La rétinite peut s'étendre à toutes les couches de la rétine et de la choroïde (Nussenblatt and Belfort, 1994) conduisant à une cataracte, un glaucome et même atteindre l'iris (Westfall et al., 2005). Chez les patients immunocompétents, l'inflammation de la rétine peut se résorber au bout de deux semaines, et conduire à une hyperpigmentation de l'œil due à la migration de pigments des cellules épithéliales de la rétine.

b. La réponse immunitaire

(1) L'immunité innée : *T. gondii* induit une réponse de type Th1 chez la souris, caractéristique de la production de IL-12 et IFN- γ essentiel pour le contrôle de l'infection (Butcher et al., 2001); (Reichmann et al., 2001). Une large variété d'effecteurs incluant les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles sont impliqués dans la production d'IL-12 (Reichmann et al., 2001). Un haut niveau d'IFN- γ est nécessaire aussi bien pour la phase aiguë que chronique de l'infection (Yap and Sher, 1999). La production d'IL-12 et l'activation d'IFN- γ jouent différents rôles et contribuent à combattre l'infection (Mordue and Sibley, 2003); (Robben et al., 2005). Ces mécanismes immunitaires conduisent à la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes et leur enkystement dans les muscles et le cerveau, au début de la phase chronique.

(2) L'immunité adaptative : Les lymphocytes B et les anticorps (IgM et d'IgG) ont été montrés comme essentiels à la réponse immunitaire contre *T. gondii* (Frenkel and Taylor, 1982); (Grimwood and Smith, 1992); (Hauser and Remington, 1981); (Couper et al., 2005). Les souris déficientes en lymphocytes B, après une injection intraoculaire de parasites, développent une inflammation oculaire contrairement à la souris sauvage (King et al., 2000). A long terme l'immunité est dépendante des lymphocytes CD4+ et CD8+ (Brown and McLeod, 1990); (Gazzinelli et al., 1991).

IV. Diagnostique et traitement de la maladie

a. Le diagnostique

Au moyen de prélèvement sanguin veineux et du suivie des IgG et IgM, il est possible de déterminer le statut de séroposivité et de connaitre la période de l'infection. Lors d'une infection la production d'IgM anti-*Toxoplasma* se déclenche en premier, suivie d'IgG qui va ensuite persister longtemps à un taux relativement bas et stable. La présence d'un taux bas et stable d'IgG et l'absence d'IgM va par exemple indiquer une infection datant d'au moins 2 mois chez le patient.

(1) Chez la femme enceinte, le diagnostic sérologique systématique est réalisé en France, afin de déterminer dès les premiers mois de la grossesse le statut sérologique de la femme. Le temps de l'infection est essentiel pour savoir si le fœtus est atteint ou pas. Lorsqu'une séroconversion est détectée chez la mère, le traitement est immédiatement mis en place.

(2) Chez le fœtus. Le diagnostic prénatal est fait par l'échographie directement suivi par un examen du liquide amniotique. L'échographie permet de détecter les défauts cités plus haut. De manière empirique lorsque la sérologie de la mère est positive, l'amniocentèse est très souvent réalisée après la 18eme semaine. La PCR sur le liquide amniotique permet de révéler la présence du parasite. Le diagnostic postnatal est plus facile qu'*in utero*, avec plus d'accessibilité aux échantillons comme le cordon ombilical, le placenta et le sérum. Ce diagnostic est aussi important pour déterminer un traitement, permettant d'éviter d'éventuels lésions oculaires plus tard dans la vie du bébé (Kodjikian et al., 2006).

(3) La toxoplasmose oculaire. Le diagnostic se fait par observation de l'œil permettant de voir très rapidement les manifestations cliniques décrites plus haut. Et prélèvement d'humeur aqueuse, puis détection d'anticorps anti-toxoplasme.

b. Le traitement

Les traitements actuels sont faits sur la base de tests *in vitro* et chez des modèles murins et les expériences des praticiens dans le traitement de la toxoplasmose. La thérapeutique standard est une combinaison synergique de deux molécules pyriméthamine et sulfonamide. La première est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase et la seconde un inhibiteur de l'acide dihydrofolique synthase impliqué dans le métabolisme de l'acide folique.

V. Conclusion

Il existe plusieurs types de *T. gondii* avec des niveaux de virulence plus ou moins forts, causant différents genres de toxoplasmose. La maladie est très présente dans la population mondiale et crée de sérieux problèmes de santé publique aussi bien dans les pays développés que dans les moins avancés. L'impact est aussi important dans la filière agricole, car le parasite est capable d'infecter de nombreuses espèces de bovins et d'ovins. Les traitements administrés sont efficaces si la prise en charge du patient est rapide. Cependant, depuis plusieurs années nous assistons à l'émergence de nouvelles souches résistantes aux traitements classiques. Ce phénomène n'est pas propre seulement à *T. gondii*, d'autres Apicomplexes tels que *P. falciparum*, aussi développent de telles résistances. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles drogues ou des vaccins efficaces pour lutter contre ces maladies.

Notre laboratoire travail sur la forme tachyzoïte du parasite de type 1. Nous disposons de souches modifiées permettant plus facilement de faire des modifications génétiques et d'étudier *in vitro* et *in vivo* les phénotypes. Dans un premier temps nous nous intéresserons à la biologie du parasite au sein de la cellule hôte, et dans un second temps au trafic vésiculaire au sein du parasite en nous basant sur des comparaisons entre Apicomplexes (*T. gondii* en particulier) et les cellules mammifères et *S. cerevisiae*.

Chapitre 2 : Contexte scientifique

A. Ultrastructure, invasion et développement du parasite au sein de la cellule hôte

I. Ultrastructure du tachyzoïte

La forme tachyzoïte du parasite est la forme la plus étudiée chez *T. gondii*, facile à cultiver et donne de très nombreux parasites *in vivo* comme *in vitro*. Le parasite présente une forme typique de croissant d'environ 2 μm de large sur 7 μm , plus effilé sur le pôle antérieur que postérieur (Figure 3).

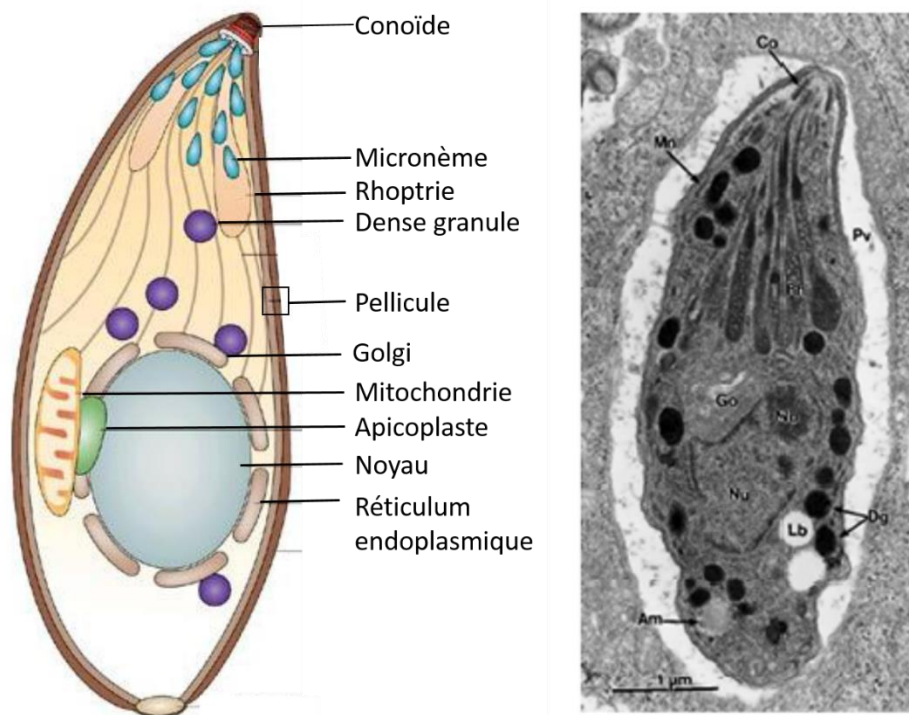


Figure 3: Ultrastructure du tachyzoïte de *Toxoplasma gondii*, adapté de (Dubey et al., 1998) et (Baum et al., 2006). A droite image de microscopie électronique d'un tachyzoïte intracellulaire; Co : conoïde ; Mn : micronème ; PV : vacuole parasitophore ; Rh : rhoptrie ; Go : Golgi ; No : nucléole ; Nu : noyau ; Lb : corps lipidique ; Dg : granules denses ; Am : amylopectine. A gauche : Schéma d'un tachyzoïte avec les principaux organites. La pellicule est constituée de la membrane plasmique et du complexe membranaire interne.

a. La pellicule

Le parasite est entouré de trois couches de membranes appelées pellicule :

(1) La membrane plasmique externe, une bicouche lipidique avec des ancrages GPI (Glycosyl-phosphatidylinositol) de glycoprotéines SAG (Surface Anti-gène) (Tomavo et al., 1989) ; (de Macedo et al., 2003). Ces protéines sont impliquées dans le processus d'attachement à la membrane de la cellule hôte (Mineo and Kasper, 1994), et la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Manger et al., 1998) ; (Dzierszynski et al., 2000) ; (Lekutis et al., 2001) ; (He et al., 2002).

(2) Le Complexe Membranaire Interne (IMC ou «inner membran complex») deux unités de membranes distantes de 15 nm, formées par la fusion de saccules provenant des membranes du réticulum endoplasmique ER du Golgi (Vivier and Petitprez, 1969). Du pôle apical au pôle basal l'IMC présente une structure discontinue, son organisation détaillée a été résolue au microscope électronique (Morrissette et al., 1997) ; (Porchet and Torpier, 1977). L'IMC joue un rôle central dans le processus de formation des cellules filles (Hu, 2008) ; (Sheffield and Melton, 1968). La face externe de l'IMC sert d'ancrage au complexe moteur actine-myosine (Glidéosome : Actine, MyoA, MLC, GAP45, GAP50) essentiel à la motilité et l'invasion (Dobrowolski et al., 1997); (Fréchal et al., 2010); (Ménard, 2001), alors que la face interne est intimement liée au cytosquelette sub-pelliculaire de microtubules et alveolines (Mann and Beckers, 2001); (Morrissette et al., 1997); (Nichols and Chiappino, 1987) (Figure 4).

b. Le cytosquelette

Le cytosquelette est formé de 22 microtubules (MT) en spirale d'un diamètre de 22 nm, recouvrant les 2/3 de la longueur du parasite (Nichols and Chiappino, 1987). Les pôles négatifs des MT sont ancrés au centre organisateur des microtubules (COMT) aussi appelé anneau apical. La polymérisation des MT se fait du pôle apical vers le pôle basal du parasite (Cyrklaff et al., 2007); (Nichols and Chiappino,

1987); (Russell and Burns, 1984). Le cytosquelette est très stable et confère la forme au parasite. Cette stabilité est due aussi à la présence de protéines associées aux microtubules (PAM) (Morrissette et al., 1997); (Morrissette and Sibley, 2002), telle que la protéine décrite récemment sub-pelliculaire microtubule protéine 1 (SPM1) (Tran et al., 2010). Les MT forment une structure en sac spiralé appelée conoïde, localisé au pôle apical exclusivement composé de tubuline- α . Enfin deux courts MT intra conoïdal servent à la sécrétion des protéines de sécrétion à partir du pôle apical durant le processus d'invasion (Carruthers and Sibley, 1997); (Nichols and Chiappino, 1987) (Figure 4).

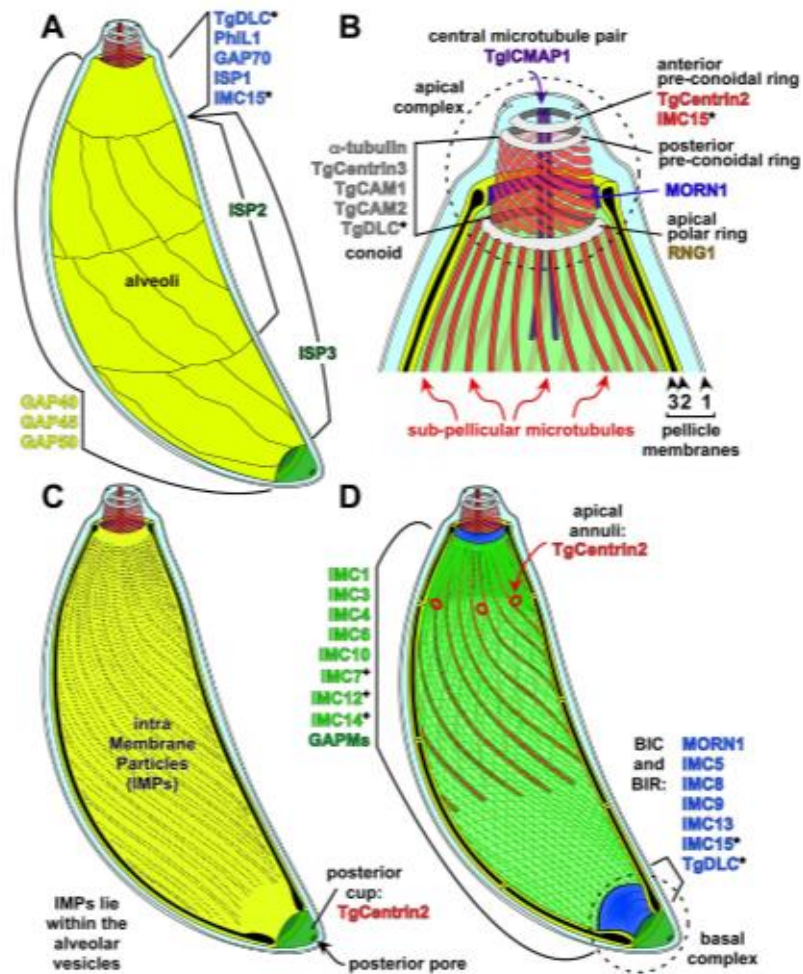


Figure 4: Schéma de la structure du cytosquelette de *T. gondii*, adapté de (Brooke Anderson-White et al., 2012). (A) sous-jacente à la membrane plasmique, les vésicules alvéolaires (en jaune). Une bande de vésicules alvéolaires forment une cape autour de l'apex du parasite et trois autres bandes de formes rectangulaires allongées sont en dessous de cette cape. Différentes protéines sont spécifiques des différentes régions alvéolaires. (B) Représentation du cytosquelette composé de 22 microtubule sub-pelliculaire. On peut aussi voir la structure spiralée du conoïde avec les différentes protéines présent. (C) Représentation des protéines IPMs liées aux alveolines. (D) Représentation de protéines de l'IMC.

a. Les organites classiques

Comme pour la plupart des cellules Eucaryotes, *T. gondii* possède un noyau avec une position basale ou centrale contenant un génome haploïde de 61,1 Mb reparti sur 14 chromosomes. L'enveloppe nucléaire est en continuité avec le réticulum endoplasmique (RE) qui s'étend dans le cytoplasme du tachyzoïte. Au-dessus de la face supérieure du noyau, le Golgi composé d'une seule citerne aplatie pour le cis-Golgi ; médian-Golgi et Trans-Golgi (Pelletier et al., 2002). Le parasite dispose de plusieurs mitochondries, de localisation et de taille variable disposant d'un ADN mitochondrial. Un organite appelé apicoplaste spécifique des Apicomplexes, dérivant des plantes, disposant également d'ADN. Il a été montré comme essentiel à la survie du parasite (He et al., 2001).

b. Les organites spécifiques

En plus de ces organites communs aux Eucaryotes, *T. gondii* possède des organites spécifiques aux Apicomplexes ; Micronèmes, Rhoptries et Granules Denses.

(1) Les micronèmes sont de petites tiges (250 x 50 nm) plus localisées dans la zone apicale derrière le conoïde. Le nombre de micronemes est très variable, d'une espèce à une autre, d'un stade parasitaire, ou de l'état de motilité du parasite ; chez le tachyzoïte on en trouve entre 50 et 100. La sécrétion du contenu des micronèmes est augmentée lorsque le parasite est en contact avec la membrane cytoplasmique de la cellule hôte (Carruthers and Sibley, 1997). Il a été montré que l'inhibition chimique de cette sécrétion affecte très fortement l'invasion des cellules hôtes (Carruthers et al., 1999). Le contenu des micronèmes a été déterminé par différentes approches (Soldati et al., 2001) ; (Tomley and Soldati, 2001), plus récemment par protéomique avec des gradients de purification d'organelles et de protéines excrétées (Bromley et al., 2003). La majorité des protéines de micronèmes sont des protéines avec de multiple domaines d'adhésines pouvant être classées en : Thrombospondin-1 type 1 domaine (TSR), Domaine d'insertion Intégrine, domaine PAN

(plasminogen, apple, nematode), EGF domaine, et Domaine Lectine (Carruthers and Tomley, 2008) . Il a été démontré que le trafic des protéines de micronèmes suit deux voies différentes aboutissant à deux populations distinctes d'organites micronèmes. La ségrégation de ces deux voies s'opère au niveau du compartiment endosomale et est assurée par les protéines Rab5A et Rab5C (Kremer et al., 2013).

(2) Les rhoptries au nombre de 6 ou 12, sont des bulbes allongés s'étendant à partir du conoïde jusqu'au noyau. En partant du conoïde, ils présentent une longue partie étroite « neck » de 2,5 nm contenant les protéines RONS et une région bulbair postérieure de 0,25 x 1 µm contenant les ROPs (Bradley et al., 2005). Le fractionnement cellulaire a permis l'identification de plus de 30 protéines de rhoptries (Leriche and Dubremetz, 1991); (Bradley et al., 2005), et des études préliminaires ont démontré la présence de lipides (Foussard et al., 1991). Les RONS et les ROPs sont spécifiques des Apicomplexes, certaines avec de faibles homologies avec des protéines d'Eucaryotes supérieurs. Ces protéines sont essentiellement des homologues de kinases, phosphatases et de protéases. Leurs rôles dans le processus d'invasion, lors de mise en place de la jonction mobile, la formation de la vacuole parasitophore et la modulation de la cellule hôte ont été clairement démontrés (Bradley and Sibley, 2007). La biogénèse de cet organite dérive de la maturation de pré-organites (pré-rhoptrie) eux-mêmes issus de la vésiculation du Golgi. Les fonctions de certains composants de la machinerie du trafic endo-lysosomal sont associées à la biogénèse de l'organite, laissant penser que cet organite de sécrétion dériverait du lysosome (Ngô et al., 2004).

(3) Les granules denses, ainsi appelées à cause de leur apparence en microscopie électronique (ME), ont une structure dense de microsphère d'un diamètre approximatif de 200 nm dispersée dans la cellule. Le contenu total de cet organite de sécrétion n'est pas encore connu. Néanmoins, différentes études ont permis l'identification et la caractérisation d'au moins 16 protéines GRA (Mercier et al., 2005), ne présentant aucune homologie avec des protéines connues. Les protéines GRA sont essentielles à la maturation de la vacuole parasitophore (VP), le transport de molécules à travers celle-ci, et à la

modulation des gènes de la cellule hôte (Persat et al., 2012) ; (Cesbron-Delauw et al., 2008) ; (Gold et al., 2015). Aujourd'hui la question se pose si il existe plusieurs populations différentes de protéines GRA (Mercier and Cesbron-Delauw, 2015). La grande majorité des protéines de granules denses possèdent un motif en position N-terminale clivé très tôt lors du transport à travers le RE. Des études ont montrées que chez *P. falciparum* que certaines protéines GRA exportées dans l'érythrocyte possèdent un motif PEXEL/VTG (Hiller et al., 2004) ; (Sargeant et al., 2006). Cependant, chez *T. gondii* la mutation de ce site montre qu'il n'est pas essentiel à l'exportation dans la cellule hôte (Hsiao et al., 2013). Un autre motif RRLAE conservé chez les deux Apicomplexes est clivé par une protéase *TgASP5*, et est essentiel à l'exportation de GRA16 et GRA24 dans le noyau de la cellule hôte (Curt-Varesano et al., 2015) (Figure 5). Toutefois, peu de choses sont connues sur le trafic et la formations des granules denses, et aucune granule dense immature n'a été observée à nos jours.

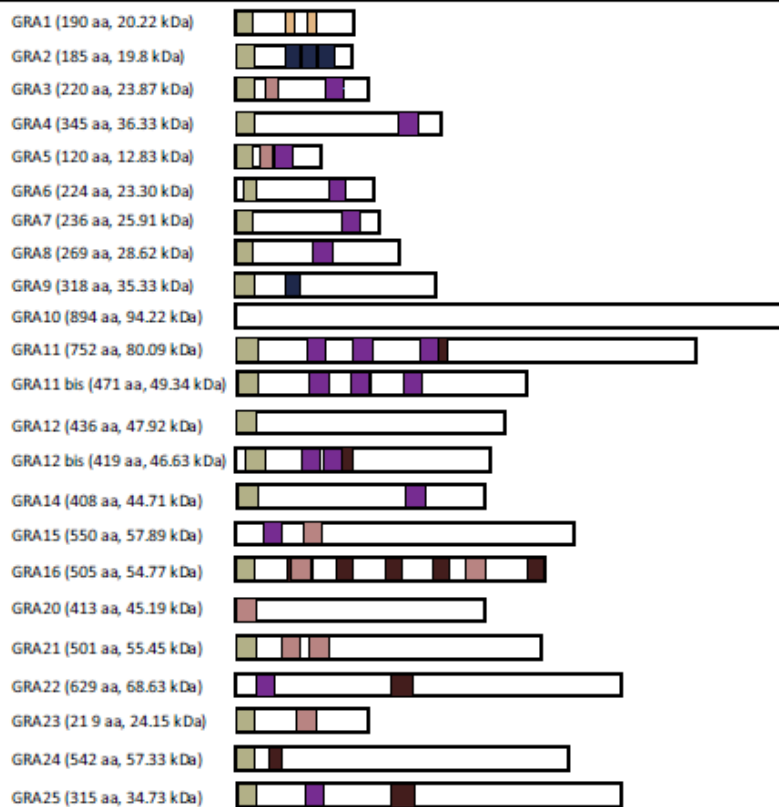


Figure 5: Représentation schématique des motifs peptidiques des protéines de Denses granules, adapté de (Mercier and Cesbron-Delauw, 2015). (En gris) le peptide signal ; (en beige) Ca²⁺-binding EF hand ; (en rose) le motif PEXEL ; (en violet) hélix alpha hydrophobe ; (en marron) le motif RRLAE de localisation au noyau de la cellule hôte ; (en bleu) hélix alpha amphi phatique.

a. L'invasion

(1) L'attachement aux récepteurs de la membrane plasmique externe de la cellule hôte, fait intervenir le rôle fonctionnel des protéines de micronèmes. La plupart de ces protéines possèdent un domaine extracellulaire et adhésine. MIC2 est capable de lier des protéoglycannes héparines 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 lectine (Blumenschein et al., 2007). Certaines protéines MICs, forment des complexes tels que *TgMIC3/TgMIC8* et interagissant avec du N-acétyl-glucosamine (Cérède et al., 2005) ; (Cérède et al., 2002) (Figure 6).

(2) La réorientation. Après avoir établi le premier contact avec la cellule hôte, le parasite va ensuite réorienter son pôle apical vers la membrane plasmique de la cellule hôte. Cette réorientation met en jeu le complexe moteur actine-myosine. Les protéines de micronèmes agissent pour la formation du complexe sous-membranaire « glidéosome », donnant la force nécessaire à la pénétration à travers la membrane plasmique de l'hôte (Kappe et al., 1999) ; (Jewett and Sibley, 2003) (Figure 6).

(3) La formation de la jonction mobile (JM), un élément clé dans le processus d'invasion. Elle permet la pénétration du parasite au sein du cytoplasme de la cellule hôte. La caractérisation de sa composition a été établie par immunoprécipitation ; elle comprend les protéines du « neck » rhoptrie RON2, RON4, RON5 and RON8 (Alexander et al., 2005); (Lebrun et al., 2005); (Besteiro et al., 2009); (Straub et al., 2009) qui sont secrétées et forment l'anneau de la JM. L'antigène majeur des micronèmes, AMA1 est présent dans la JM (Alexander et al., 2005). La formation de la JM nécessite une synergie des protéines de sécrétion RONS/AMA1 (Besteiro et al., 2009). Il a été récemment montré que durant cette étape, le parasite sécrète des protéines du bulbe des rhoptries et des granules denses. Ces protéines vont s'ancrer dans la vacuole parasitophore naissante ou dans le cytoplasme de la cellule hôte et modulent sa réponse immunitaire (Figure 6).

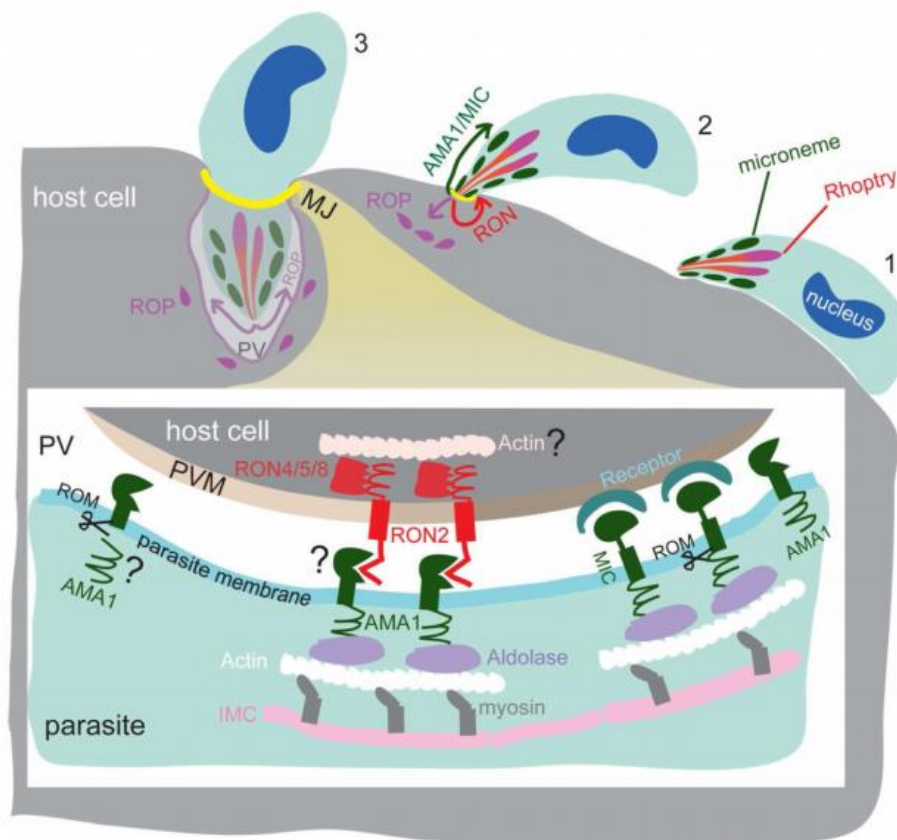


Figure 6: Schéma du processus d'invasion de la cellule hôte, adapté de (Shen and Sibley, 2012). (1) Attachement à la membrane plasmique de la cellule hôte ; (2) Réorientation du parasite et sécrétion des protéines du « neck » des rhoptries et des micronèmes AMA1/MIC, permettant l'initiation de la jonction mobile. A ce stade certaines protéines du bulbe des rhoptries sont directement secrétées dans le cytoplasme de la cellule hôte pour la modulation de ses réponses ; (3) Mise en place de la jonction mobile permettant la pénétration du parasite dans la cellule hôte avec formation d'une vacuole parasitophore. Entre l'IMC et la membrane plasmique se trouve le complexe moteur Glidéosome donnant la force motrice de l'invasion. Ancrer à la membrane plasmique du parasite les protéines AMA1/MIC en interaction avec les protéines RON qui sont elles-mêmes ancrées à la membrane plasmique de la cellule hôte.

(4) La vacuole parasitophore est la résultante de la membrane plasmique de la cellule hôte entourant le parasite après l'invasion. C'est un compartiment spacieux au sein duquel le parasite peut se diviser au centre avec un espace vacuolaire (Magno et al., 2005). Très rapidement cette vacuole subit des modifications, permettant la survie du parasite au sein du cytoplasme de l'hôte. Les protéines telles que ROP18 ancrées vont phosphoryler les IRG de la cellule hôte, et inhibent l'activation de l'INF- γ (Fentress et al., 2010); (Steinfeldt et al., 2010). ROP16 phosphoryle STAT3 et STAT6 dans le cytoplasme et maintient leur activation (Ong et al., 2010) ; (Yamamoto et al., 2009). Chez certaines souches exprimant GRA15, il a été montré que cette protéine est responsable de l'activation de la voie NF-kB et de la production d'IL-12 (Rosowski et al., 2011). Un réseau sous-membranaire se met en place grâce aux protéines GRA (Magno et al., 2005); (Lemgruber et al., 2008). La vacuole parasitophore va ainsi pouvoir recruter certains organites de la cellule comme le RE et les mitochondries (Magno et al., 2005) et constitue une membrane de passage de nutriments pour le parasite (Gold et al., 2015).

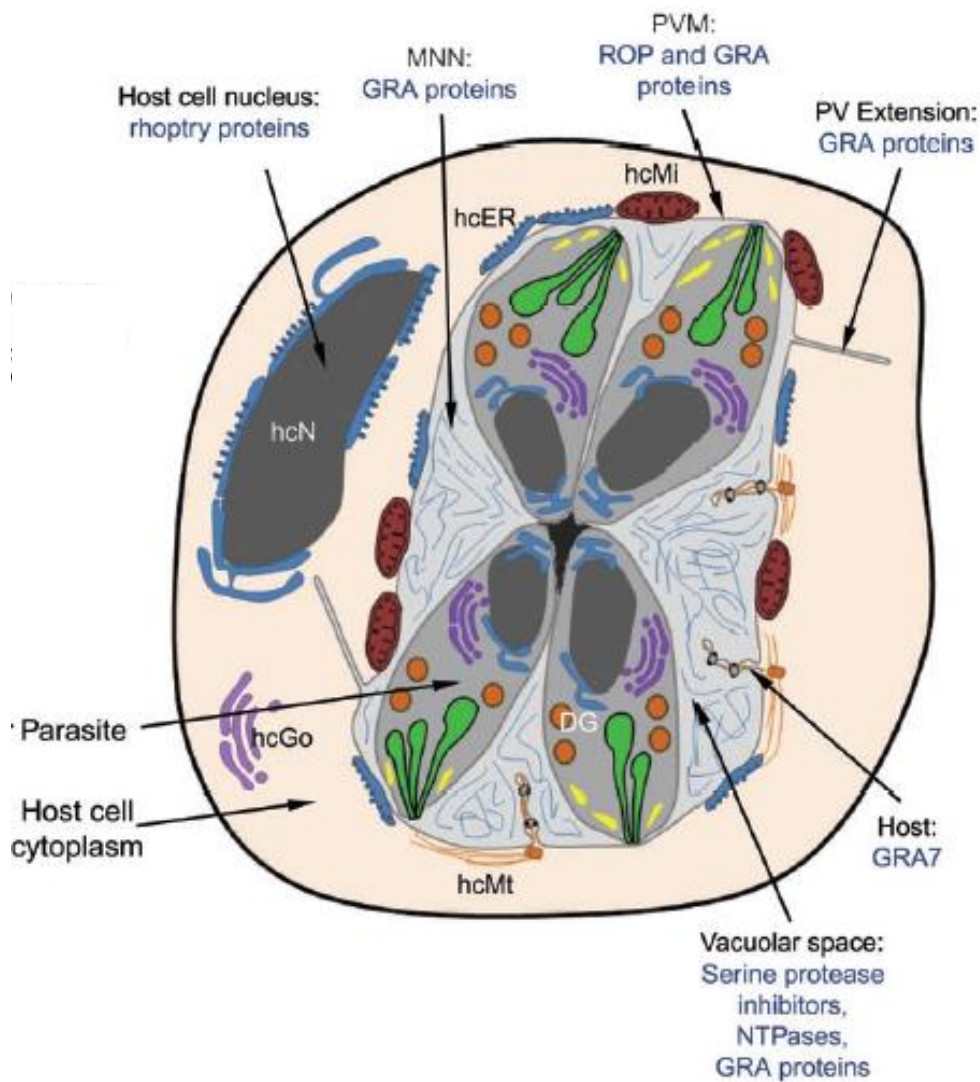


Figure 7 : Schéma de la vacuole parasitophore de *T.gondii* ; adapté de (Marie-France Cesbron-Delauw et al., 2008). Les parasites résident à l'intérieur de la vacuole parasitophore limitée par la membrane de la vacuole parasitophore (PVM). A l'intérieur de l'espace vacuolaire nous avons le réseau de nano tubules de la membrane (MNN) composé de différentes protéines de granules denses. L'espace vacuolaire contient aussi des inhibiteurs de serine protéase et NTPase. Les Hosts rassemblant les extensions et les invaginations de la PVM contiennent des microtubules de la cellule hôte (hcMt). Les protéines de rhoptries (Rh) et de granules denses (DG) sont secrétées dans l'espace vacuolaire, le MNN, les HOST la PVM et dans le noyau de la cellule hôte (hcN). DCG, dense core granules; ER, réticulum endoplasmique du parasite; Ex, exonèmes; FV, vacuole digestif; Go, appareil de Golgi du parasite; hcER, hcGo, hcMi, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et mitochondrie de la cellule hôte; Mc, micronèmes; N, noyau du parasite.

b. La réplication au sein de la cellule hôte

T. gondii utilise un mode de réplication appelé endodyogénie ; une simple mitose suivie de l'assemblage des cellules filles à l'intérieur même de la cellule mère et cytokinèse (Figure 8). Très tôt, le centriole et l'appareil de Golgi se scindent en deux. L'initiation de la cytokinèse commence avant même la fin de la mitose, ce qui reflète la complexité de l'assemblage et le temps nécessaire à son déroulement. Les cellules filles sont assemblées sur une charpente de MT polarisés, elle-même issue du cytosquelette et des composants membranaires. Le pôle apical est défini par l'anneau apical d'où émerge le COMT (Morrissette and Sibley, 2002) ; (Russell and Burns, 1984) ; (Dubremetz and Torpier, 1978). L'assemblage des cellules filles dépend très fortement de la proximité du centrosome (Sheffield and Melton, 1968), essentiel au positionnement du COMT et des composants membranaires. L'IMC se forme à partir des bourgeonnements du Golgi (Agop-Nersesian et al., 2010) et s'ancre au cytosquelette. La division du centrosome entraîne celle de l'appareil de Golgi (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). Les anneaux « *TgMORN1* » essentiels à la scission des cellules filles (Anderson-White et al., 2012) commencent à s'éloigner du pôle apical pour se diriger vers le pôle basal de la cellule mère. Les organites spécifiques micronèmes, rhoptries et granules denses sont de *novo* synthétisés et positionnés sur chaque cellule fille (Sheffield and Melton, 1968) ; (Nishi et al., 2008) ; (Ogino and Yoneda, 1966) (Bannister et al., 2000). Leur assemblage est facilité par la polarisation des voies de sécrétions chez les Apicomplexes. Les protéines des organites de sécrétion passent à travers le RE et l'appareil de Golgi en formant les pré-rhoptries; ou directement les micronèmes pour lesquels des pré-micronèmes n'ont jamais été identifiés jusqu'à ce jour (Shaw et al., 1998) ; (Di Cristina et al., 2000). Ainsi donc les voies de sécrétions classiques connues chez les mammifères et *S. cerevisiae* sont essentielles à la biogénèse des organites spécifiques des Apicomplexes.

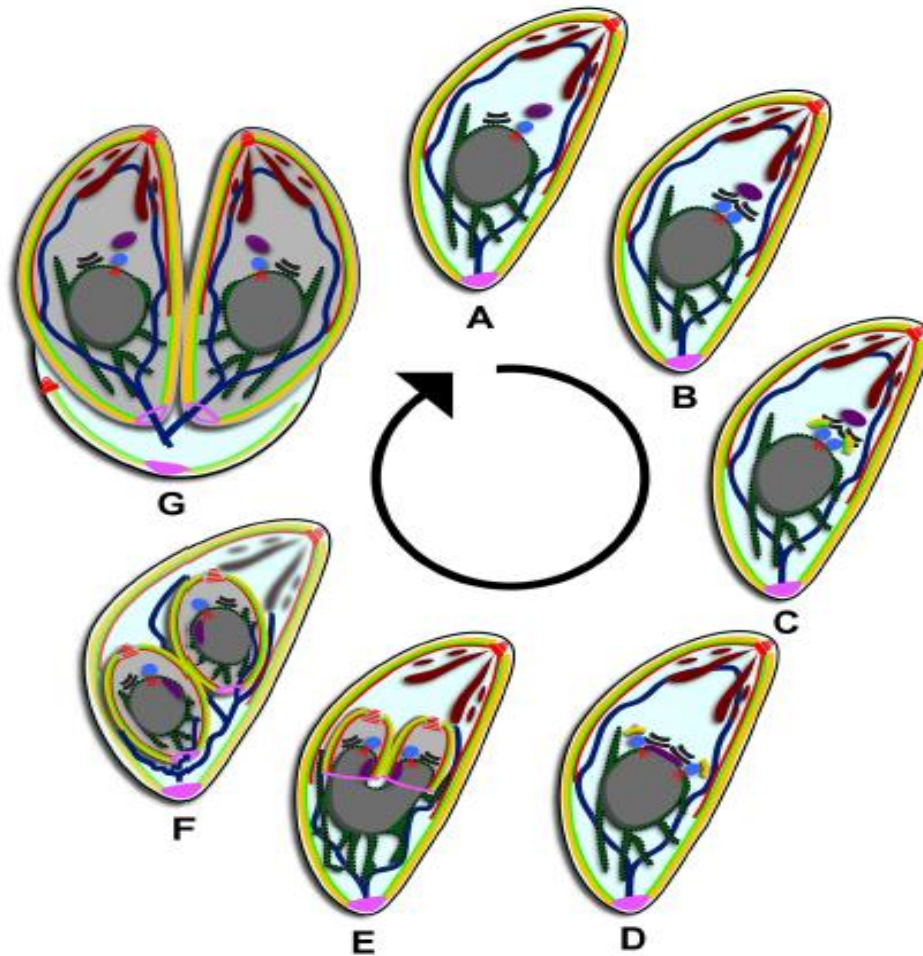


Figure 8: Schéma de la réplication chez *T.gondii*, adapté de (Anderson-White et al., 2014). La division se fait par endodyogénie. (A) maturation du parasite en G1. En rouge les microtubules MT (conoïde, la sous-pellicule et le pôle apical), en jaune les alveoli et en vert l'IMC. En marron les organites de sécrétion, les lignes bleu foncées la mitochondrie, en violet l'apicoplaste, bleu le centrosome, en noir le Golgi, vert foncé le RE, en gris le noyau, en rose le pôle basal. (B) la mitose est initiée en 1.2N avec la duplication du Golgi suivi de la duplication des centrosomes. (C) le bourgeonnement est initié avec l'apparition des composants précoces du cytosquelette. (D) le spindle pôle se duplique et l'apicoplaste migre sous le centrosome, et s'allonge en même temps que le centrosome se sépare. (E) les organites commencent à se répartir comme les filles bourgeonnent et s'allongent. (F) les filles bourgeonnent et se rassemble et tous les organites sont repartis à l'exception de la mitochondrie. Les organites de sécrétion et le cytosquelette de la mère se dégradent. (G) les filles émergent et la membrane plasmique de la mère est incorporée. De la mère, il persiste seulement que le corps résiduel basal.

II. Nécessité d'un trafic vésiculaire chez *T. gondii*

a. La voie antérograde

La voie antérograde chez les Eucaryotes supérieurs est la voie par laquelle, les protéines néo-synthétisées sont acheminées du RE via le Golgi, vers la membrane plasmique. Les mécanismes du trafic des protéines entre le RE et le Golgi des mammifères et des levures sont très conservés chez *T. gondii*. Comme chez les mammifères, le traitement du parasite à la bréfeldine A (BFA) inhibe l'activation des facteurs de ribosylation (ARF) 1 (Chardin and McCormick, 1999), essentielle au maintien du Golgi, de l'enveloppe nucléaire et le RE.

(1) RE vers le Golgi : COPII un complexe cytosolique composé d'une GTPase Sar1p et de deux hétérodimères Sec23p-Sec24p et Sec13p-Sec31p (Barlowe et al., 1994). Les protéines néo-synthétisées, vont se retrouver dans des vésiculations du RE, puis mantelé par le complexe COPII qui assure leur bon adressage au compartiment golgien. Les protéines SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) : v-SNARE (vésicule) et t-SNARE (cible) sont impliquées dans la spécificité de fusion des vésicules avec le compartiment cible. Le maintien du flot de membrane entre le RE et le Golgi, nécessite un retour des composants membranaires. Ce processus est assuré par le complexe COPI composé d'une protéine ARF-GTP pour l'association avec la membrane golgienne, et des protéines COP α ; β ; β' ; γ ; δ ; ϵ ; ζ , pour la formation du manteau sur la vésicule (Figure 9). Une étude a montré que comme chez les mammifères les motifs cytosoliques KKXX et DXE, essentiels aux transports Golgi-RE par COPI et RE-Golgi par COPII sont présents chez *T. gondii*. Cependant les motifs permettant le maintien des protéines néo-synthétisées dans le RE diffèrent chez le parasite (Hoppe and Joiner, 2000).

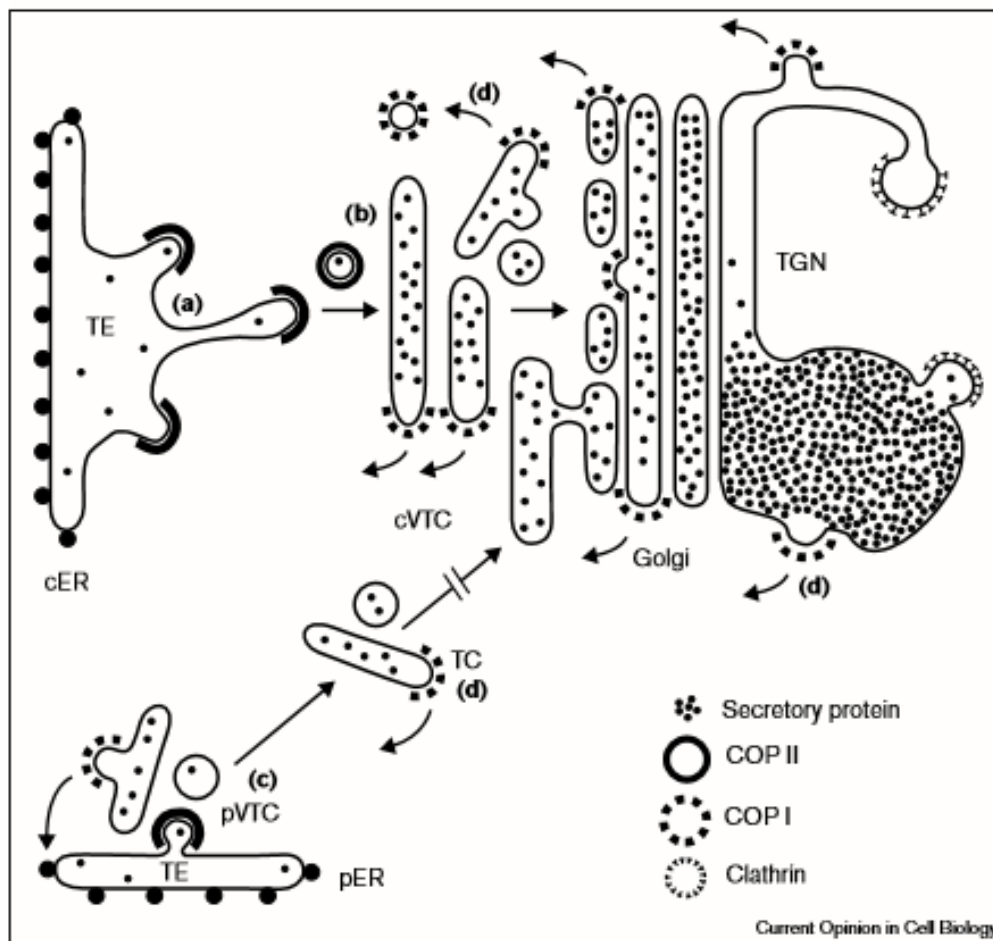


Figure 9: Transport antérograde, adapté de (Judith Klumperman, 2000). (a) après leurs synthèses les protéines de sécrétion sortent du ER à partir d'éléments de transition libre de ribosomes (TE), présents au centre (cER) et à la périphérie (pER) de la cellule. Pour les protéines de sécrétion, la sortie peut se faire par paquet de bourgeonnements et vésiculations grâce au complexe COPII. (b) les vésicules COPII perdent ensuite leur manteau, fusionnent et forment un groupe de vésicules tubulaires (VTCs). (c) Drainage des régions lointaines du ER se produit à partir de TE périphériques fixes, relativement petites PVCS. De ces PVCS, se forment des complexes de transport (TC) se déplaçant le long des microtubules jusqu'au cis-Golgi. (d) spécifiquement à partir des VTC mais aussi du Trans-Golgi-network (TGN), les vésicules COPI se forment. Ce complexe est impliqué dans le transport rétrograde et permet le recyclage des membranes entre l'ER et le Golgi.

(2) Golgi vers les endosomes : Notre laboratoire a démontré que le récepteur transmembranaire de type1, *TgSORTLR* (*Toxoplasma gondii* Sortilin-Like Receptor) localisé au TGN (Trans-Golgi Network) est un facteur clé dans la sortie des protéines de rhoptries et de micronèmes vers les compartiments supérieurs. La *TgSORTLR* est essentielle à la biogenèse de deux des trois organites sécrétoires des Apicomplexes (Sloves et al., 2012). En revanche, aucun mécanisme précis régissant la sortie des protéines GRA vers les granules denses n'a été décrit de nos jours. La protéine DrpB appartenant à une famille des dynamines est spécifique aux Alveolates. Elle est essentielle au mécanisme de scission de vésicules adressées à la biogenèse des micronèmes, rhoptries et granules denses (Breinich et al., 2009). La clathrine est un complexe protéique cytosolique formant un manteau autour des vésicules entre les TGN et le compartiment endosomale (Liu et al., 1995) ; (Wang et al., 2013). L'unité fonctionnelle est représentée par le trikélium formé par trois branches hexamériques. Un gène *CHC1* a été identifié chez *T. gondii*, et la protéine est exclusivement localisée entre le TGN et les endosomes. Contrairement aux mammifères, l'absence de clathrine au niveau de la membrane pose la question de l'endocytose chez le parasite. La clathrine par elle-même est capable de s'associer aux membranes des vésicules. Pour la spécificité d'adressage, la clathrine s'associe avec des protéines adaptatrices AP1, AP2, respectivement au TGN et à la membrane plasmique chez les mammifères (Hirst and Robinson, 1998). Cependant, de ces deux complexes seul AP1 est bien conservé et localisé entre le TGN et l'ELC chez *T. gondii* (Nevin and Dacks, 2009) (Tomavo et al., 2013). Le complexe AP3 retrouvé chez *Plasmodium* est exclusivement au TGN et sera impliqué dans la biogenèse dans organites apicaux (Fomovska et al., 2012). AP4 et AP5 présent chez les mammifères ne sont pas bien conservés chez les Apicomplexes (Nevin and Dacks, 2009). Les protéines tels que les Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCORT) sont elles aussi mal conservées dans le phylum, néanmoins, on retrouve la sous-unité Vps4 des ESCORT III chez *P. falciparum*, localisée dans le MVB. Et lorsque le gène *PfVps4* est introduit chez *T. gondii*, la protéine se localise dans les endosomes précoces (Yang et al., 2004).

(3) Des Endosomes vers les organites apicaux : dans les compartiments endosomaux, la plupart des protéines des micronèmes et de rhoptries subissent une maturation protéolytique. *T. gondii* possède un compartiment acide appelé VAC,

qui pourrait être homologue du lysosome chez les mammifères. Le VAC contient des protéases du type cathepsines intervenant dans la maturation des ROPs et des MICs. Il existe donc chez *T. gondii*, une convergence entre les voies endocytiques et exocytiques au sein du compartiment endosomale (Parussini et al., 2010). De plus la microscopie électronique révèle la présence d'un autre compartiment semblable à la vacuole chez les plantes (Miranda et al., 2010) ; (Francia et al., 2011). La PVL, pour « Plant Vacuol-like » contient des pyrophosphatases *TgVP1*, des cathepsines *TgCPL*, des aquaporines *TgAQP1*. Les liens morphologiques et fonctionnels entre le VAC et la PVL ne sont pas encore complètement démontrés. L'ensemble des compartiments spécifiques VAC et PVL et des compartiments classiques endosomes précoces et tardifs prend le nom d' « Endosomal-Like Compartment ou ELC » chez *T. gondii*. Les complexes endosomaux CORVET (class C core vacuole/endosome tethering) et vacuolaire HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) (Nickerson et al., 2009) ; (Peplowska et al., 2007), (Seals et al., 2000) sont essentiels pour la transition des endosomes, la maturation des lysosomes et le trafic endo-lysosomal (Ostrowicz et al., 2010) ; (Solinger and Spang, 2013). Une étude récente a démontré que la Vps11, protéine clé des deux complexes est essentielle à la biogenèse des organites apicaux (Morlon-Guyot et al., 2015). Chez les mammifères les complexes CORVET et HOPS interagissent respectivement avec Rab5, le marqueur des endosomes précoces et Rab7, le marqueur des endosomes tardifs. Chez *T. gondii* 15 gènes codants pour des protéines Rabs ont été identifiés. La plupart de ces protéines résidents dans les compartiments golgien et ELC. La surexpression des protéines Rab2, 4, 5A, et 5C, affectent la croissance du parasite. En effet, la déplétion des protéines Rab5A et Rab5C localisées dans les endosomes précoces, montrent un effet drastique sur la localisation des protéines de rhoptries et sur une population des protéines de micronèmes MIC3, MIC8, MIC11 (Kremer et al., 2013), ce qui démontre que la ségrégation dans le transport des protéines apicales s'opère au niveau de l'ELC, et est assurée par les fonctions des GTPases Rabs chez *T. gondii*. Concernant la maturation des pré-rhoptries en rhoptries matures, peu de données sont disponibles. Néanmoins deux hypothèses sont admises : Pour la première, l'organite mature se forme à partir des vésiculations et fusion de membranes provenant des pré-rhoptries pouvant faire intervenir plusieurs mécanismes de reconnaissance des lipides ; dans la seconde le pré-organite s'allonge et mature directement en rhoptrie. Cependant aucun pré-micronème n'a été observé jusqu'à nos jours.

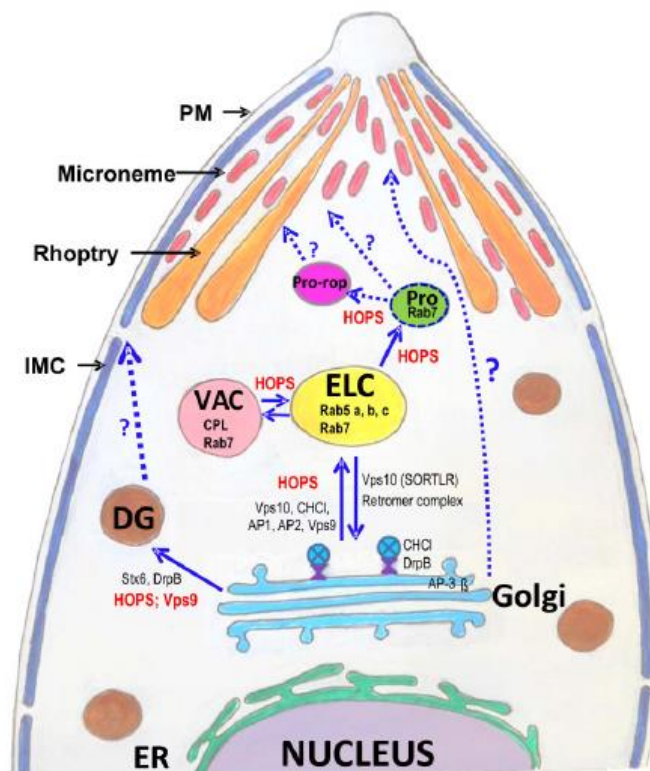
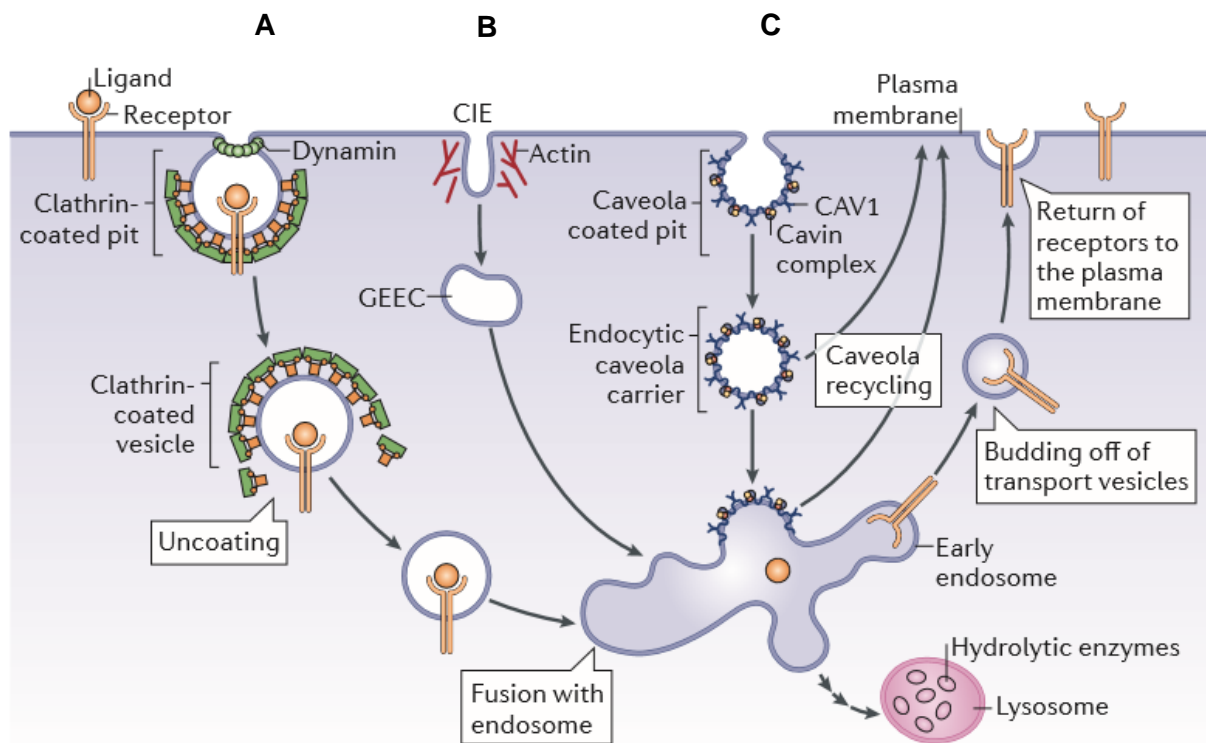


Figure 10: Facteurs moléculaires du trafic vésiculaire chez *T. gondii*, adapté de (Juliette Morlon-Guyot et al., 2015). Au niveau du Golgi nous avons le complexe AP-3, la *Tg*SORTLR essentielle à la sortie des protéines de rhoptries et de micronèmes du compartiment golgien, la clathrine permettant la vésiculations avec les complexes AP1, AP2 ; et la dynamine DrpB impliquée dans la scission de ces vésicules. Le complexe HOPS assure la fusion des vésicules entre les différents compartiments golgien, ELC (jaune), VAC (rose) et les pré-organelles (vert et violet). La Stx6 est impliquée dans la sortie des granules denses à partir du Golgi. Les voies non encore identifiés sont en pointillées. AP, Protéine adaptatrice; CHC1, Chaîne lourde de clathrine 1; CPL, protéase cathepsine; DG, dense granule; DrpB, dynamine B; ELC, « endosomal-like compartment »; ER, Réticulum endoplasmique; IMC, complexe membranaire interne; MIC, micronème; PM, membrane plasmique; Pro, pré-rhoptries et probablement les organites immature de micronème; Rab, Rab7-GTPase; Stx6, syntaxine 6; TGN, « trans-Golgi network »; VAC, Compartiment vacuolaire; Vps, Protéine vacuolaire de sortie.

b. La voie rétrograde

Chez les mammifères et la levure, la voie rétrograde est l'ensemble des mécanismes permettant le recyclage de molécules vers le Golgi et la membrane plasmique.

(1) L'endocytose, c'est l'un des mécanismes de base du trafic vésiculaire, consistant à une invagination de la membrane plasmique résultant de l'internalisation de molécules extracellulaires (Trousdale and Kim, 2015). Généralement l'invagination est clathrine dépendante (AP2), mais il existe aussi des mécanismes d'invaginations non dépendantes de la clathrine faisant intervenir la protéine Endophiline-A2 (EndoA2) dans la scission de vésicules (Renard et al., 2015). Il existe aussi de l'endocytose avec un manteau calveola composé de protéines appelées Cavin (Cav1) (Johannes et al., 2015). Les cargos dans les voies endocytiques peuvent contenir des nutriments, des molécules de signalisations et des toxines. Dans le cas de la dégradation de molécules, les vésicules cheminent du compartiment endosomal précoce Rab5 positif via le compartiment positif pour Rab7 et finissent dans les lysosomes matures ou la vacuole digestive, contenant des enzymes protéolytiques. Cependant, chez *T. gondii* aucun mécanisme d'endocytose classiquement dépendant de la clathrine, similaire à ce qui est connu chez les mammifères n'a été décrit jusqu'à nos jours. Néanmoins, tout récemment il a été décrit que le parasite était capable d'ingérer et de digérer dans son cytosol des protéines solubles initialement présentes dans le cytosol de la cellule hôte (Dou et al., 2014). Toutefois, les mécanismes impliqués dans l'entrée des protéines cytosoliques de la cellule hôte dans les parasites ne sont pas encore connus.



Part c of the figure adapted from REF. 85, Nature Publishing Group.

Figure 11: Mécanismes d'endocytoses chez les cellules mammifères, adapté de (Johannes et al., 2015). (A) La polymérisation de la clathrine conduit à la déformation de la membrane et sa constriction. L'activité GTPase de la Dynamine permet la scission de la vésicule. Après la formation de la vésicule le manteau clathrine se détache, permettant sa fusion avec le compartiment endosomale. (B) Le CIE ; endocytose indépendante de la clathrine ou (Clathrin independent endocytosis), mécanisme d'endocytose faisant intervenir les lectines et la polymérisation de filaments d'actines. (C) Les caveolae sont générés par des protéines intégrées à la membrane, appelées cavéolines (tels que CAV1) composés de trois ou quatre protéines Cavin. Elles permettent l'entrée des récepteurs, les vésicules formées peuvent fusionner avec les endosomes, et les caveolae sont ensuite recyclées vers la membrane plasmique.

(2) La voie de recyclage permet le retour essentiel de certains récepteurs transmembranaires ou transporteurs des endosomes tardifs vers le TGN, ou des endosomes tardifs vers la membrane plasmique. Chez les mammifères et la levure, le recyclage est assuré par un complexe protéique très important appelé complexe Retromer, composé de protéines Vps (Vacuolar protein sorting) 26, 29 et 35 et de protéines Sorting Nexin (SNX), (Seaman et al., 1998). Le complexe Retromer assure la reconnaissance du cargo et du transporteur et l'adressage de la vésicule vers le compartiment cible.

B. Le complexe Retromer chez les Mammifères et *S.cerevisiae*

I. La composition du complexe Rétromère

Le complexe Rétromère a été décrit pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae*, comme un complexe Hétéro-pentamérique entre un trimère Vps26, Vps29, Vps35 (le Complexe de Reconnaissance du Cargo : CRC) et un dimère de sorting nexin de Vps5 et Vps17 (Seaman et al., 1998). Dans la cellule mammifère il existe plusieurs protéines de SNX (SNX1, SNX2, SNX5, SNX6) utilisées dans le complexe (Bonifacino and Hurley, 2008), (Farias et al., 2014), (Griffin et al., 2005); (McGough and Cullen, 2011).

a. Le complexe de reconnaissance du Cargo (CRC)

Comme chez les mammifères et *S. cerevisiae* Vps26, Vps29, et Vps35 forment le complexe de reconnaissance du cargo (CRC), extrêmement bien conservé dans l'ensemble des Eucaryotes.

(1) Vps26 est une protéine contenant un domaine N-terminal arristine, domaine présent dans la famille de protéines incluant DSCR3 (Down syndrome critical region) (Shi et al., 2006). DSCR est codé par un gène associé à la trisomie 21 caractéristique des syndromes de Down's et maladies associées (Hu et al., 2006). Le génome de *S. cerevisiae* code pour un gène Vps26, alors que celui de *l'Homme* code pour deux isoformes protéiques Vps26A et Vps26B (Kerr MC et al., 2005). L'analyse structurale au rayons-X montre que ces deux isoformes sont semblables, avec une structure en deux lobes, C-terminal et N-terminal, et un corps polaire caractéristique de la famille des arristines (Shi et al., 2006) ; (Collins et al., 2008) (Figure 12). Le domaine arristine peut changer de conformation par activation, les deux lobes s'ouvrent et exposent le corps polaire du domaine. Toutefois, cette conformation ouverte n'a pas été observée lors des études cristallographiques, et la question se pose

sur la possibilité que Vps26 soit capable de faire ce changement de conformation (Bonifacino and Hurley, 2008). Les deux isoformes Vps26A et Vps26B sont capables d'interagir avec Vps35 grâce à leurs lobes C-terminaux (Shi et al., 2006) ; (Collins et al., 2008). Bien que très homologues (80% d'homologie de séquence) avec les mêmes fonctions, les deux isoformes présentent des différences sur leur capacité d'interaction avec certains partenaires du Rétromère (Bugarcic et al., 2011) and (Kerr et al., 2005). Par exemple dans une CRC contenant Vps26B, interagit avec la Golgi phosphoprotéine 3 (GOLPH3), la protéine TBC1D5 de la famille des TBC1, mais pas avec le manose-6 phosphate récepteur (CI-M6PR) ; Vps26A par contre interagit avec ce récepteur bien connu (Bugarcic et al., 2011). Il est probable que ces différences soient dues à l'adaptation du complexe aux différents types cellulaires, cargos et stades de développements (Trousdale and Kim, 2015).

(2) La structure cristalline de Vps29 montre des repliements correspondant à une métallophosphoesterase (Hierro et al., 2007) (Figure 12). Il a été montré que ce domaine est capable d'interagir directement avec des ions divalents (Collins et al., 2005). Cependant, l'activité phosphoesterase est absente, car le résidu histidine nécessaire à cette activité est remplacé par un résidu phénylalanine. Cette région d'affinité avec les ions divalent apparaît être celle régulant l'interaction Vps29-Vps35 (Hierro et al., 2007). Aussi, des mutations dirigées dans cette région démontrent, qu'elle renferme les sites de fixations aux SNX (Collins et al., 2005).

(3) La protéine Vps35 : Environ 300 acides aminés du coté C-terminal (soit environ 40% du C-terminal) de Vps35 ont été cristallisés en interaction avec Vps29 chez l'*Homme*. Cette structure cristalline révèle un repliement α -solénoïde, et des études bio-informatiques guidées par la cristallographie montrent que cette structure en α -solénoïde s'étend sur toute la longueur de la protéine (Hierro et al., 2007) (Figure 12). Vps35 ressemble à d'autres protéines à hélice solénoïde, importante dans la formation de manteau sur les vésicules

telles que le complexe AP-1. La partie C-terminale de Vps35 est composée d'une seule super-hélice droite faite de 13 hélices avec un espace de 12\AA entre les hélices. Le domaine N-terminal contenant le motif PRLYL est responsable de l'interaction avec Vps26 en position 'trans' par rapport à Vps29 (Hierro et al., 2007) ; (Gokool et al., 2007). Chez *S.cerevisiae* Vps35 interagit avec les cargos Vps10 et DPAP-A ou Stet-13 (dipeptidylaminopeptidase) (Nothwehr et al., 1999) ; (Nothwehr et al., 2000), et il est important de souligner qu'à l'extrémité du N-terminal de Vps35, se trouvent des sites d'interactions avec les SNX, suggérant que Vps26 Vps35-Vps29 interagissent avec les membranes de manière parallèle (Gullapalli et al., 2004) ; (Seaman and Williams, 2002).

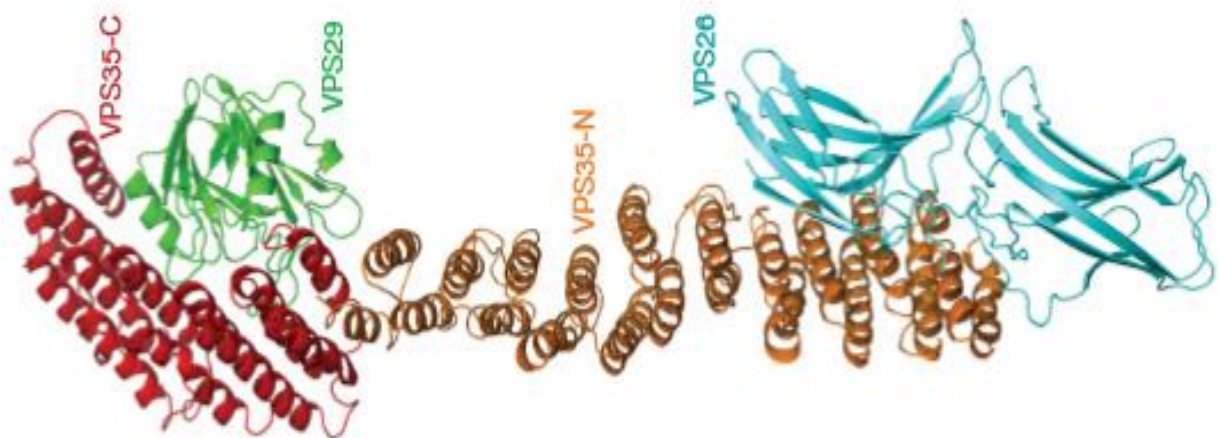


Figure 12: Schéma de la structure en cristallographie du CRC, adapté de (Hierro et al., 2007). En Vert Vps29 en interaction avec le coté C-terminal de Vps35 en rouge. Vps26 en bleu en interaction avec la région N-terminale de Vps35 en marron.

b. Les « sorting nexin » (SNX)

Le dimère permettant l'attachement du Rétromère aux membranes est plus ou moins bien conservé chez les Eucaryotes. Chez *S. cerevisiae* nous avons Vps5 et Vps17 formant le couple, alors que chez les métazoaires nous avons plusieurs couples à partir de SNX1, SNX2, SNX3, SNX5, et SNX6 (Griffin et al., 2005); Haft et al., 2000 ; (Seaman et al., 1998) ; (Strochlic et al., 2007). Ces protéines contiennent deux importants domaines : un domaine phox homologie (PX) (Song et al., 2007) et un domaine BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) (Bonifacino and Hurley, 2008) ; (van Weering et al., 2012). Le domaine PX a la capacité d'interagir avec l'un des phospholipides le plus présent dans les membranes des endosomes, le phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P ou PI3P) (Gillooly et al., 2000). La fixation du domaine PX sur le PI3P des membranes agit comme un ancrage à partir duquel la courbure des membranes est initiée par le dimère (Griffin et al., 2005) ; (Seaman and Williams, 2002). Le domaine BAR quant à lui a deux fonctions : la dimérisation et la courbure des membranes (Bonifacino and Hurley, 2008) ; (van Weering et al., 2012) (Figure 13 A). Les « sorting nexin » peuvent être divisées en trois classes, hiérarchiquement par la présence du domaine PX (Cullen, 2008) : SNX-PX défini par la seule présence du domaine PX ; SNX-BAR en plus du domaine PX en N-terminal avec la présence du domaine BAR en C-terminal ; et SNX-autres possédant un autre domaine en C-terminal autre qu'un domaine BAR. Les domaines C-terminaux des deux SNX ont la capacité d'interagir avec l'opposé du C-terminal de l'autre conduisant ainsi à la dimérisation (van Weering et al., 2012). Le couple ainsi formé avec la fixation de PI3P induit la courbure de la membrane, et la présence de plusieurs couples permet la formation des tubules de membranes (Griffin et al., 2005) ; (Seaman and Williams, 2002) (Figure 13 B).

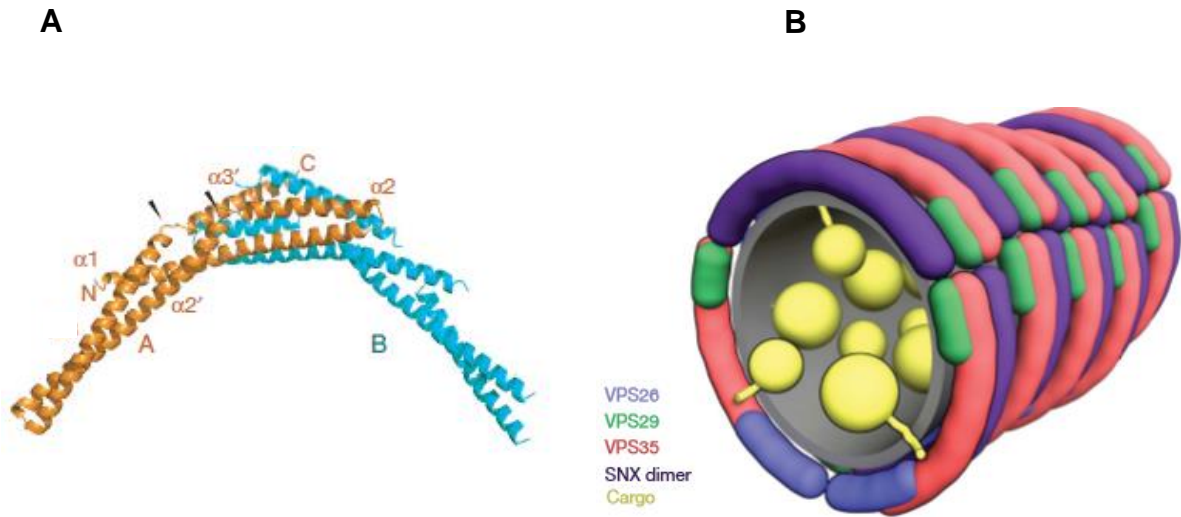


Figure 13: Modèle d'un homodimère de SNX1-BAR et schéma du tubule de Rétromère, adapté de (van Weering et al., 2012) (Hierro et al., 2007). (A) Modèle de ruban de l' homodimère SNX1 -BAR. Le monomère A est représentée en orange ; avec son N-terminal et C-terminal ; et les quatre hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 2'$, $\alpha 3$, $\alpha 3'$. Le monomère B en bleu. Pointes de flèches noires marquent les pauses non - standard dans les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du domaine BAR.

II. Fonctions, cargos et protéines accessoires du Rétromère

a. Les protéines accessoires du Rétromère

(1) Le mode de recrutement du complexe Rétromère sur les membranes diffère d'une espèce à l'autre. Il est souvent admis que le CRC est le premier à être recruté sur les membranes des endosomes tardif (Harbour et al., 2010), ou que le dimère de SNX est recruté avant le CRC (van Weering et al., 2012). Pour la première hypothèse, en l'absence de motif de fixation avec les membranes, le recrutement du CRC se fait via l'interaction de Vps35 avec Rab7 présente sur les membranes des endosomes tardifs. Rab7 régule le recrutement du Rétromère sur les membranes, cette interaction entre le Rétromère et Rab7 a été montrée par des expériences d'immunoprécipitations chez *S. cerevisiae* et de délétion permettant de localiser la région de fixation de Rab7 sur Vps35 (Liu et al., 2012). De plus, la SNX3 semble intervenir dans le recrutement du CRC aux membranes en fixant le CRC en synergie avec Rab7 (Harrison et al., 2014). Le CRC interagit aussi avec des protéines GAP (GTPase-Activating Proteins) comme les TBC1D5 impliquées dans la fine régulation de Rab7 (Seaman et al., 2009).

(2) Le processus de scission des tubules nécessite la présence de filaments d'actine. Pour cela le complexe Rétromère recrute un autre complexe appelé WASH impliqué dans la polymérisation des filaments d'actines. Le WASH est composé de FAM2, SWIP, Strumpellin et CCD53 (Gomez and Billadeau, 2009) ; (Derivery et al., 2009).

(3) Le transport des tubules se fait grâce à un moteur microtubule dynéine. Les SNX dans le cas de *S. cerevisiae*, Vps17 s'associe avec p150^{glued} un composant de la dynactine. Comme pour la plupart des complexes à manteau, le Rétromère montre aussi une interaction avec le cytosquelette de la cellule (Cullen and Korswagen, 2012).

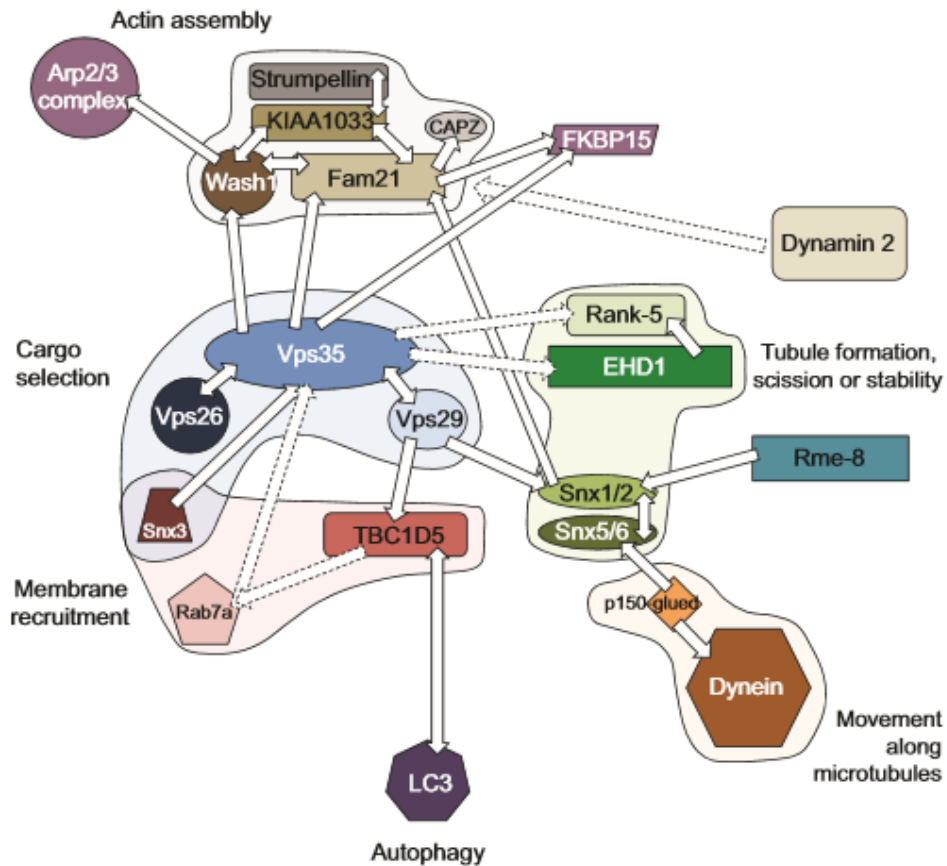


Figure 14: Représentation schématique des interactions entre le complexe Rétromère et ses protéines accessoires, adapté de (Matthew N.J. and Seaman, 2012). Les protéines ont été groupées en fonction de leur fonction, par exemple SNX3, Rab7a et TBC1D5 régulent l'association du CRC aux membranes. Les flèches indiquent la relation avec les protéines respectives, par exemple Vps35 interagit avec Fam21 régulant ainsi le recrutement de Fam21 et du complexe WASH. Dans certains cas la flèche à double sens indique une relation réciproque entre les deux protéines. Les flèches en pointillés indiquent des interactions évidentes, cependant pas encore démontrées expérimentalement.

b. Les fonctions et cargos du complexe Rétromère

La fonction principale du Rétromère est le recyclage de récepteurs transmembranaires ou de transporteurs entre les endosomes et le TGN, et entre les endosomes et la membrane plasmique. Le transport du cargo nécessite donc la spécificité de reconnaissance des membranes grâce aux SNX et une reconnaissance du transporteur par le CRC avec plus ou moins certains motifs spécifiques. Dans le premier cas, le SNX reconnaissent le PI(3)P phospholipide le plus abondant dans les membranes des endosomes tardifs. L'interaction de faible affinité se fait entre le CRC et le domaine cytoplasmique de la protéine cargo, dont certains motifs ont été décrits. Parmi ces cargos nous avons :

- (1) Des récepteurs intracellulaires** tels que le CI-M6PR (Arighi et al., 2004 ; Seaman et al., 2004) reconnu par Vps35 grâce au motif tri-peptidique WLM (Cullen and Korswagen, 2012) et Vps10 chez *S. cerevisiae* (Seaman et al., 1997). Le récepteur transmembranaire de type 1, SORLA chez les mammifères, (Sortilin-related receptor L, aussi connu sous SORL1) (Harbour et al., 2010) ; (Lane et al., 2010) est reconnu avec le motif FLV (Figure 15).

- (2) Le recyclage de certains transporteurs** de la membrane plasmique comme Fet3–Ftr1 vers le TGN, qui est recyclé dans les conditions de faible taux de fer chez *S. cerevisiae*. Ce transport nécessite l'implication de la SNX3 (Grd19) comme protéine médiatrice (Strochlic et al., 2007). Le transport vers la membrane plasmique du transporteur de glucose GLUT1, celui-ci est médié par l'interaction de la protéine VARP (Vps29-domain ankyrine repeat protein) avec Vps29 (Hesketh et al., 2014) (Figure 15).

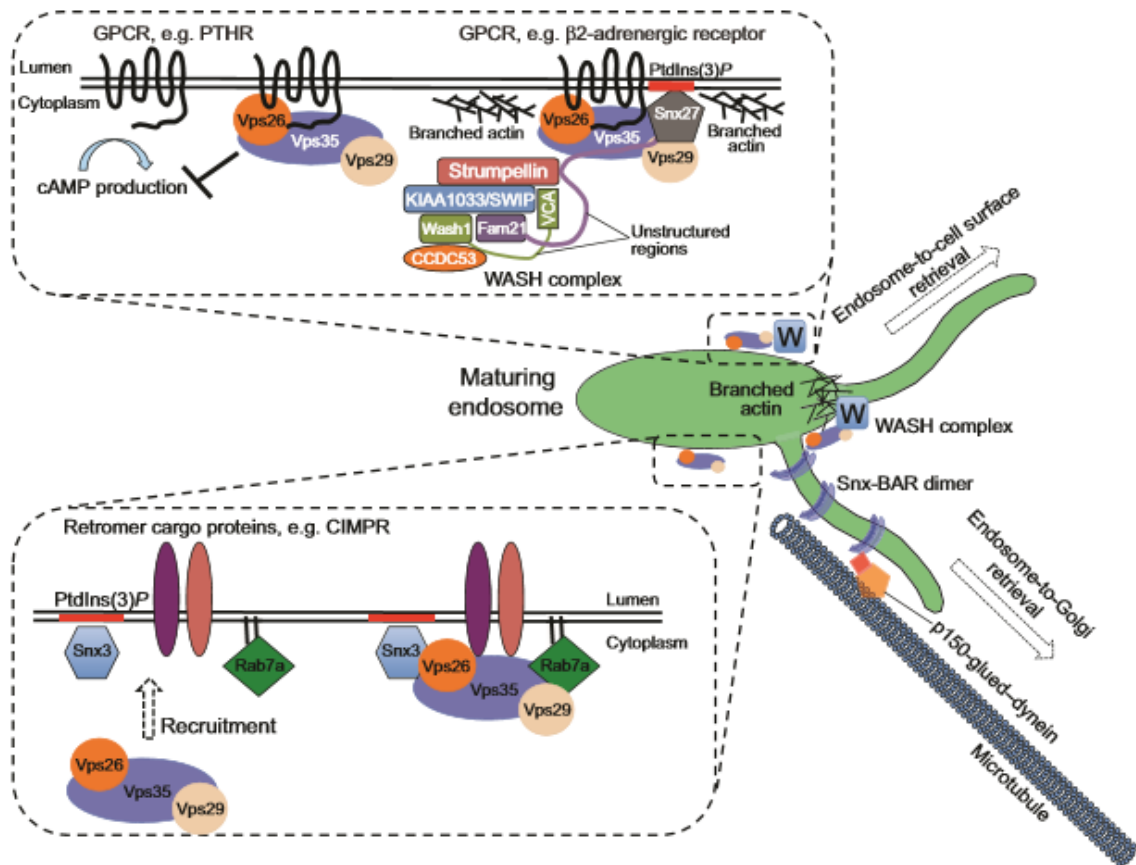


Figure 15: Représentation schématique du rôle du complexe Rétromère régulant la sortie de protéines endosomales, adapté de (Matthew N.J. and Seaman, 2012). Le CRC joue son rôle au niveau de la voie endosome vers le Golgi pour la sortie de cargos comme CIMPR et la Sortiline. L'interaction du Rétromère avec les protéines cargos nécessite son recrutement sur les membranes endosomale, celui-ci est régulé par Rab7a et SNX3. Les hétérodimères de SNX comprennent les protéines SNX-BAR, Snx1 ou Snx2 et Snx5 ou Snx6, régulant la formation des tubules et l'interaction avec les microtubules à travers le complexe p150-glued–dynéine. Le CRC recrute le complexe WASH, régulant la polymérisation de filament d'actine sur la surface des endosomes. Le CRC, SNX27 et le WASH ensemble régulent le recyclage à la surface de la cellule de GPCR un récepteur b2-adrenergique et d'autres protéines comme les $\alpha 5\beta 1$ intégrines. De plus le complexe régule aussi l'activité de signalisation d'un autre GPCR, le récepteur à hormones parathyroïde (PTHr).

C. Le complexe Rétromère chez *T. gondii* et les Apicomplexes

I. Les Protéines *TgVps35*, *TgVps26* et *TgVps29*

Les trois composants du CRC sont bien conservés Chez *T. gondii* (Figure 16). Les protéines *TgVps35* et *TgVps26* ont été identifiées dans les IPs de la *TgSORTLR*. De plus, le gène *TgVps26* a été amplifié chez *T. gondii* avec une étiquette HA (Hémagglutinine A), en fluorescence confocal la protéine *TgVps26*-HA montre une forte co-localisation avec le récepteur *TgSORTLR* au niveau du TGN (Sloves et al., 2012). Chez *P. falciparum*, des travaux en microscopie de fluorescence ont montré que *PfVps29* et *PfVps35* se retrouvent dans les mêmes structures ponctuées près du Golgi aux stades trophozoïte et mérozoïte (Krai et al., 2014). Dans ce même travail il a été montré que *PfRab7* et *PfVps35* sont très proches et définissent un compartiment endosomale essentiel à la biogenèse des rhoptries et micronèmes. Chez les mammifères *Rab7* est essentiel à la localisation du CRC, le dominant négatif de *PfRab7* ne montre aucun effet sur la vacuole digestive (lysosome) et ne semble pas avoir d'effet sur la localisation du CRC. Une autre étude sur un dominant négatif de *TgRab7*, montre que cette GTPase n'est pas essentielle à la biogenèse des organites apicaux (Kremer et al., 2013). Tout récemment, il a été montré que le KO conditionnel de *TgVps35* affecte la localisation de l'ensemble des organites apicaux (Morlon-Guyot et al., 2015). Ce résultat suggère donc que la fonction du complexe Rétromère est essentielle pour le parasite. Cependant aucune étude ne démontre les mécanismes moléculaires de la fonction du complexe Rétromère chez un parasite Apicomplexe.

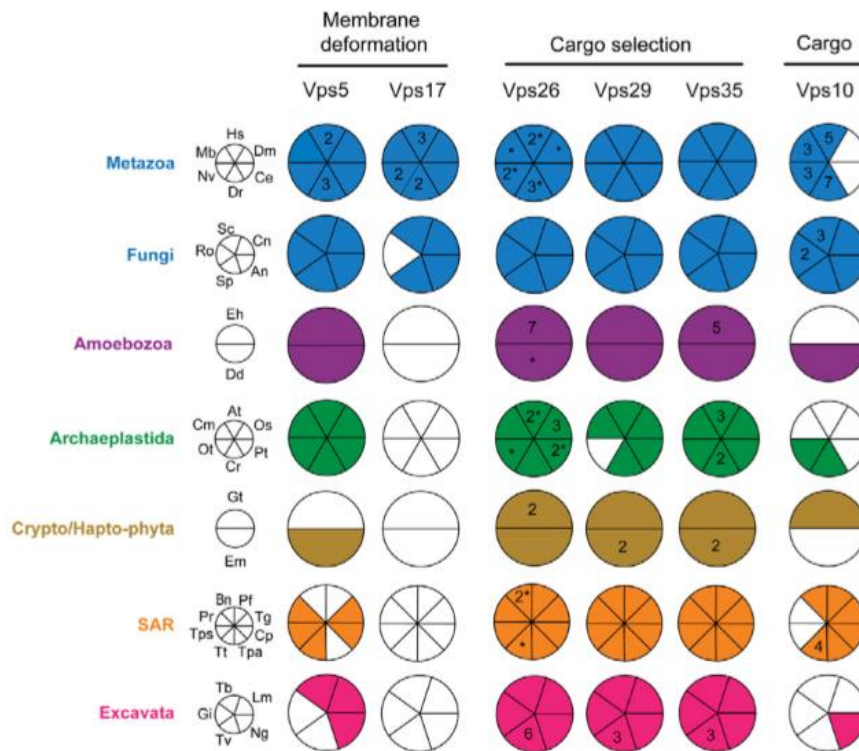


Figure 16: Conservation des composants du Rétromère chez les Eucaryotes, adapté de (Koumandou et al., 2011). Les trois protéines du CRC (Vps35 ; Vps26 et Vps29) sont bien conservées chez les Eucaryotes. Vps5 et Vps17 sont très fréquemment absents comme chez les Apicomplexes. Abréviations: Opisthokonts (bleu): *Hs*, *Homo sapiens*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Ce*, *Caenorhabditis elegans*; *Dr*, *Danio rerio*; *Nv*, *Nematostella vectensis*; *Mb*, *Monosiga brevicollis*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Cn*, *Cryptococcus neoformans*; *An*, *Aspergillus nidulans*; *Sp*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Ro*, *Rhizopus oryzae*. Amoebozoa (Violet): *Eh*, *Entamoeba histolytica*; *Dd*, *Dictyostelium discoideum*. Archaeplastida (Vert): *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Os*, *Oryza sativa*; *Pt*, *Populus trichocarpa*; *Cr*, *Chlamydomonas reinhardtii*; *Ot*, *Ostreococcus tauri*; *Cm*, *Cyanidioschyzon merolae*. Crypto- and Hapto-phyta (Bronze): *Gt*, *Guillardia theta*; *Em*, *Emiliana huxleyi*. Stramenopile-Alveolate-Rhizaria (i.e. SAR) (Orange): *Pf*, *Plasmodium falciparum*; *Tg*, *Toxoplasma gondii*; *Cp*, *Cryptosporidium parvum*; *Tpa*, *Theileria parva*; *Tt*, *Tetrahymena thermophila*; *Tps*, *Thalassiosira pseudonana*; *Pr*, *Phytophthora ramorum*; *Bn*, *Bigeloviella natans*. Excavata (fuchsia): *Tb*, *Trypanosoma brucei*; *Lm*, *Leishmania major*; *Ng*, *Naegleria gruberi*; *TV*, *Trichomonas vaginalis*; *Gi*, *Giardia intestinalis*.

II. La question des « sorting nexin » ou SNX chez les Apicomplexes

Il semble que les gènes codant pour les SNX ne soient pas bien conservés, même si on relève la présence de certaines protéines avec des domaines présents dans les SNX (Koumandou et al., 2011) (Figure 17). Ceci est confirmé par des travaux récents sur le complexe Rétromère chez *P. falciparum* suggérant l'absence de SNX dans le génome (Krai et al., 2014). Toutefois, il existe bien dans la base de données ToxoDB, quelques protéines avec des domaines PX.

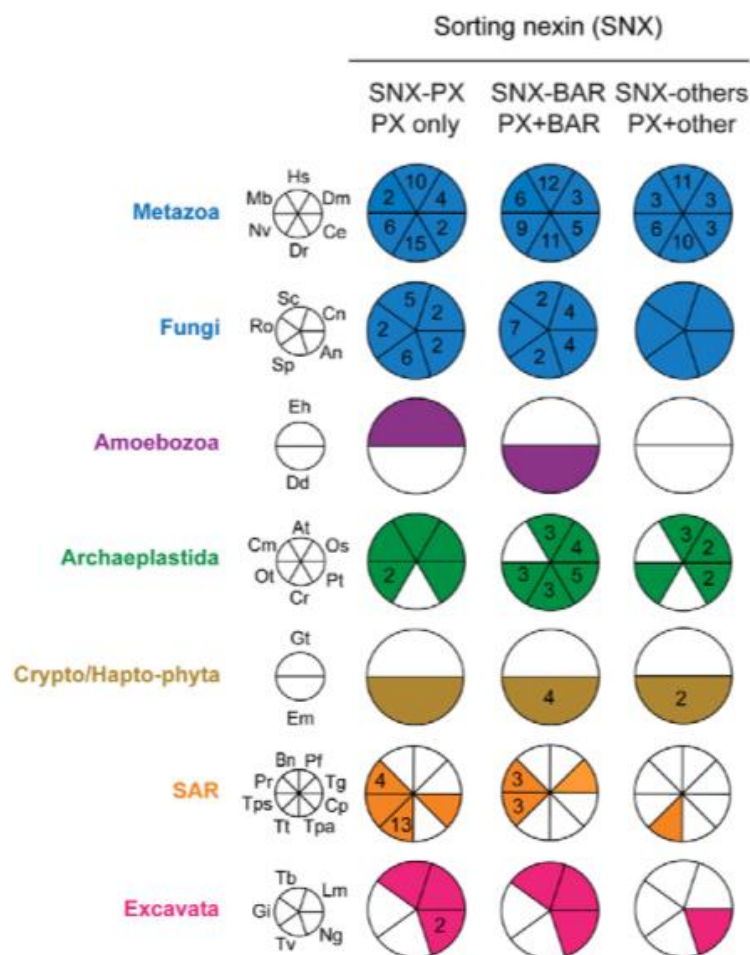


Figure 17: Conservation des « Sorting Nexin » chez les Eucaryotes, adapté de (Koumandou et al., 2011). Les Sorting Nexin peuvent être classifiées sur la base de l'architecture des domaines : SNX-PX, PX domaine seul; SNX-BAR, PX et BAR domaine; SNX-autres, PX et un domaine non-BAR.

D. Objectif des travaux de thèse

Le complexe Rétromère joue un rôle essentiel dans le trafic vésiculaire et par les fonctions qu'il assure dans le recyclage essentiel des récepteurs transmembranaires et transporteurs de la membrane plasmique, intervenant dans de multiples processus cellulaires : développements cellulaires, transport d'ions, polarité et signalisations cellulaires (Seaman, 2012). Cependant, il existe peu de données sur l'importance de ce complexe chez les Apicomplexes, en particulier chez *T. gondii*.

Au cours de la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux composants du CRC (*TgVps26*, *TgVps29* et *TgVps35*) avec une attention particulière sur la protéine *TgVps35* considérée comme le « core » du complexe par son importance structurale et fonctionnelle. Nous avons déterminé la composition du CRC chez *T. gondii* et la nature des protéines partenaires de ce complexe. Ce travail nous a permis d'établir un réseau d'interactions ou "interactome" du CRC sur la base de nos expériences d'immunoprécipitations ciblées et spécifiques suivies des analyses de protéomique quantitatives ou analytiques. Ensuite, nous avons démontré par une stratégie génétique d'inactivation des gènes, le rôle essentiel de *TgVps35* dans la biogenèse des organites de sécrétions micronèmes, rhoptries et granules denses, ainsi que de l'architecture de la membrane plasmique du parasite. Enfin, la mise en place de 'l'interactome' nous a permis de valider les interactions directs ou indirects du CRC avec des protéines connues telles que les protéines Rabs, mais aussi spécifiques au phylum des Apicomplexes. Ces informations suggèrent que le complexe Rétromère de *T. gondii* et des Apicomplexes en général aurait des fonctions spécifiques au phylum.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à une protéine chimérique *TgHP25* présentant un domaine BAR comme pour les SNX du complexe Rétromère et un domaine SBF2 pouvant avoir une fonction de GEF. Nous avons déterminé sa localisation cytosolique et vésiculaire.

Nous avons ensuite démontré que le domaine BAR de *TgHP25* a une forte affinité pour les phospholipides bis-phosphorylés, indiquant que cette protéine pourrait reconnaître spécifiquement les membranes comportant ces types de phospholipides chez le parasite. En utilisant la stratégie du CRISPR/CAS9, nos observations

préliminaires de la déplétion de *TgHP25* ont montré un effet négatif sur la biogenèse des rhoptries du parasite. Toutefois, ces dernières observations restent à confirmer.

Matériel et Méthodes

Culture des cellules et des souches parasitaires

Les souches de *T. gondii*, RH sauvage, RH Δ ku80, et RH TaTi ont été cultivées sur des cellules de fibroblaste humain (HFF) comme décrit (Sloves *et al.* 2012). Les expériences de plaques assai ont été réalisées avec des cellules HFF infectées par 250 parasites en présence ou en absence de 1.5 μ g/ml of ATc pendant 6 jours. Suivi d'une fixation à l'éthanol et coloration au Crystal violet. Les images ont été prises avec un microscope Axio plan (Zeiss).

Générations du mutant conditionnel iKo *TgVps35* et Knock-in

Tous les primers utilisés pour les PCR sont listés dans le Tableau 3. Le mutant conditionnel *TgVps35* a été généré en utilisant le plasmide pG13-D-T7S4 contenant 2kb du 5' et 3' de l'ADN génomique et le dihydrofolate réductase (DHFR) pour la résistance à la sélection pyriméthamine. Après transfection de $5 \cdot 10^6$ parasites avec 50 μ g de plasmide linéarisé, des clones stables ont été obtenu par dilution de la population. Pour la complémentation, le mutant iKo *TgVps35* a été transfecté avec 50 μ g du plasmide contenant la région codante entière du gène *TgVps35* avec une étiquette cMyc et inséré dans le locus UPRT. La sélection est faite avec 5 μ M de 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR). Les parasites transgéniques *TgVps35*-cMyc, et *TgVps29*-cMyc ont été générés par la stratégie de KI avec des fragments d'ADN génomiques 2,1kb et 1,8kb respectivement, clonés en amont du codon stop des gènes *TGGT1_242660* et *TGGT1_252490*. Les séquences d'ADN ont été clonées dans les plasmides pLIC-HA-cMyc-TUB5CAT et pLIC-cMyc-DHFR (Huynh and Carruthers, 2009). Les tachyzoites ($5 \cdot 10^6$ parasites) des souches iKo *TgSORTLR* et RH Δ Ku80 ont été transfectées avec 25 μ g de plasmide linéaire. Les parasites transgéniques exprimant *TgHP03* (*TGGT1_240810*); *TgHP12* (*TGGT1_294220*) et *TgHP25* (*TGGT1_259720*) toutes étiquetées cMyc ont été générés comme décrit ci-dessus dans la souche iKo *TgVps35*.

Microscopie confocal

Les parasites extracellulaires ou intracellulaires ont été fixés avec 4% de paraformaldéhyde (PAF) dans un tampon phosphate salin (PBS) pendant 20 minutes et marqués avec les anticorps listés dans le Tableau 1, comme décrit (Sloves *et al.*, 2012). Les échantillons ont été observés avec le microscope confocal (Zeiss) ou l'Apotome (Zeiss). Le traitement des images a été fait à l'aide des logiciels ZEN (Zeiss).

Structured Illumination Microscopy (SIM)

Nous avons utilisé le SIM pour obtenir des images à haute résolution avec un microscope ElyraPS1 du système (Zeiss), en huile d'immersion lens (NA 1.46) et une résolution de 100 nm en axe x-y et 300 nm en axe z. Trois lasers ont été utilisés pour l'excitation. Les images ont été acquises avec une camera EMCCD (Andor Technology Ltd, UK) et traitées avec les logiciels ZEN. Les images en 3D (trois dimensions) ont été générées en utilisant un z-step de 150 nm. La reconstruction et la codistribution ont été déterminées avec le logiciel IMARIS (Bitplane). Spécifiquement, le mutant *iKoTgVps35* en transfection transitoire a été traité ou pas avec ATc durant 48 h, fixé et marqué avec l'anticorps primaire et secondaire (Dylight594 ou Alexa488). Pour les parasites exprimant de manière transitoire GRASP-RFP la fluorescence a été directement visualisée en SIM. La co-localisation a été quantifiée par superposition entre le vert et le rouge en utilisant le logiciel IMARIS sur 90 parasites intracellulaires de 7 à 8 vacuoles.

Microscopie électronique

Des tachyzoites intracellulaires des souches *iKoTgVps35*, *Comp-iKoTgVps35* et sauvage ont été fixées sur la nuit à 4°C avec 2.5% glutaraldehyde / 4% PAF dans 0.1 M de tampon cacodylate. Les échantillons ont été traités et les images obtenues comme décrit (Sloves *et al.*, 2012).

Tests d'invasion assai

Le mutant conditionnel *iKoTgVps35* a été traité avec ou sans ATc durant 48 h et ensuite utilisé pour infecter des cellules HFF durant 1 h à 37°C. 24 h plus tard, les lamelles ont été marquées avec l'anticorps SAG1 et les noyaux avec 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Pour chaque condition, 400 champs microscopiques (X40) ont été observés. Le nombre de parasites positif pour SAG1 a été comparé aux cellules fixées avec le DAPI. Le ratio Parasites/Cellules a été obtenu avec une valeur \pm S.D. de trois expériences indépendantes.

Infection des souris

Un groupe de 4 souris BALB/C (6 à 8 semaines) ont été injectées (intra péritoine) avec $2 \cdot 10^6$ tachyzoites de RH TaTi, *iKoTgVps35* ou *Comp-iKoTgVps35*. Pour supprimer l'expression de *TgVps35*, nous avons ajouté 0.2 mg/ml d'ATc et 5% de sucrose dans l'eau de boisson. Comme contrôle, un groupe de 4 souris a aussi été infecté avec les mêmes souches sans ATc. La survie a été monitorée sur 4 semaines. Pour la vaccination assai, les souris BALB/C ont été infectées par injection (intra péritoine) avec $3 \cdot 10^2$ tachyzoites des souches RH TaTi, *iKoTgVps35* ou *Comp-iKoTgVps35* avec traitement ATc ou non. Quatre (4) semaines plus-tard, les souris survivantes sont réinfectées avec $1 \cdot 10^3$ tachyzoites de la souche RH sauvage et la survie est monitorée durant 30 jours.

Immunoprécipitation et immuno-marquage

Les Tachyzoites ($1 \cdot 10^9$ parasites) de *TgVps35-HA*, *TgVps26-HA*, *TgVps29-cMyc*, et RH Δ ku80 ont été lysés avec 10 mM HEPES, pH 7.9; 1.5mM MgCl₂; 10mM KCl; 0.5mM dithiothreitol (DTT); 0.1mM EDTA; 0.65% NP40; 0.5mM phenyl-methane-sulfonylfluoride (PMSF); et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich). Après 30 minutes dans la glace, le lysa est centrifuge à 14.000 rpm pendant 30 minutes à 4°C, et le surnageant est incubé avec des billes agarose anti-HA ou anti-cMyc (Thermo Pierce) sur la nuit à 4°C en rotation. Après 5 lavages avec 10 mM Tris, pH7.5; 150 mM NaCl; 0.2% Triton X-100; 0.5 mM PMSF et un dernier lavage avec 62.5 mM Tris, pH 6.8, l'élution a été faite avec le tampon Laemmli (0.2% SDS, 100 mM DTT, et 10% sucrose). Ces échantillons ont été analysés par SDS-PAGE et les bandes de protéines ont été détectées par fixation au nitrate d'Argent avant l'analyse

protéomique. Pour les immuno-marquages, les parasites ont été lysés avec le tampon Laemmli et les protéines séparées sur un gel d'acrylamide à 12% et marquées avec un anticorps primaire (Tableau 1), puis secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (Thermo Pierce). Les membranes ont été visualisées grâce au ChemiDoc XRS+ (Bio Rad).

Production et purification des protéines recombinante

La souche bactérienne BL21 a été transformée avec les plasmides *pGEX6P3* : *GST-C-terminal-TgHP12* ; *GST-TgHP25* ; *GST-cMyc-BAR* ; *rGST-His-SBF2* ; *GST-cMyc-rab5b* ; *GST-cMyc-rab11a* ; *GST-cMyc-rab7* (Tableau 3 et séquences codantes). L'expression de la protéine est induite avec l'ajout dans le milieu de culture de 0.5mM IPTG sur la nuit à 25°C. Les bactéries sont centrifugées et suspendues dans le tampon de lyse (50mM Tris 150mM NaCl 1mM EGTA 1mM EDTA 1mM DTT 0.5mM PMSF). 1mg/ml de lysozyme (SIGMA) est ajouté pour 30 minutes dans la glace suivi de plusieurs cycles de sonications. Le lysa est centrifugé à 14.000rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est incubé sur la nuit en rotation à 4°C avec des billes Glutathion sepharose (GE healthcare). Les protéines sont ensuite éluées avec 10mM glutathion dans le tampon d'éluion (50mM Tris pH8 150mM NaCl 1mM DTT 0.5mM PMSF) ou clivées avec l'enzyme de précision dans le tampon (50mM Tris pH8 150mM NaCl 1mM DTT 0.5mM PMSF 1mM EDTA) (GE Healthcare).

Production d'anticorps

100 µg de protéine recombinante purifiée (estimation de pureté par gel d'acrylamide et dosage colorimétrique de Bradford) sont repris avec 100 µl d'adjuvant de Freund complet (Sigma) puis injectés par voie intra-péritonéale aux souris BALB/C ou rats. Trois rappels avec la même quantité de protéines recombinantes 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-marquage et immunofluorescence (Tableau 1).

Tests de « lipid overlay »

Les phosphatidylinositol lipides (Aventis polar lipids) ont été re-suspendus avec 2:1:0.8 (méthanol: chloroforme: Eau) à une concentration finale de 100pmol/μL. 2 μL de chaque lipide a été déposé sur une membrane de nitrocellulose Hybond C extra (GE healthcare), puis séchée à température ambiante pendant 1h. Les membranes ont été saturées avec le tampon (50mM Tris ; 150mM NaCl ; 0.1% ovalbumine ; 0.01% Tween 20) pendant 1h à température ambiante. Les membranes sont incubées sur la nuit à 4°C (dans le tampon précédent), avec 0.2 à 10 μg de protéines recombinante fraîchement purifiée. Les membranes sont ensuite lavées et révélées par simple immuno-marquage.

Tests de GST-pull down Vps/Rabs

Un lysat parasitaire des souches KI-*TgVps35*-HA, KI-*TgVps26*-HA (équivalent de 200.10⁶ tachyzoites) dans un tampon (50mM Tris-HCl pH 7.5; 150mM NaCl; 0.5mM PMSF) est mis en incubation avec 2 μg GST-cMyc-Rab5B, GST-cMyc-Rab7, GST-cMyc-Rab11B et GST sur billes Glutathion sepharose (GE healthcare) en présence de 1mM GTP ou GDP en rotation sur la nuit 4°C (NB : la solution de protéines recombinantes ne doit pas contenir d'EGTA ou EDTA). Les billes sont lavées trois fois avec le tampon précédent (+ 0.1% Triton X-100). L'élution a été faite avec le tampon Laemmli, et l'analyse en immuno-marquage avec les anticorps anti-HA (Rat) et anti-GST (voir Tableau 1).

Analyses statistiques

Toutes nos données ont été analysées avec le logiciel Graph Pad Prism. Nous avons utilisé le Student's *t*-test pour les analyses statistiques. Et le test de Mann-Whitney pour les courbes de survies.

Tableau 1 : Liste des anticorps

Noms	Especies	Dilution (IF)	Dilution (IM)	Origine
Anti-HA	Lapin	1/500	1/500	Cell Signaling
Anti-HA	Rat	1/200	1/500	Roche
Anti-cMyc	Souris	1/500	1/500	Pierce (Thermo)
Anti- <i>Tg</i> SORTLR	Rat	1/700	1/700	Tomavo Lab
Anti-MIC2	Souris	1/500		Carruthers Lab
Anti-proM2AP	Lapin	1/500	1/500	Carruthers Lab
Anti-M2AP	Lapin	1/500	1/500	Carruthers Lab
Anti-proMIC5	Lapin	1/200	1/500	Carruthers Lab
Anti-MIC5	Rat	1/500	1/500	Carruthers Lab
Anti-ROP1	Souris	1/500	1/500	Dubrometz Lab
Anti-ROP2-3	Souris	1/500		Dubrometz Lab
Anti-proROP4	Rabbit	1/500	1/500	Gary Ward Lab
Anti-ROP4	Rabbit	1/500	1/500	Dubrometz Lab
Anti-GRA1	Souris	1/500	1/500	Dubrometz Lab
Anti-GRA3	Souris	1/500	1/1000	Dubrometz Lab
SAG1	Souris	1/200		Tomavo Lab
Anti-CPL	Lapin	1/200		Carruthers Lab
Anti-VP1	Lapin	1/400		Carruthers Lab
Anti- <i>Tg</i> HP12	Rat	1/500	1/500	Tomavo Lab
Anti- <i>Tg</i> HP25	Souris		1/500	Tomavo Lab
Ant-GST	Lapin		1/1000	Tomavo Lab

Tableau 2: Liste des plasmides

Noms	Sites de Linearisation
pDTS4 iKO <i>TgVps35</i>	Apal
pUPRT FL <i>TgVps35</i>	non
pLIC-HA-TU5CAT <i>TgVps35</i>	EcoRV
pLIC-cMyc-DHFR <i>TgVps29</i>	MfeI
pLIC-cMyc-TUB5CAT <i>TgHP03</i>	BstBI
pLIC-cMyc-TUB5CAT <i>TgHP12</i>	EcoRV
pLIC-cMyc-TUB5CAT <i>TgHP25</i>	BstZ17I
CRISP/CAS9 <i>TgHP25</i>	non
CRISP/CAS9 <i>TgHP12</i>	non

Tableau 3 : Liste des primers

Noms	5' Sequence 3'	Sites de Restriction
iKO_TgVps35_3'_F	CCGGGGATCCATGtaccatacagatgtccagattacgctATTATGGAACACGATCAAGAAAA CTGCTGGA	BamHI
iKO_TgVps35_3'_R	CCGGCCTAGGAATTCAAAGAAGTGACTGCAAAGAGAGATCCA	AvrII
iKO_TgVps35_5'_F	CCGGCATATGTGGTGTGGCTCGTTGAAATCTCC	NdeI
iKO_TgVps35_5'_R	CCGGCATATGTCTCGAGCACTTTGGGAGACTCCAA	NdeI
iKO_test1_TgVps35_F	GGCATCTGCGAGACCTGCACCCAG	none
DHFR-int_R	GGCGTTGAATCTCTTGCCGACTGTGGAGAGGGAAGTCC	none
complTgVps35prom_F	ccggGGCGCGCCGATTGGTGTGGCTCGTTGAAATCTCCTC	AscI
complTgVps35prom_R	ccggGGCGCGCCTCTCGACAACCTGGGAGACTCCAACAG	AscI
complFL_TgVps35_F	ccggGGCGCGCCgagcagaagctgcatcagaggaggacctgATTATGGAACACGATCAAGAAA AACTGCTGG	AscI
complFL_TgVps35_R	ccggCCCCGGGCTAAGATGTTGAAACTGATTCATTACAGTCCAGT	XmaI
KI_TgVps35HA_F	TACTTCCAATCCAATTTAATGCCAAGAGTGGGTGTCACAGTTACCTGCC	None
KI_TgVps35HA_R	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCAGATGTTGAAACTGATTCATTACAGTCCAGTGA GTCC	None
KI_TgVps26HA_F	TACTTCCAATCCAATTTAATGCCGCGGCTGTCTCTGCATAGGTG	None
KI_TgVps26HA_R	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCCCGATCTTCTTCCACATTGTGAT	None
KI_TgVps29myc_F	TACTTCCAATCCAATTTAATGCCCGATGCGGCCGAGCGGTCAAAAA	None
KI_TgVps29myc_R	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCTTTCTCGGCCGAGCTGGCAGCGTC	None
KI_HP12myc_F	TACTTCCAATCCAATTTAATGCATGGCAACGATGGTCACCTGCCAG	None
KI_HP12myc_R	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCCAATCTGTCAAGTCTTCCCTCCAGTCA	None
KI_HP03myc_F	TACTTCCAATCCAATTTAATGCGCTGGCTGGCGCACGAAACCTCCGA	none
KI_HP03myc_R	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCAGCGGAGTCTTGCAGTGGCGTCACC	none
Recomb_HP12_F	CCGGGGATCCGTAGAAAAGCCTACAACGGTGGGG	BamHI
Recomb_HP12_R	CCGGGCGGCCGCTACAATCTGTCAAGTCTTCCCTCCAGTC	NotI
Domain-BAR-F-HA	CCGGGGATCCATGtaccatacagatgtccagattacgctGCACCTGCAAACGCGACTGCAG	BamHI
Domain-BAR-R	CCGGGCGGCCGCTGGCGTGCACCCGCGCGC	NotI
Domain-SBF2-F-His	CCGGGGATCCATGcatcatcaccatcaccacCGAGAAGAAAAACCTCGTTTTTCGCGCT	BamHI
Domain-SBF2-R	CCGGGCGGCCGCGAGAGGATGAAGCGGAGGCTTTGTTAG	NotI
Domain-SBF2-specif-R	CCGGGCGGCCGCGGTGCGGGCAGGGTGTTC	NotI

Séquences d'ADN amplifiées ou synthétisées

Séquence codante C-terminale *TgHP12* (par PCR voir Tableau 3) :

GTAGAAAAGCCTACAACGGTGGGGCGCCGCCAAGGAGGAGGGGCTATCAAGC
ATGCCATATCTGCGTCAGTAGAAGGTCCACCACTGCCGGACGTTCCGCAGCTG
CGGTTTCGCCTTAGCCGATGCAGAGGTGCGATCCCGAAGTGCACAGAGCGCGAA
TTCAGGAATTGAGAGGGAGACTGCCAGAGCAGGCGACGGCAACACCATGGGG
GATGGCTTACGTGGCACTAATCATAACGGTGGTGTGCTCTCACAGAAGTCTTTT
GGGGCGAGTGTTGCGTTAGAAAGTACAGTGCGGGGTTCTGGAGATAATATGCT
GGACGGTGAGACACGCGGTAAACTGCAGATGCTCCAGAAGGTGTTGAGAGAG
TTCCCTCTTCAGCTGCAGAACGTAGTGGAGGCGCAGGCACCCCAGATGCCGAC
ACAGCATTGTACAGACCGAGGTGTAGACACTCTTCGAGACGGTATCCCAAGC
GACGATGACAAGAAGAAAACTCCGGTGAGGCGGAAAAGGAGCCACTGCGAGC
GGATGCAGGTGGCCGACCTGCGGACAATGGAAAAGCCGCAGATTTAGCAAGTA
GCCCCGGGCATCAAAGGAGAAGTTGAAATACTTTCGGCAAGCGGAGAAGTTGTG
GCACAAGATTCCAGAGAAGCTCGTGTCAAAGGGCTGGAAGAAGAGACTGGGGC
CGGCCGGCGGGGTTTTCTGGGCGTTGGAGGAAAGGGCCATGGCCTGACTGGA
GGAAGACTTGACAGATTGTGA

Séquence codante *TgHP25* (séquence synthétisée et optimisée pour la production bactérienne) :

ATGGAAGCGGAGGCCACCTGGGGGGTGGCGGGGTCCGGACAGTTTGGTTCGG
GAGCTCCTCCGAACGACGGAGACGCCTTCGCTTCTGCGCGCTCTTCTTCCTCTC
TGTCAGCTCCTTTCTGCGCCTCAGCTCAAGGTCCCGAAACGAACTCTGGGGGA
ACAGACACTCGCAAGGAATCTGCGCAAGACACGCAAACGACTCAACCCGCACC
TGCAAACGCGACTGCAGAGAACGCATTCTCCTTCAAAGAGGACTTAACCTCAGA
CTGGTGCCTAGCAGTGAGTCGTGTAGACAGCGGACGCACGCTGTTGGAGCGTC
TGAGGGCTGCGCTGCTCCTCCGCGCGAACGCAGCGGTTGAGCAAGCGAGCAA
AATGGAGAGTCTCGTTCAGACGTTTGTGCGGACCAACCTCGAAAGCAAGACCGT
CATGTCTGCCGTCAACGCTCTCCGTCTCGAGGCGGTCCACCAGGCCGATCACT
GCAGAGAGTTCGCCGAAGCGATTCCGGAGAGACGTCGTGAGGGGAACGCTCACA
AACACCATTACAACCACTACCTCGTCCTCCAACAAATCAAAGCAGACGGTTTCG
GAGGCGCAGAAGGAATTGACTCTGGCAACGGTGGACCATCAGAAAGCGATGCACCGCTAC

CTGCGCTGCAGCAAGGAGGCGGCGGCGGCAGCTGTGAAGGCGCAAGCGGCAGAGGGCGAGGC
GCCGAATGTACGTACAGAGCTTGCGTTGTGCGGCGATTGCGGCGCTGCGTGGAGGCGAAGGCCGC
GGAGGACGAGCACCGGGAAAGTGTGGCGCGTTTGAATGCTGCCGCGCAGGCGAACGAGAGGAA
GATGGCGATTATTCTTCAGTCCTTGCAAGACATGGACGAGAAGCGCATGCTCTGTTTCCGCGACG
CTCTCCGAAAGGCTATGGTCTACCAGGCGGCGTATCTGCGAAACGTCCAGTACGACCTCGAGCA
AACCATCAAGACGGTGGACGCCGTCGACCCCATGGCGGACCTTCAGGAGTTCCTCGGGAAGTAT
CGACTGCCAAAGAAGCAAACGGGTGCCGACGTGAAGGTGCAGAGTTGGGTAGAGCTCGACAAC
ACTTTCGGAGACGCCTTGACGCCTTCAGCGTCTGTACGCCTGTGCCGTGGGCGCCGGGGTTCG
ACGCCAGCCCACGGCTCTTCGGGGTCTTCTGCCTTCCCTACCTCGTTCGCCGCCTCACCTTCA
GCTCCTCGCCGCTCGGCGTCTCTTCTCTGGGGTTCAGTTCTGCAGCTGCAGCGGCTTCCAATGT
CGCGCGATCATTCTGCAGAAGTCCCCGTTCACTCGCGTGATGCAATCCGCCGCTTCGCTCGTC
GCCGGCCGCGGGCCCGCCAGCGAGTCAGGTGTACATACGCCCCAGGGGCCGGAGGCCGCGGC
GGGGGAGTCGCTCGCCGCAGAGGACCAGCGGCCACAGGGCGGGGGAGGGGGTTCGGCGAGC
GGAGCAGGTGCTTCCGAGGAGAAACGCGGGCGCCGAGAAGAAAAACCTCGTTTTTCGCGCTG
ATTACGAGAAGCGAGGAACAGGACCTTCTGCCAACGCGGAGAGCGGAGACGAGGCCGAAGGTG
CGATCTGAGAGGGAGTTCGACGCCCTCCTCGACCTGCTCTGGTCAGAGGCTGAGCCAACCGAG
AAGCGCAACGGCGCGGGCGATGTGGAAACCGAAGGCAGACCCGTCACCGCGTTCGTCGTGCAC
CCCGCCCAGTGTCCCTACAGCCAGAGGTCCGACACCAGCTCGATGCGGCACTCCCGCGGCTG
AAAAGCGACTTCGCCTCGCCTGCGAAGCGCCTCGCCTTCTTAAGGCTGTGCAACGCAGGCGCC
GAGCGTGCATGGTTCGCGGCCACAAGCAAGTGTACCTACACCACATGCTGTGCCTGCGAATCCT
CGGCGAGATCAGCGAGTGGCTGCTGGACGCCGCGACGAGCAACTCGACGTCTGGACGGGGC
GCATGCTCCTCCTTCTCTCCATGCAAATCGCGGCCTCGGGCCTCAAGAGCGCAGACCCGCAAAT
GCAGACCTTTTCTTGGGTGGACTTTGCTCAGTCGTGTGCAGAAATCGACAAGAAAGATCGAGGC
GACGCCCGAAACACCCTGCCCGCGACCGAAGCCGAGACTGTTCCGGTGGTCCCTACATCGGTGC
ATCTACCACCACCGCTACTGGAACCGCGTCACCTTCTGGGAGGAGGCACTCACGCTGACCATCA
GCGAGGAATTTAGCGCCAGAAGTTGATGGAGAAGTGGCGAACTATGGGCGACGAGGTTCTTCA
GCAGGAGGAGAAGGCGTTTTGCGGAGAGGAATCCTTGCTGCGGGTGTCTCACATCTTTTGGTTCT
TTCATGGTCTCTACGGCATCGCCCCGAGCAAGTGCAGTCTCTCCTTCTCGTTGTTTGTGCGCGC
TTGTCACCTTGGAGGACGAATTCGACGCCCGCCTCGTGAAGGAATGCAACAGTTCGCTTCCCCT
ACAGTCAACGCTAACAAAGCCTCCGCTTCATCCTCTTCTGCAGCATCTTCTTCTTCAAGTGTCTCC
TCTTCATCATGTCCACCTTCTTCTTTCGTCGGATCCACCTTCTTTCGTCACCTTCCCTTTCGCTCGGAT
TCTTCTTCAAGGAAAGTCATGGGGAGTCTTGGGTCTCCCGGAGAGGCGGCGCGGGAAGCAGGT
GTCTCTTCCGCGGAGACAGAGATGAGACTGAGGGCGCCCGCAGAGAGGGGAGGAGACAGTTGT
TCTCCGCGTGCAGGCAGCTTCAAGAGCGCGAGCAGAAACGAGAGGACGAGAGACTATCGGAA
GCGAAGGAAGTCAATACGCCTGGCGAGGGAAGGGAGGAGAAGGAAGAGCGGCAGATACACGAC
GGGCAAGAAAACGACGAGACATTGCAAAGAGAAAAGACTCGGAGAGGATCGGCTCTTTTTGA

Séquence codante cMyc-Rab7 entre BamHI et NotI (synthétisée et optimisée pour la production bactérienne) :

GGATCCgagcagaagctgatctcagaggaggacctgCCAGGCCAGCAGGAGCGAGAGCGTC
CAGAGAGGCTCCTCCGGCATCGAGTGCATGCAGAACGAAAGATGTCTCGGCCA
GAGAAACAGCAGCACAGAGGCGAGACGAAAGGAAACAGCGCGGAAGCGCTTG
TCTCACTCTTACCATCAGCGAAAAGGCGCCAGGAAGAAGCAGCATCTACGCGT
CTGGGGACTTTGCGCGAACCCCCGCGCGCAGTGTCTCTCGGGTGTCTGGACAC
CCGAGACTGTGTGTGTGTGTTGGCGCCGTCCGCGCCTCTCGTCTCTGCTGCTC
GCGAACTCCGGAGAAAACCTTTGCAGAAACAGGTGGAGGAACTTCCTCAAGGAT
CTCTCGGCCTTCCAGGACTCGCCAGACGGTCGCTGAGGCGCTTCTTCTGTGCC
CTGAAGAGAAACGCACGCAGTTTTAAAGCCAGCCTTCTCACGTTTGCCAGTTTC
GCTCCCGCGCGTCGTCGGCTTTCGCAATCCTGCCGTCAGTGTGTCTCGGTCGT
CGGCCGCGGCGCTGGCTTGGGAGGCTCGGCAGCAGAGAAGCTTCAGCGGCTT
CGCGAGAACGTCCTCGGCCTGCGATTCTCCGCAACTCCTTTTGAAGGTCTTCTC
TTTGGTTTCGGCTTGCGAATCGGTCTCTCTTCTTGGCACCCACGGCTTTTGT
ATGCCGCCCAAGAAGAAGGCTCTCTTGAAAGTCATCATCCTCGGGGACAGCGG
GGTAGGCAAGACCTCGCTGATGAACCAGTATGTTAACAAGAAATTTTGAACCA
GTACAAAGCAACGATTGGCGCGGACTTCCTCACCAAGGATGTGTCATCGACG
ACAAGGAGGTGACGGTGCAGATCTGGGATACTGCTGGCCAAGAGAGATTTTCA
AGTCTGGGGGTGCGCTTCTACCGCGGCGCAGACTGCTGCGTCCTCGTTTTTGA
CGTGACGAATCCCAAGTCTTTCGAGAGTCTTTCAGTCCTGGAAAGAAGAATTTCT
GATCCAGTCCTCTCCGTCGGACCCAGACTCCTTCCCCTTCGTCGTCGTTGGCAA
CAAAGTCGATGAACGAGAGAAGCGCCGAGTGTCATCGAGCAAAGCAGAAGCTT
TCTGTCGTCAGAGCGGAAACGACATTCCCTACTTTGAGACAAGTGCGAAGACAG
CGACGAACGTCCACCTCGCTTTCGAGGAAATTGCCAAGCGTGCGATGCTTCAA
GAAAAACAACAAGAACAATTTACCTCCCGGAGACACTCACGCTCTCGAACGCG
GACATCCGGCCGGCGCCCATCGACAGCAGCGGCGGCTGCTGCTGAG**CGGCCG**
C

Séquence codante cMyc-Rab5B entre BamHI et NotI (synthétisée et optimisée pour la production bactérienne) :

GGATCCgagcagaagctgatctcagaggaggacctgGGATGCACCGCGAGCTCCACGGCGTCGGCGGGAGG
CGAATCTCAGCTCCGCATGACTAATGCAGGGGGCTCTCTCGACGATGGCTTCTCTGAGAGACTG
AATTTGGAGGCGAAAATTGTTCTGCTGGGGGACAGCGGAGTAGGGAAGAGCAGTTTGGCGCTGC
GCTTCTGTGCGAGGCCGCTTTCCTCAGTACCACGAAGTGACCATCGGCGCTGCGTTCCTGCAGCA
AACGATTCGCGTCGGCGACGATGGAAGTCAGCTGAAACTTTACATCTGGGACACCGGCGGGCAG
GAACGCTTCAGAGCGATGGCGCCTCTACTATCGCGACGCCGCGGGTGCTGTGCTTGTCTACG
ATGTGACAAATCCGGCTTCCATGGATGCCGTCCGCTTCTGGGTGGAGGAGTTGAAGCAGCGCGG
CCCGGCCAACTGCTGCATTGCCGTTGCTGCGAACAAGAGCGACTCGATGGAAAACCTCAGAAAAT
GCAGAGCCTCCACCTGAAGAAGGAACAGCGGGCGTCGACGTGGAAGCTGAACGACGCGCGGAA
ATGAAGAAGTACTGCGCGGCCGAGGGAATGCTTTTCGTCGAGTGTCTGCGAAGACGGGCTGTA
ACGTGCGCCTCCTCTTCGAGCAACTCGCCAAGGAAGTTTTTGAGCAGCTGAAGCAGAGCATGAT
GGAGTTGTGAG**GCGGCCGC**

Séquence codante cMyc-Rab11B entre BamHI et NotI (synthétisée et optimisée pour la production bactérienne) :

GGATCCgagcagaagctgatctcagaggaggacctgGCGGGGGTTCTGAAGACTACGACC
ATCTCTACAAAGTGATTCTGGTGGGAGACGCGACTGTAGGAAAGACGCACTTGC
TTTCGCGTTATATTCGAGGAACTCTGCCCAAGAGCCCGAAAGCCACCATCGGCG
TCGAGTTCGCCACGCGCACGGTGCCGCTCGCAGTCGGCGGAACTGTCAAAGCA
CAGATTTGGGACACAGCTGGTCAAGAGCGGTACCGCAGCATCACCAGCGCGCA
TTACCGCCGCGCAGTAGGTGCGTTGTTGGTTTACGACGTGACGAGGAAGTCCA
CTTTTCTGAATGCGTCAAATGGCTAGAGGAATTGCGCCAGAACTCGGAGCCTG
ACATCGTCATCATGATGGTTGGGAACAACTCGACTTGGTCGAAAAGACCCCA
CAGCTCGAGATGTTCCCTACGAGTTGGCTGCGAAGTTCGCGCAGGCCGAACGGC
TTGTATTTAGCGAGGCGAGTGACAGTGACGGCGTTCAACGTGAAACATATTTTT
GAACATTTGCTCCAGGAGATTTACAACCACAGAACGCAAGGAGAAGAGTTCTCT
GGAAGAGCGAACGGGGCGGATGCGTACAGAGACGCTCAGGCTCTCGGCGGTG
TGCGTCTCGCGGCCAACGCGAACATGTACGGCAGAAACCCTCAGAATCTGTCC
TGCTGTGGCTGAG**GCGGCCGC**

Résultats

A. Le compartiment endosomale (ELC) non-conventionnel et le complexe Rétromère gouvernent l'intégrité du parasite et l'infection de l'hôte.

Nous avons montré par des expériences d'immunoprécipitations que la partie C-terminale cytosolique de la *TgSORTLR* interagit avec les composants du complexe Rétromère. Chez les mammifères et *S. cerevisiae*, le complexe Rétromère est connu pour jouer un rôle majeur dans la voie rétrograde du trafic vésiculaire.

Les principaux composants du CRC du complexe Rétromère sont présents chez les Apicomplexes *Vps26*, *Vps29* et *Vps35*. Cependant, les protéines SNX essentielles à l'ancrage aux membranes ne sont pas conservées ou tellement divergentes au point où leur identification par les outils bio-informatiques n'est pas possible chez *T. gondii*. L'étude de ce complexe CRC nous permettra de savoir comment, et qu'elles sont les fonctions de ce complexe dans le trafic vésiculaire et la biogenèse des organites apicaux du parasite. Il est important de déceler les protéines et les voies du trafic du parasite, éventuellement d'identifier des protéines régulatrices spécifiques afin d'avoir des cibles pour des thérapies nouvelles.

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé la composition du CRC, déterminer la localisation de chacun des composants, identifier les partenaires connus et spécifiques chez *T. gondii*. Ensuite, nous avons démontré que ce complexe est essentiel à la biogenèse de tous les organites apicaux micronèmes, rhoptries et granules denses, donc à la virulence mêmes du parasite. De plus le complexe interagit avec des protéines spécifiques aux Apicomplexes, et semble assurer l'intégrité de l'architecture corporelle du parasite. Ces travaux ont conduit à la rédaction et soumission d'un article dont les résultats sont résumés ci-dessous.

Unconventional Endosome-Like Compartment and Retromer Complex Govern Parasite Integrity and Host Infection

Lamba Omar Sangaré,¹ Tchilabalo Dilezitoko Alayi,^{2,3} Agnes Hovasse,² Benoit Westermann,² Fabien Sindikubwabo,⁴ Isabelle Callebaut,⁵ Elisabeth Werkmeister,⁶ Frank Lafont,⁶ Christian Slomianny,⁷ Christine Schaeffer-Reiss,² Mohamed-Ali Hakimi,⁴ Alain Van Dorsselaer,² and Stanislas Tomavo^{1,3,*}

¹Center for Infection and Immunity of Lille, CNRS UMR 8204, INSERM U 1019, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, 59000 Lille, France ²Laboratory of Bio-Organic Mass Spectrometry, IPHC, CNRS UMR 7178, Université de Strasbourg, 67087 Strasbourg, France ³Plateforme de Protéomique et des Peptides Modifiés (P3M), Institut Pasteur de Lille, CNRS, Université de Lille, 59000 Lille, France ⁴CNRS UMR5163, LAPM, Université Joseph Fourier, Grenoble, France ⁵CNRS UMR7590, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, MNHN, IRD-IUC, Paris, France ⁶Bioimaging Platform, IBL, CNRS, Université de Lille, 59000 Lille, France ⁷Laboratory of Cell Physiology, INSERM U 1003, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

SUMMARY

Membrane trafficking pathways play critical roles in Apicomplexan, a phylum of protozoan parasites that cause life-threatening diseases worldwide. Here, we report the first retromer-trafficking interactome in *Toxoplasma gondii*. This retromer complex is typified by a singular architecture with a trimer Vps35-Vps26-Vps29 core complex that serves as a hub for the known endosome-like compartment (ELC) and parasite-specific proteins. Conditional ablation of *TgVps35* revealed that the retromer complex is not only crucial for the biogenesis of secretory organelles, but also for maintaining parasite architecture. We demonstrated that *TgHP12* is a novel parasite-specific cargo sorting protein that exhibits functions unrelated to secretory organelle formation. Furthermore, we discovered the previously uncharacterized *TgHP03*, which is a multiple ligand transporter maintained at the parasite membrane by retromer-mediated endocytic recycling. Thus, our findings highlight that both evolutionarily conserved and unconventional proteins act in concert by controlling retrograde transport that is essential for parasite integrity and host infection.

Les protéines *TgVps26* et *TgVps35* ont été identifiées par immunoprécipitation (IP) avec la région C-terminale de la *TgSORTLR*. Des souches parasitaires RHΔK80 ont été construites avec une étiquette HA pour *TgVps26*-HA et *TgVps35*-HA (Sloves et al., 2012). Afin d'avoir les trois composants du CRC, nous avons également construit le parasite *TgVp29*-cMyc avec une étiquette cMyc. Les trois souches parasitaires ont été utilisées pour immunoprécipiter avec des billes agarose anti-HA et anti-cMyc, ces trois protéines afin de confirmer leur purification et enrichissement spécifiques (Figure 1 A). Nous avons ensuite utilisé l'immunoprécipitation pour vérifier que *TgSORTLR* co-immuno-précipite avec les composants du Rétromère. La protéine *TgSORTLR* est révélée par immuno-marquage dans les IPs *TgVps35* et *TgVps26* mais pas dans l'IP *TgVps29* (Figure 1 B). Afin de déterminer la stœchiométrie de chaque composant du complexe Rétromère, nous avons utilisé une technique de quantification absolue en spectrométrie de masse. Ces résultats indiquent que le ratio entre *TgVps35* et *TgVps26* est de 1 : 1, alors que celui de *TgVps35* et *TgVps29* est de 3 : 1 (Figure 1 C). Ces données suggèrent que *TgVps29* est l'élément régulateur de la formation du complexe lorsqu'un ratio de 1 : 1 : 1 est requis pour obtenir un Rétromère fonctionnel. Nous avons ensuite identifié 17 protéines partenaires du CRC dans l'interactome (Figure 1 D), à partir des critères de sélections suivants : 1) identifier avec au moins 2 peptides spécifiques ; 2) dans au moins deux immunoprécipitations d'un composant du Rétromère ; 3) absente du contrôle négatif (Table S1). *TgVps35* et *TgVps26* partagent la plupart des partenaires 12 sur 17 (Figure 1 D). L'analyse fonctionnelle des partenaires révèle que la présence de Rab5B, un marqueur des endosomes précoces et Rab11B, un autre marqueur qui est essentiel pour la biogenèse du complexe membranaire interne (IMC). La protéine TBC1D5 régulatrice de Rab7 est également présente. Nous confirmons aussi la présence de *TgSORTLR*, et d'une protéine SNARE essentielle à la fusion des membranes. Sur les 17 partenaires, 9 sont des protéines hypothétiques (HP) qui sont des protéines spécifiques du parasite dont les fonctions sont actuellement inconnues (Figure 1 D). Par microscopie confocale, *TgVps26*, *TgVps29* et *TgVps35* co-localisent avec *TgSORTLR*, VP1 et proM2AP, deux marqueurs du TGN et l'ELC (Figure 1 E), indiquant qu'à travers ces deux compartiments, le Rétromère joue proprement une fonction de recyclage des vésicules (Figure 1 F).

La protéine Vps35 est connue pour être au cœur de l'assemblage du Rétromère chez les mammifères et *S. cerevisiae*. Afin de déterminer le rôle biologique du Rétromère chez *T. gondii*, nous avons généré un mutant conditionnel avec le système ATc (Anhydro-Tétra-cycline) que nous avons dénommé iKo*TgVps35* (Figure 2A). Nous avons vérifié l'intégration du plasmide dans le locus *TgVps35* pour trois clones différents (Figure 2 B). Après un traitement ATc de 48h sur les parasites, la protéine HA-*TgVps35* n'est plus détectable par immuno-marquage sur les trois clones, contrairement aux parasites non traités (Figure 2C), ainsi qu'en immunofluorescence anti-HA (Figure 2 D). Pour confirmer les phénotypes observés lors de la disruption du gène *TgVps35*, nous avons introduit une autre copie du gène *TgVps35* avec une étiquette cMyc (Comp-iKo*TgVps35*) dans le locus uracil phosphoribosyl transférase (UPRT). En l'absence de la protéine *TgVps35*, le parasite est incapable d'envahir la cellule hôte (Figure 2E) et de faire des plaques après plusieurs cycles lytiques d'invasion et de ré-invasion des cellules hôtes (Figure 2F). Les phénotypes normaux sont restaurés dans le parasite Comp-IKo*TgVps35* comme avec la souche sauvage RH Tati (Figure 2E ; Figure 2F). Chez la souris, l'infection avec une dose létale de la souche iKo*TgVps35* en présence d'ATc ne conduit pas à la mort de l'animal (Figure 2G) et ne protège pas la souris contre une infection ultérieure avec une souche virulente RH de type sauvage (Figure 2H) ; contrairement au contrôle sans ATc, Comp-iKo*TgVps35* et RH Tati (Figure 2G ; Figure 2H). *TgVps35* est essentielle à la virulence du parasite, et son absence ne confère pas un statut d'immunité contre une nouvelle infection.

En microscopie électronique, après un traitement de 48h, le parasite iKo*TgVps35* montre une morphologie structurale complètement désorganisée et une absence de tous les organites de sécrétion : micronèmes, rhoptries et granules denses (Figure 3B ; Figure 3C), contrairement au parasite non traité (Figure 3A). En présence d'ATc le parasite Comp-iKo*TgVps35* montre un phénotype normal (Figure 3 D). *TgVps35* est essentielle à la biogenèse des organites qui sont responsables de la virulence du parasite. Nous avons étudié le devenir des protéines contenues dans ses organites. Les protéines de ROP et de MIC sont complètement délocalisées dans la vacuole parasitophore (Figure 4A panneau inférieur, droit et intermédiaire), de plus la protéine GRA1 dont la localisation normale est au tour de la membrane de la VP (Figure 4A panneau supérieur, gauche), se retrouve retenue dans le parasite et l'espace intravacuolaire de la VP (Figure 4A panneau inférieur, gauche). En l'absence de *TgVps35*,

l'immuno-marquage des protéines de ROP et MIC montrent un défaut dans le processus de maturation protéolytique connue ; ces protéines sont essentiellement dans leurs formes immatures (Figure 4C). La complémentation (Comp-iKo *TgVps35*) corrige parfaitement l'ensemble des phénotypes et des défauts énoncés précédemment (Figure 4B et Figure 4D). Tous ces résultats suggèrent que la fonction du Rétromère est essentielle au trafic normal des protéines de sécrétion et à la biogenèse des organites apicaux.

Dans la Figure 4B, nous avons remarqué que le niveau de *TgSORTLR* qui est le récepteur transporteur des protéines ROP et des MIC reste inchangé en présence ou en absence de *TgVps35* (idem pour le contrôle interne ENO2). Suggérant que la protéine *TgSORTLR* n'est pas dégradée en l'absence de fonction du Rétromère. Grâce à une technique de microscopie à fluorescence haute résolution SIM (Structured Illumination Microscopy), nous avons déterminé la localisation de *TgSORTLR* en l'absence de *TgVps35*. Dans les conditions normales, environ 20% de *TgSORTLR* co-distribue avec le marqueur golgien GRASP-RFP, en l'absence de *TgVps35*, *TgSORTLR* perd cette codistribution avec le marqueur golgien (Figure 5A, B). En absence de *TgVps35*, la codistribution de *TgSORTLR* est fortement augmentée avec le marqueur Rab5A et Rab7, respectivement 90% (Figure 5C, D) et 99% (Figure 5E, F) ; contrairement aux conditions normales avec une codistribution de 60% pour Rab5A (Figure 5C, D) et 50% pour Rab7 (Figure 5E, F). Nous avons réalisé des expériences d'interactions *in vitro*, montrant que *TgVps26* fixe Rab7 d'une manière GTP-dépendante. Les protéines Rab11B et Rab5B identifiées dans l'interactome sont fixées par *TgVps26* et *TgVps35* indépendamment du statut GTP/GDP de ses GTPases (Figure S1). Ces résultats sont en accord avec le modèle que nous proposons (Figure 5G) selon lequel *TgSORTLR* est recyclée par le complexe Rétromère à partir du compartiment Rab7 positif, et ce recyclage est essentiel au transport et à la biogenèse des organites tels que les micronèmes et rhoptries.

La question principale qui se pose est de savoir si le complexe Rétromère a une autre fonction différente du recyclage de la *TgSORTLR*. Nous avons alors généré un parasite Knock-in (KI) de *TgVps35* avec une étiquette HA, dans le mutant conditionnel iKo *TgSORTLR*. En l'absence de *TgSORTLR* une partie de la protéine *TgVps35* a une localisation plus diffuse dans le cytoplasme du parasite (Figure 6A panneau droit) par

rapport au mutant non traité ATc (Figure 6A panneau gauche). Cependant, une grande partie de *TgVps35* est néanmoins correctement localisée à l'ELC (Figure 6A panneau droit), suggérant que le Rétromère est impliqué dans le recyclage d'autres cargos. Nous avons alors cherché des motifs indiquant la présence de transporteurs parmi les 9 protéines HP de l'interactome. Nous avons identifié une protéine transmembranaire de type1 *TgHP12* avec un domaine « coiled-coil » en extrémité C-terminale (Figure S2A), conservée dans le phylum des Apicomplexa (Figure 6B). Cette extrémité C-terminale présente plusieurs homologues mais faibles avec la Rabenosyne-5 et FIP2 connues pour des interactions avec les Rabs (Figure S2B) (Eathiraj *et al.*, 2005; Lall *et al.*, 2013), ainsi que la région « coiled-coil » semblable à celle des « Syntaxin » (Figure S2B). Nous avons déterminé les interactions entre *TgHP12* et les composants du Rétromère, par un « knock in » (KI) de *TgHP12* avec une étiquette cMyc dans le mutant *iKoTgVps35*. La protéine *TgHP12* co-localise avec HA-*TgVps35* et fortement avec *TgSORTLR* (Figure 6C, panneau supérieur). Toutefois, il n'existe pas de colocalisation avec les marqueurs de l'ELC, proM2AP et CPL (Figure 6C, panneau inférieur), suggérant que *TgHP12* est plus localisée dans le TGN que dans l'ELC. *TgHP12* immunoprécipite *TgVps26*, *TgVps29* et *TgVps35* ainsi que *TgSORTLR* (Table 2, panneau D de la Figure 6), et réciproquement chaque composant du CRC immunoprécipite *TgHP12* (Figure 6E). L'élution de l'IP *TgHP12* contient *TgVps35* (Figure 6G) et *TgSORTLR* (Figure 6F). Nous avons utilisé la disruption du gène grâce au système CRISPR/CAS9 afin de déterminer ses fonctions éventuelles (Figure S1C). Nous avons vérifié que le gène *TgHP12* est correctement interrompu ainsi que l'expression de la protéine correspondante par IFA (Figure S1D, panneau supérieur, premier à gauche). Nous avons découvert que *TgHP12* n'a pas une fonction nullement apparentée au *TgSORTLR*, car son absence n'affecte ni le transport des micronemes, ni celui de rhoptries ; ainsi que les granules denses non plus (Figure S1D). *TgHP12* interagit avec d'autres protéines (Table S3), suggérant le rôle de cette protéine dans une autre voie de trafic vésiculaire si elle est vraiment impliquée dans le transport de protéines, ce qui n'est pas prouvé à l'état actuel de nos travaux.

L'interactome et l'analyse bio-informatique nous ont permis d'identifier *TgHP03*; une protéine avec une topologie à 12 domaines transmembranaires. L'analyse structurale prédit que cette protéine appartient à la famille des MSF (major facilitator superfamily) (Figure 7A). Cette famille de protéines facilite le mouvement de petites molécules à

travers la membrane plasmique (Law *et al.*, 2008). Nous avons donc cherché à établir un lien entre le Rétromère et une protéine à multiples domaines transmembranaires donc un potentiel transporteur de la membrane plasmique. Pour déterminer la localisation de *TgHP03*, nous avons généré un parasite KI *TgHP03* avec une étiquette cMyc en position C-terminale. L'immunofluorescence sans perméabilisation de parasites extracellulaires confirme la localisation membranaire et la topologie de la protéine (Figure 7B ; 7C panneau supérieur gauche) ; ceci est confirmé aussi dans les parasites intracellulaires (Figure 7C panneau supérieur droit). En l'absence de *TgVps35*, la protéine *TgHP03* perd sa localisation membranaire et devient vésiculaire dans le cytoplasme du parasite (Figure 7C, panneau inférieur droit et gauche). Le niveau de la protéine *TgHP03* en immuno-marquage reste inchangé en l'absence ou en présence d'ATc (Figure 7E ; 7F), signifiant qu'elle ne suit pas la voie de dégradation vers le lysosome, comme c'est cas chez les mammifères pour ce type de transporteurs (McGough *et al.* 2004). Nous avons vérifié si cette délocalisation en l'absence de *TgVps35* est spécifique seulement à ce type de protéine membranaire. Nous avons donc vérifié la localisation des glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored major surface SAG1 et SAG3 (Nagel and Boothroyd, 1989; Tomavo *et al.*, 1989), dont les localisations ne changent pas en absence de *TgVps35* (Figure 7D). Ces résultats suggèrent que le Rétromère de *T. gondii* est impliqué dans le recyclage spécifique de protéines MSF entre les endosomes et la membrane plasmique mais probablement également pour d'autres protéines transmembranaires, ce qui reste à démontrer.

En conclusion, nos résultats démontrent tout d'abord que le Rétromère de *T. gondii* est fonctionnel, et que sa fonction de recyclage de *TgSORTLR* entre le compartiment Rab7 positif et le TGN, est essentielle à la biogenèse des organites tels que les micronèmes et rhoptries, mais aussi des granules denses. Ensuite, le Rétromère interagit avec une protéine transmembranaire de type 1 *TgHP12* parasitaire-spécifique, évoluant probablement dans des voies de trafic différentes de celle de la *TgSORTLR*. Enfin, le Rétromère recycle une protéine transmembranaire de type MSF *TgHP03*, entre le compartiment endosomale et la membrane plasmique. Ce dernier résultat suggère pour la première fois l'existence d'une voie de recyclage endocytaire dépendante du complexe Rétromère chez *T. gondii* (Figure 7G).

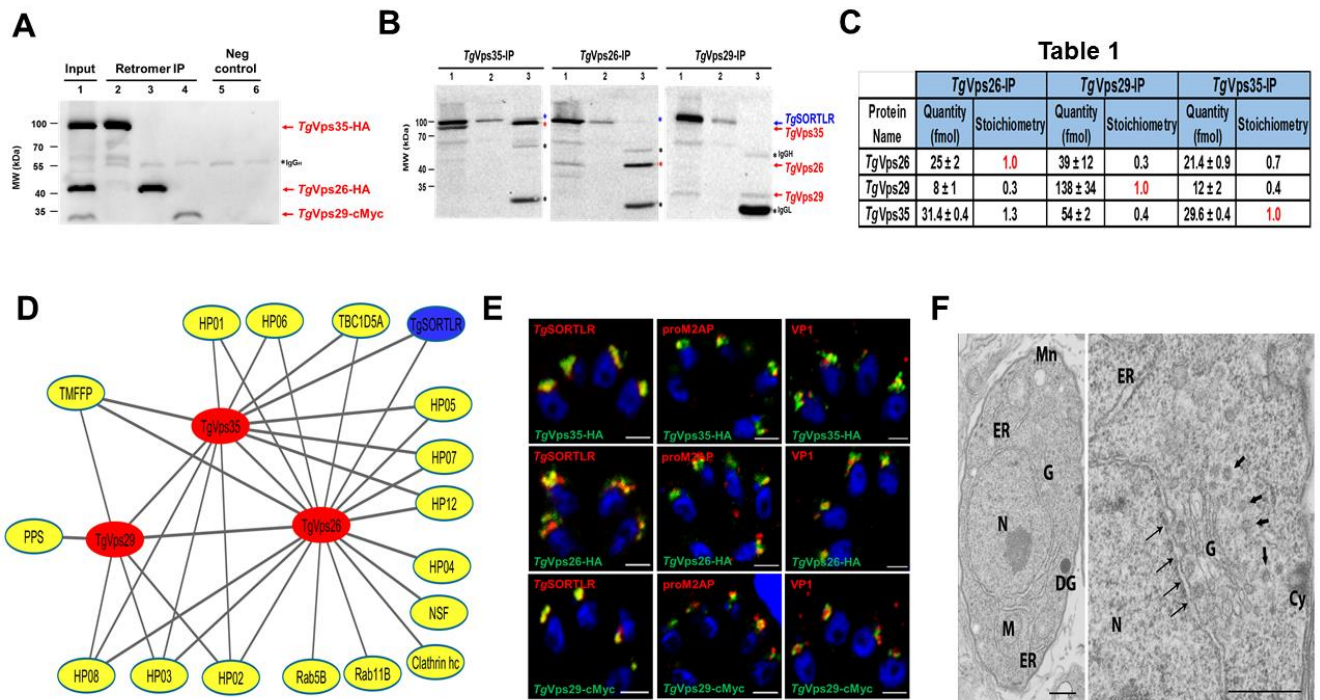


Figure 1

Figure 1. Interactome Reveals Cargo-Selective Complex and Other Interactors with the Retromer of *T. gondii*. (A) Co-immunoprecipitates of TgVps35-HA, TgVps26-HA, and TgVps29-cMyc were probed with rabbit anti-HA and anti-cMyc antibodies (lanes 2-4). Negative controls using untagged parental RH TaTi parasites (lanes 5 and 6) and total SDS-protein extracts (lane 1, input) are also shown. (B) Immunoblots of TgSORTLR in TgVps35-HA and TgVps26-HA coimmunoprecipitates. (C) Absolute quantification of each retromer component was performed using LCSRMS and isotope-labeled reference peptides. Protein ratios from duplicate experiments were averaged, and protein stoichiometry was shown. Also see [Table S1](#). (D) Retromer interactome identified TgVps35, TgVps29, and TgVps26 (red), TgSORTLR (blue) in addition to the putative phosphatidylinositol synthase (PPS), transporter major facilitator family protein (TMFFP), putative N-ethylmaleimide sensitive fusion protein (NSF), multi-pass transmembrane protein (MTP), Rab5, Rab11B, Rab7-GAP regulator TBC1D5A homolog, and parasite-specific hypothetical proteins (HP). Also see [Table S2](#). (E) Immunofluorescence of TgVps35, TgVps26, and TgVps29 is shown to co-localize with TgSORTLR, proM2AP and VP1. Bars, 2 μ m. (F) Ultrathin section of *T. gondii* (left panel) and a magnified image of the ELC (right panel), in which the TgVps35-TgVps29-TgVps26 trimer resides with TgSORTLR. Thin arrows indicate

vesicles emerging from ER and Golgi to TGN; bold arrows indicate those from Golgi to plasma membrane. Cy, cytosome; N, nucleus; G, Golgi;ER, endoplasmic reticulum; M, mitochondria; DG, dense granules; Mn: micronemes. Bars, 200 nm.

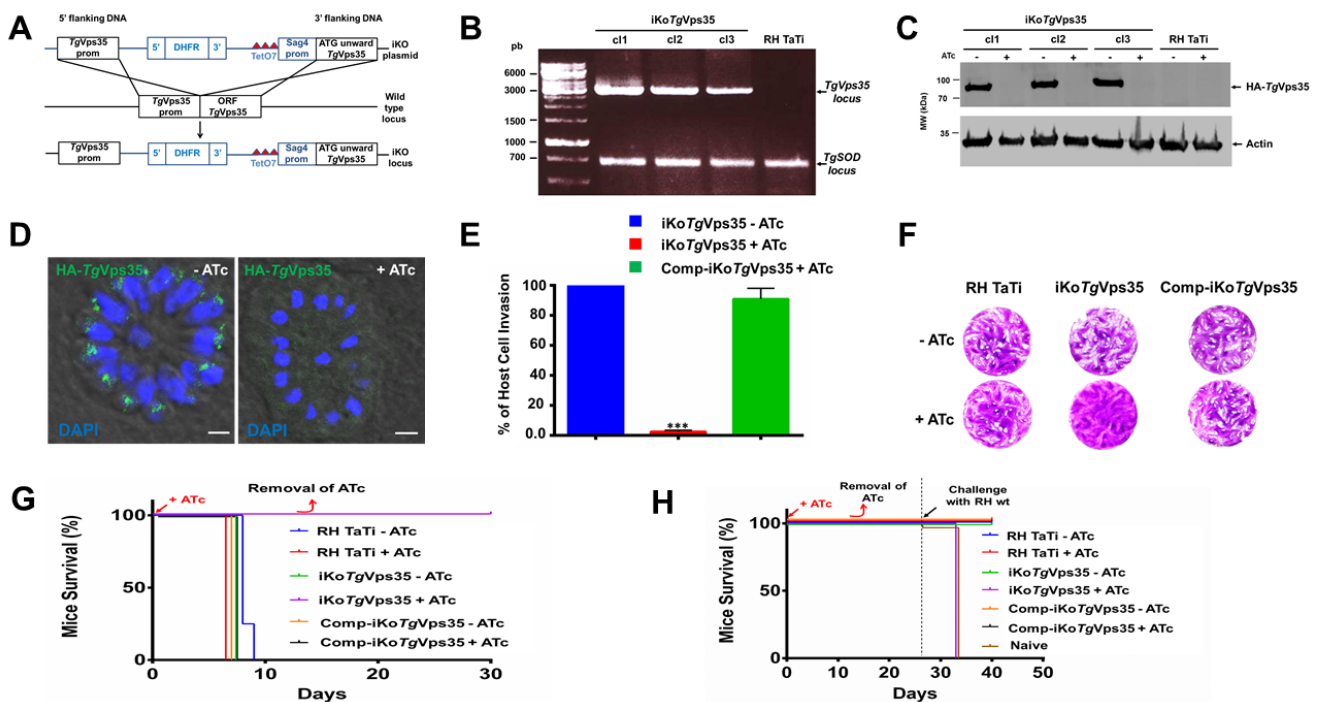


Figure 2

Figure 2. Conditional Ablation of *TgVps35* Gene and Resultant Phenotypic Traits. (A) Schematic of the approach used for the conditional ablation of the *TgVps35* gene. (B) PCR analysis of three clones with conditional disruption of *TgVps35* and the parental line. Superoxide dismutase (SOD) served as the positive control. Also see [Table S4](#) for primers. (C) Immunoblots of the three conditional iKo*TgVps35* mutants and RH TaTi parasites in the presence or absence of ATc. Immunoblots were probed with anti-HA antibodies. Actin served as a loading control. (D) Confirmation of *TgVps35* conditional depletion by confocal imaging. DAPI was used to stain nuclei. Bars, 2 μ m. (E) Host cell invasion was assayed in iKo*TgVps35* and complemented mutants in the presence and absence of ATc. Bars indicate mean \pm SD ($n=3$, $P<0.001$ by Student's test). (F) Host cell lytic plaques were examined in *TgVps35*-deficient mutants, CompiKo*TgVps35*, and parental RH TaTi parasites in the presence or absence of ATc.

(G) Survival of mice infected with *TgVsp35*-deficient mutants, Comp-iKo*TgVsp35*, and parental RH TaTi parasites in the presence and absence of ATc treatment was determined for 30 days. (H) Avirulent *TgVsp35*-depleted parasites do not confer protective immunity to reinfection with wild-type parasites.

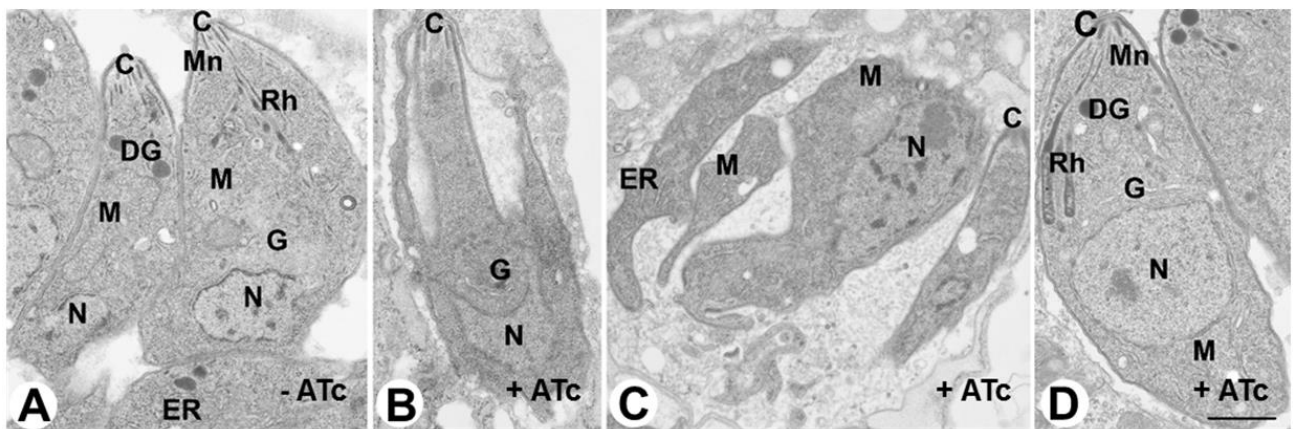


Figure 3

Figure 3. The *TgVsp35* Gene Is Essential for Secretory Organelle Biogenesis and Maintenance of Parasite Morphology.

(A) Transmission electron microscopy showing normal banana-shape morphology of iKo*TgVsp35* parasites in the absence of ATc. (B) An iKo*TgVsp35* mutant showing an aberrant morphology. (C) Four replicated daughter iKo*TgVsp35* mutants with disorganized body shapes without rhoptries, micronemes, and dense granules. (D) Complementation of iKo*TgVsp35* mutants restored normal parasite morphology with the presence of secretory organelles. N, nucleus; G, Golgi; ER, endoplasmic reticulum; C, conoid; M, mitochondria; Rh, rhoptries; Mn, micronemes; DG, dense granules. Bars, 200 nm.

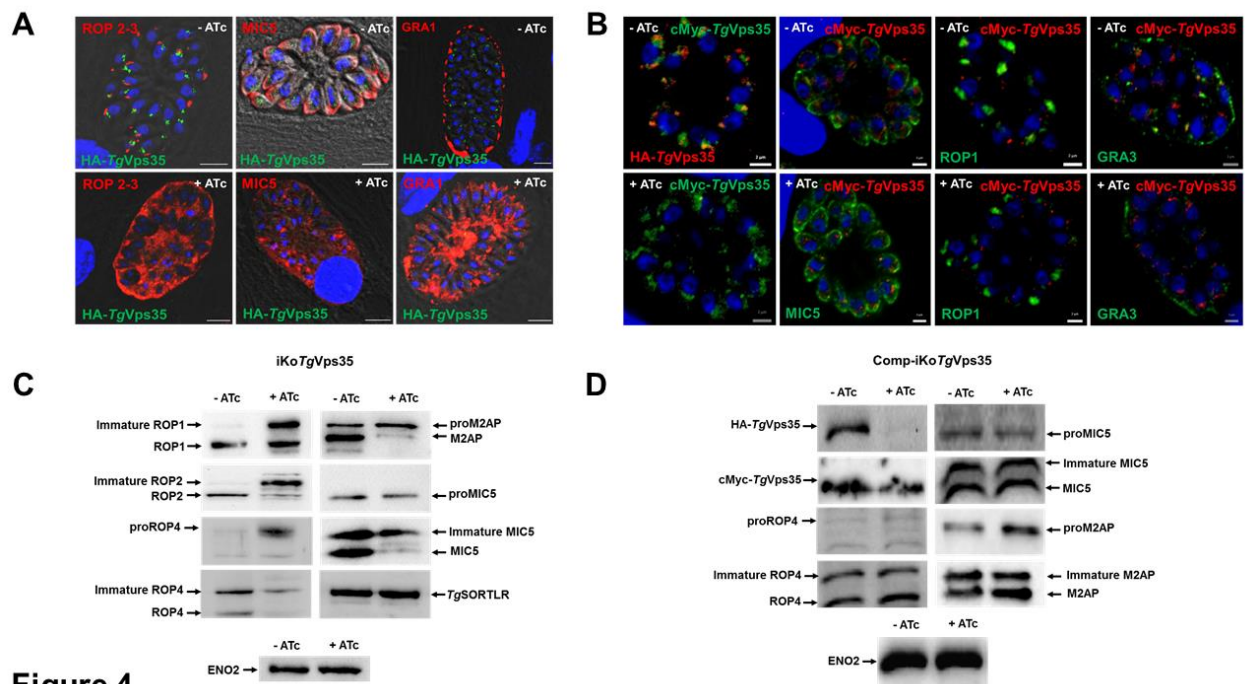


Figure 4

Figure 4. Conditional Ablation of *TgVps35* Results in Unprocessed and Missorted ROP, MIC, and DG proteins. (A) Immunofluorescences of ROP2-4, MIC5, and GRA1 proteins in iKo *TgVps35* mutants in the presence (lower panels) or absence of ATc (upper panels). (B) Immunofluorescences of MIC5, ROP1, and GRA3 proteins in complemented iKo *TgVps35* mutants in the presence (lower panels) or absence of ATc (upper panels). Bars, 2 μ m. (C) Immunoblots of iKo *TgVps35* mutants probed with anti-ROP1, ROP2, proROP4, ROP4, M2AP, proMIC5 and MIC5. *TgSORTLR* and ENO2 protein levels were identical in both ATc-treated and untreated mutants. (D) Immunoblots of complemented iKo *TgVps35* mutants probed with anti-ROP1, ROP2, proROP4, ROP4, M2AP, proMIC5, and MIC5 antibodies. ENO2 protein levels were identical in both ATc-treated and untreated mutants.

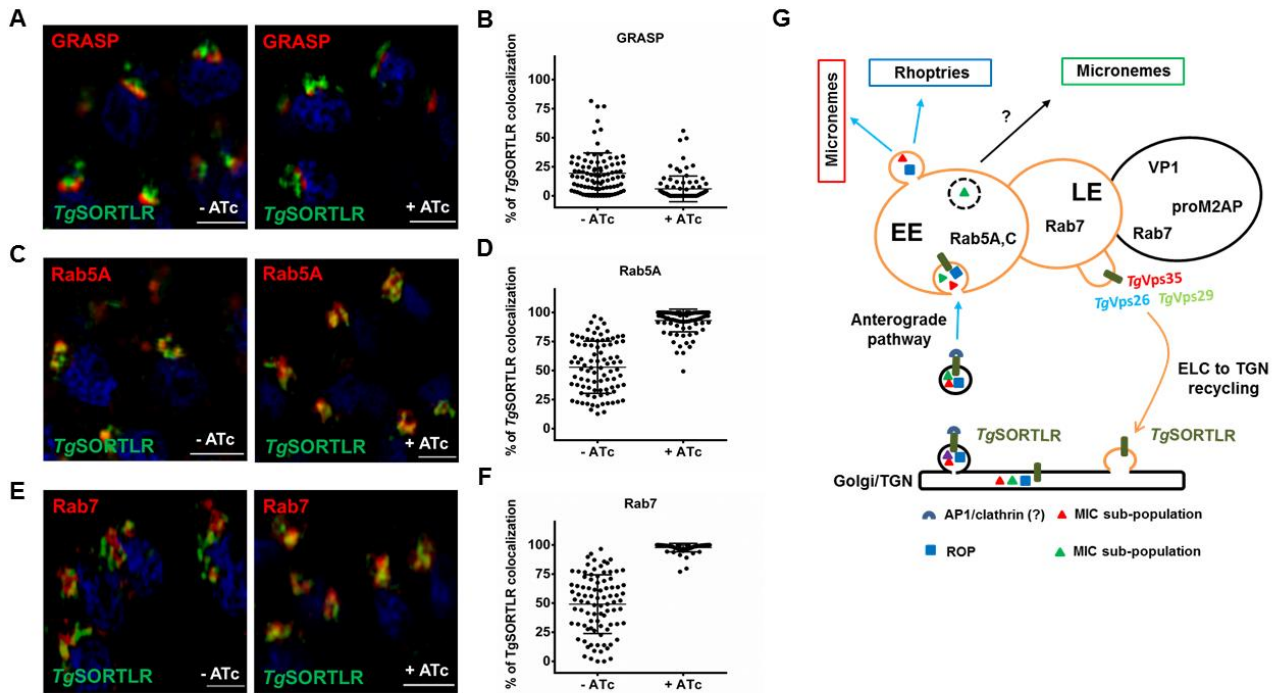


Figure 5

Figure 5. Recycling of *TgSORTLR* Is Blocked in Rab5- and Rab7-decorated Endosome-like Structures. (A and B) Visualization and quantification of the co-distribution of *TgSORTLR* with Golgi marker GRASP in *iKoTgVps35* mutants by SIM in the absence or presence of ATc. (C) and (D) Co-distribution of *TgSORTLR* and quantification in *iKoTgVps35* mutants with the marker of early endosome Rab5A in the presence or absence of ATc. (E) and (F) Co-distribution of *TgSORTLR* and quantification in *iKoTgVps35* mutants with the marker of late endosome marker Rab7 as above. Bars indicated the mean $n=90$ parasites \pm SD, $P<0.0001$. Also related to [Figure S1](#). (G) Proposed model of Rab7 as the key small GTPase in recycling of *TgSORTLR* from endosomes to TGN for another round of ROP and MIC transport and secretory organelle biogenesis.

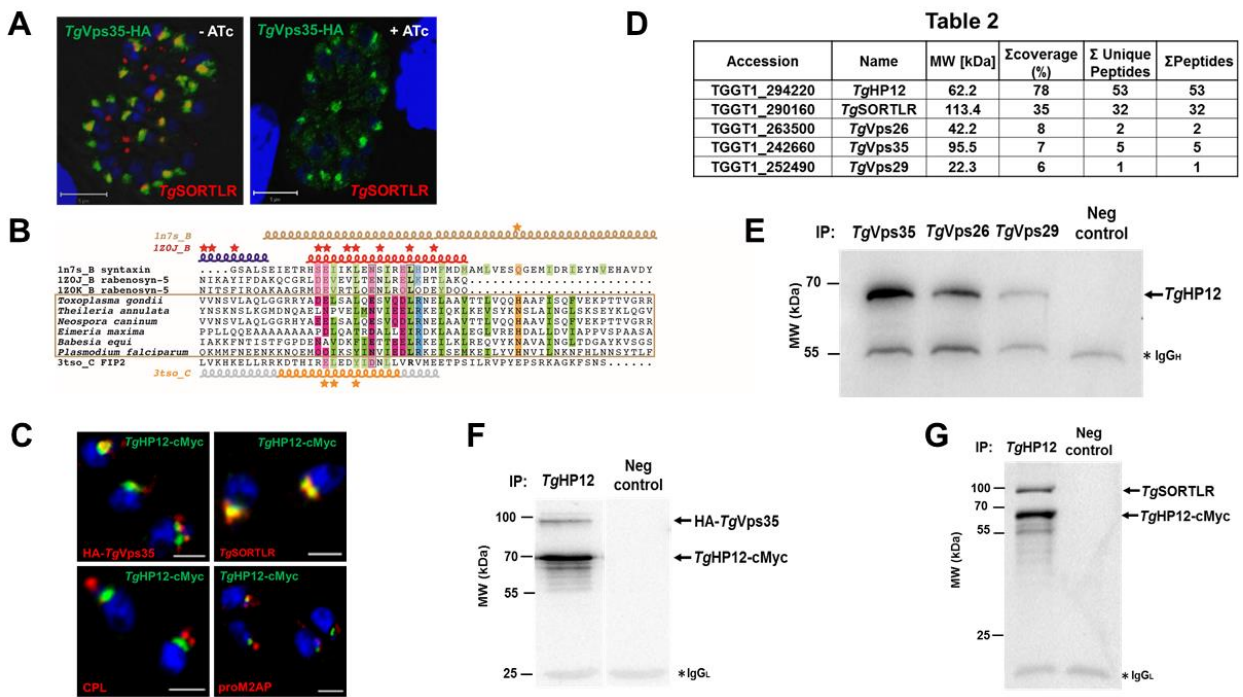


Figure 6

Figure 6. TgHP12 Is a Novel Putative Cargo-Sorting Receptor. (A) Confocal imaging of *TgVps35*-HA knock-in in *iKoTgSORTLR* mutants in the presence or absence of ATc treatment. Bars, 5 μ m. (B) Putative alignment of the helical region in *TgHP12* protein and in orthologues from apicomplexan parasites with human syntaxin (pdb 1n7s_B, syntaxin), rabenosyn-5 (1z0j_B and 1z0k_B), and FIP2 (pdb 3tso_C). Secondary structures are reported above the alignment. Stars indicate amino acids involved in Rab binding (rabenosyn-5 and FIP2) and the conserved glutamine of syntaxin that participates in the ionic central layer of SNARE complexes. Genbank identifier (gi) and N- and C-terminal limits are as follows: *Theileria annulata* (85000999, aa 239- 297), *Neospora caninum* (401395596, aa 42-100), *Eimeria maxima* (557188226, aa 283-342), *Babesia equi* (510902511, aa 253-311), and *Plasmodium falciparum* (583212139, aa 375-433). Also see Figure S2. (C) Confocal imaging of *TgHP12* with *TgVps35*, *TgSORTLR*, CPL, and proM2AP. (D) Co-immunoprecipitates of *TgHP12* were analyzed by mass spectrometry to reveal *TgVps35*, *TgVps29*, *TgVps26*, and *TgSORTLR*. Also see Table S3. (E) Reverse immunoprecipitation of knock-in *TgVps35*-HA, *TgVps29*-cMyc, or *TgVps26*-HA revealed binding with *TgHP12*. (F) *TgHP12*-cMyc and *TgVps35*-HA proteins were concomitantly coimmunoprecipitated in parasites with knock-in *TgHP12*-

cMyc/iKo *TgVps35*. (G) *TgHP12*-cMyc and *TgSORTLR* proteins were concomitantly coimmunoprecipitated from parasites with knock-in *TgHP12*-cMyc/iKo *TgVps35*.

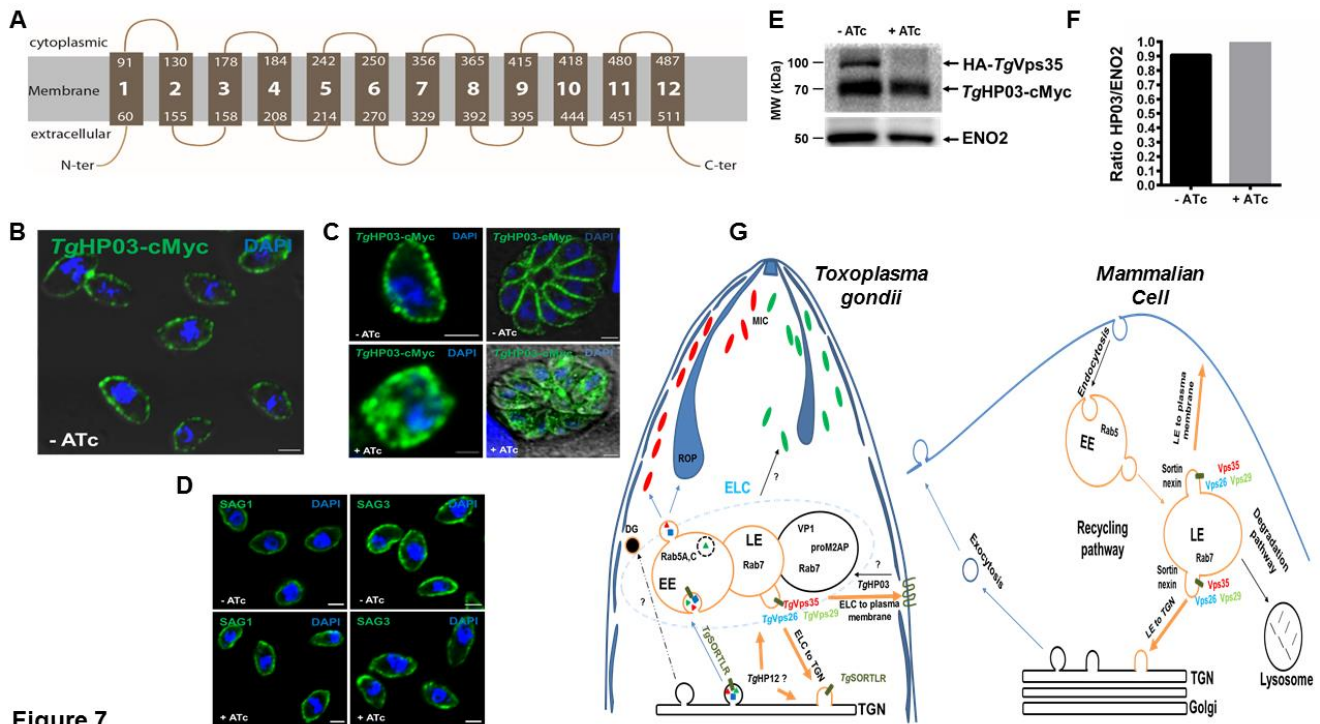


Figure 7

Figure 7. Retromer Is Required to Maintain the Plasma Membrane of *TgHP03*. (A) Schematic representation of *TgHP03* topology inside the parasite membrane. (B) Confocal imaging of extracellular parasites with knock-in *TgHP03*-cMyc/iKo *TgVps35* in the absence of ATc and detergent permeabilization. (C) Magnified image of an extracellular parasite with knock-in *TgHP03*-cMyc/iKo *TgVps35* (upper, left panel), an intracellular parasite with knock-in *TgHP03*-cMyc/iKo *TgVps35* in the absence of ATc and detergent permeabilization (upper, right panel), an intracellular parasite with knock-in *TgHP03*-Myc/iKo *TgVps35* in the presence of ATc treatment followed by detergent permeabilization (lower, left panel), and an intracellular parasite with knock-in *TgHP03*-cMyc/iKo *TgVps35* in the presence of ATc treatment followed by detergent permeabilization (lower, right panel). (D) The surface localization of GPI-anchored SAG1 and SAG3 were determined in iKo *TgVps35* mutants in the presence or absence of ATc. (E) Immunoblots of parasites with knock-in *TgHP03*-cMyc/iKo *TgVps35* in the presence or absence of ATc. ENO2 was used as a loading control. (F) Quantification

of *TgHP03* levels in these parasites in the presence or absence of ATc. (G) Comparative models of retromer-mediated endocytic recycling of diverse sorting cargoes between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. No recognizable sorting nexins, BAR-containing domain proteins as well as lysosomal-like protein degradation have been identified in *T. gondii*. Instead, the retromer-dependent recycling is essential for secretory organelle formation and parasite shape.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

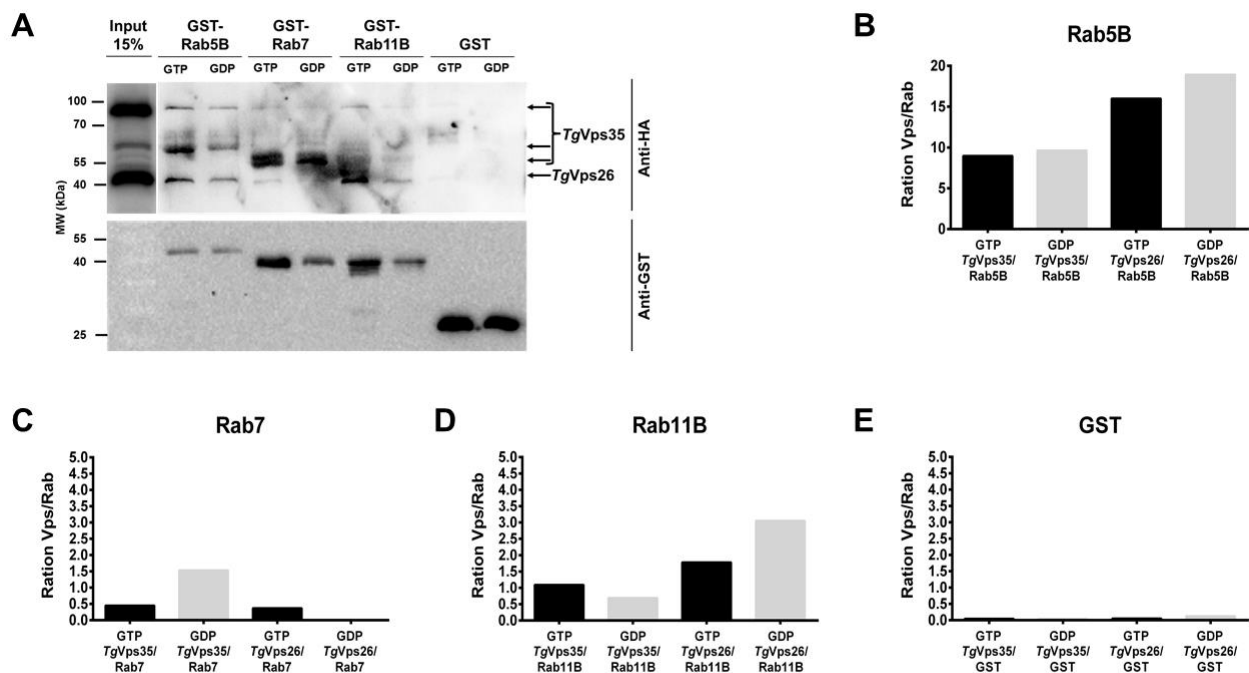


Figure S1

Figure S1. Rab7 specifically interacts to the core retromer component *TgVps26*. (A) and (H) Immunoblots demonstrating that only Rab7 physically interacts with *TgVps26* protein in GTP-dependent manner.

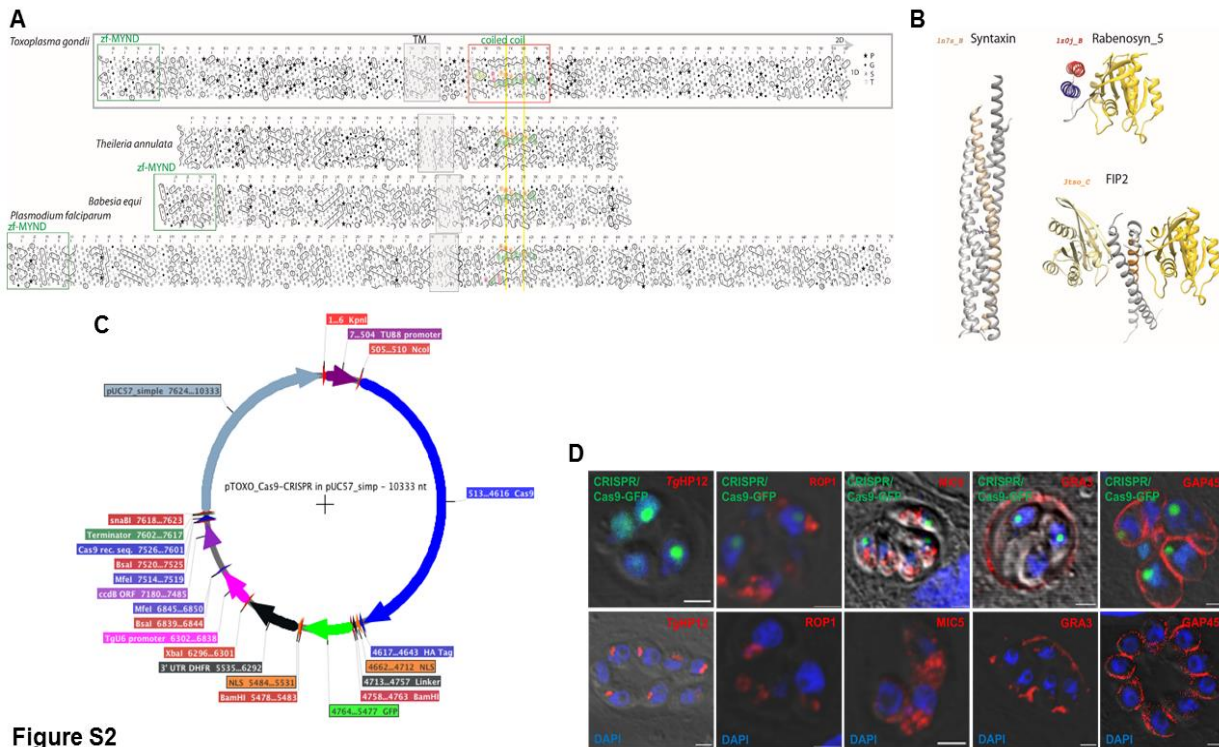


Figure S2

Figure S2. Bioinformatics and Genetic analyses of *TgHP12* (A) Hydrophobic Cluster Analysis (Callebaut et al., 1997 was used to identify *TgHP12* homologs.

The sequences are shown on a duplicated helical net, on which hydrophobic amino acids (V I L M F Y W) are contoured. These form cluster, which mainly corresponds to the internal faces of regular secondary structures. As clusters are much more conserved than 1D sequence, these can be used to compare highly divergent sequences and to highlight conserved regions. This is specifically the case here, as a conserved helical region (boxed) can be highlighted on the entire *TgHP12* sequences after a putative transmembrane (TM) segment. Cluster similarities are indicated in green, whereas sequence identities/similarities are shown in orange and pink. (B) Experimental 3D structures of proteins including segments (colored), which share some sequence similarities with the conserved helical region of *TgHP12*. The colored segments correspond to those highlighted on the sequence alignment shown in Figure 6B. Rab proteins are shown in yellow (at right). (C) Map of plasmid used for *TgHP03* disruption by CRISPR/CAS9 system. (D) Confocal images of intracellular tachyzoites whose *TgHP03* gene was disrupted by transient transfection of CRISPR/CAS9 plasmid and stained by anti-*TgHP03*, anti-ROP1, anti-MIC5, antiGRA3 and anti-GAP45

antibodies (upper panels). As negative controls, parental tachyzoites were not transfected and stained with the same antibodies. Note that there is no phenotypic difference between Cas9-mediated disruption of *TgHP03* and the parental parasites for biogenesis of rhoptries, micronemes and dense granules. Using the profile-profile comparison tool HH-PRED (Söding et al., 2005), potential relationships of *TgHP12* helical region were highlighted with two helical structures present in Rabenosyn-5 and FIP2 (Figure 6B and Figure S1B), known to be involved in the interaction with the Rab switch regions (Eathiraj et al., 2005; Lall et al., 2013). Another putative similarity was also established with the coiled-coil region of syntaxin, with which *TgHP12* shares typical heptad repeats (Figure 6B and Figure S1B). Interestingly, a conserved histidine present in the *TgHP12* homologs aligns with the syntaxin glutamine known to interact with both glutamine and arginine residues in the ionic central layer of SNARE complexes (Ernst and Brunger, 2002). Because these similarities represent only short segments, no statistical evidence could clearly establish a significant relationship with one or another protein. In addition, we presently failed to demonstrate Rab-binding activity to recombinant *TgHP12* protein. Further experimental validations that are presently beyond the scope of this study are required to ascribe a possible SNARE-mediated vesicle fusion or Rab-binding-like function to *TgHP12*.

B. Caractérisation d'une protéine atypique à domaine BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) et SBF2 (Set Binding Factor) *TgHP25*, chez *Toxoplasma gondii*

I. Identification de la protéine par immunoprécipitation de *TgVps35*-HA dans le parasite lko *TgSORTLR*

L'obtention du parasite Ki *TgVps35*-HA dans le mutant iKo *TgSORTLR* nous a permis d'observer qu'en absence de la *TgSORTLR* dans les conditions ATc, une partie de la protéine *TgVps35* est diffuse dans le cytosol mais une seconde partie est toujours correctement localisée au sein de l'ECL (Article Figure 6A). Ce résultat suggère que le complexe Rétromère prend en charge d'autres types de cargo différents de la *TgSORTLR*. Nous avons alors utilisé le parasite Ki *TgVps35*-HA/iKo *TgSORTLR* pour réaliser des IPs comparatives avec *TgVps35* en présence et en absence de la *TgSORTLR* (Figure 18).

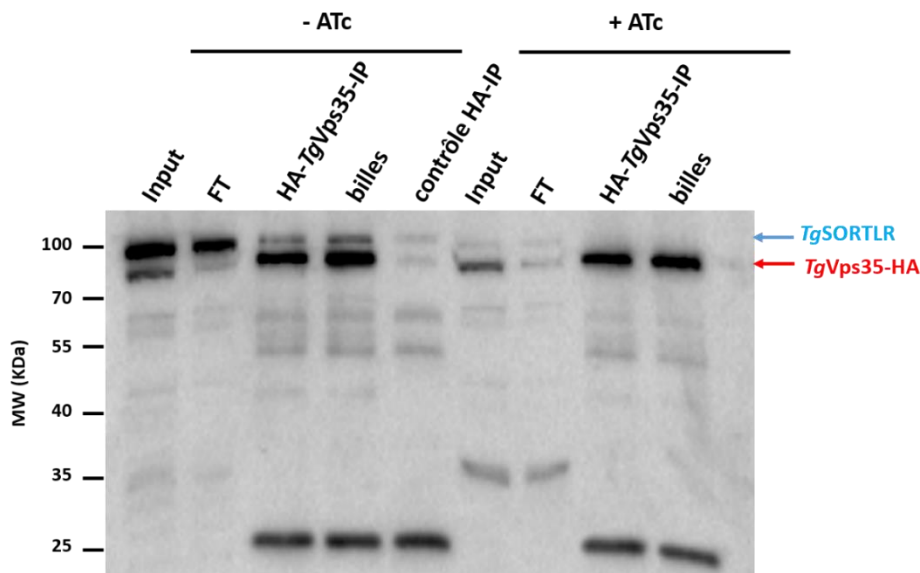


Figure 18 : Immunoprecipitations *TgVps35* en absence et en présence d'ATc. Fraction totale du lysat (Input) ; fraction non retenue après incubation sur billes anti-HA (FT) ; fraction éluée (HA-*TgVps35*-IP) ; fraction restante sur bille anti-HA après elution (billes). Le contrôle HA-IP correspond à un lysat parasite de RH sauvage. En bleu est indiquée la bande de la *TgSORTLR* (110 KDa) et en rouge la *TgVps35* (95 KDa).

Le traitement ATc des parasites permet de diminuer drastiquement la quantité de *TgSORTLR* immunoprécipitée avec *TgVps35*, comparativement avec l'IP sans traitement ATc. Les deux éluions avec et sans la *TgSORTLR* ont été ensuite analysées en spectrométrie de masse pour identifier les partenaires. Pour les résultats globaux sans application de filtres, dans l'IP (-ATc) 793 protéines ont été identifiées contre 818 dans l'IP (+ATc). 633 protéines sont communes aux deux IPs, 160 sont spécifiques à l'IP (-ATc) et 183 à l'IP (+ATc) (Figure 18 A). Nous avons ensuite appliqué un filtre (obtenue à partir des identifications du contrôle IP) permettant de soustraire toute les protéines qui viennent de manière non-spécifique dans les deux IPs.

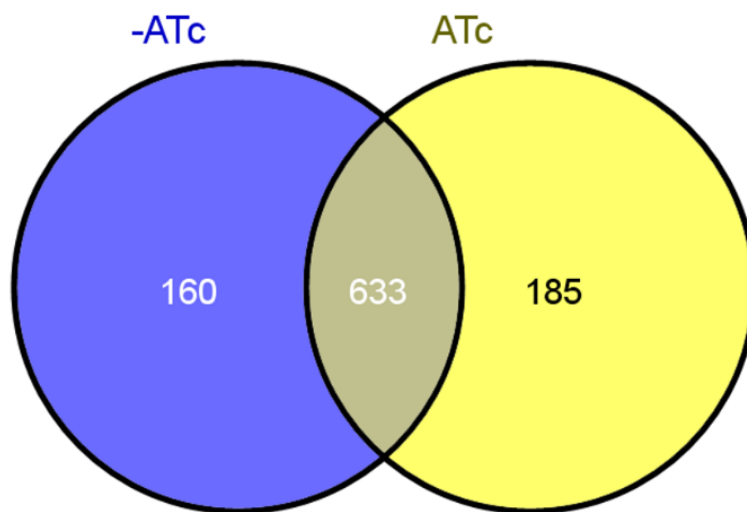


Figure 19 : Analyse protéomique des résultats d'IPs *TgVps35*. Diagramme de verne représentant la comparaison entre le nombre de protéines identifiées en spectrométrie de masse en absence et en présence d'ATc.

Onze (11) protéines spécifiques, venant uniquement dans l'une ou l'autre des deux IPs ont été sélectionnées. Afin de déterminer si ces protéines sont quantitativement présentes dans les IPs, nous avons utilisé une technique de quantification relative « Label-free ». Cette technique est basée sur le compte du nombre de spectres MS/MS de peptides spécifiques (minimum 3) d'une protéine. Sur cette base 6 protéines ont été quantifiées avec un minimum de 2 peptides, dont 3 avec un minimum de 3 peptides spécifiques (Tableau 4). Nous avons effectué une analyse bio-informatique afin de détecter des domaines particuliers sur cette liste de protéines (ExpaSy). Dans cette liste nous avons la protéine impliquée dans le transport pour « trafficking protein » Mon1, trois protéines HP sans domaine apparent, une HP avec un domaine putatif transmembranaire et un HP avec un domaine BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) en N-terminale (Tableau 4). Comme ce domaine BAR est présent dans certaines SNX, nous nous sommes donc intéressés à cette protéine HP dénommée donc *TgHP25* (TGGT1_259720) et qui est 5 fois plus présente dans l'IP (+ATc) (Figure 20). Ce résultat suggère que la fixation de *TgHP25* sur *TgVps35* est indépendante de la présence de *TgSORTLR*, donc dans une voie de trafic indépendante à cette dernière.

Tableau 4 : Liste des protéines quantifiées en Label free

Nom Protéine	Description Protéine	Nombre précurseur par protéine
1 TGGT1_246580	organism=Toxoplasma_gondii_GT1 product=hypothetical protein location=TGGT1_chrXII:2793978-2797673(+) length=383 sequence_SO=chromosome SO=protein_coding	2
2 TGGT1_410370	organism=Toxoplasma_gondii_GT1 product=putative transmembrane protein location=AAQM03000265:733-2584(+) length=435 sequence_SO=contig SO=protein_coding	6
3 TGGT1_259720	organism=Toxoplasma_gondii_GT1 product=hypothetical protein location=TGGT1_chrVIIb:2665016-2671225(+) length=976 sequence_SO=chromosome SO=protein_coding	5
4 TGGT1_257760	organism=Toxoplasma_gondii_GT1 product=hypothetical protein location=TGGT1_chrVIIb:3778456-3782184(-) length=1242 sequence_SO=chromosome SO=protein_coding	2
5 TGGT1_204310	organism=Toxoplasma_gondii_GT1 product=hypothetical protein location=TGGT1_chrVIIa:1788679-1809781(+) length=2209 sequence_SO=chromosome SO=protein_coding	6
6 TGGT1_291120	organism=Toxoplasma_gondii_GT1 product=trafficking protein mon1 subfamily protein location=TGGT1_chrIX:3938096-3949369(+) length=1086 sequence_SO=chromosome SO=protein_coding	3

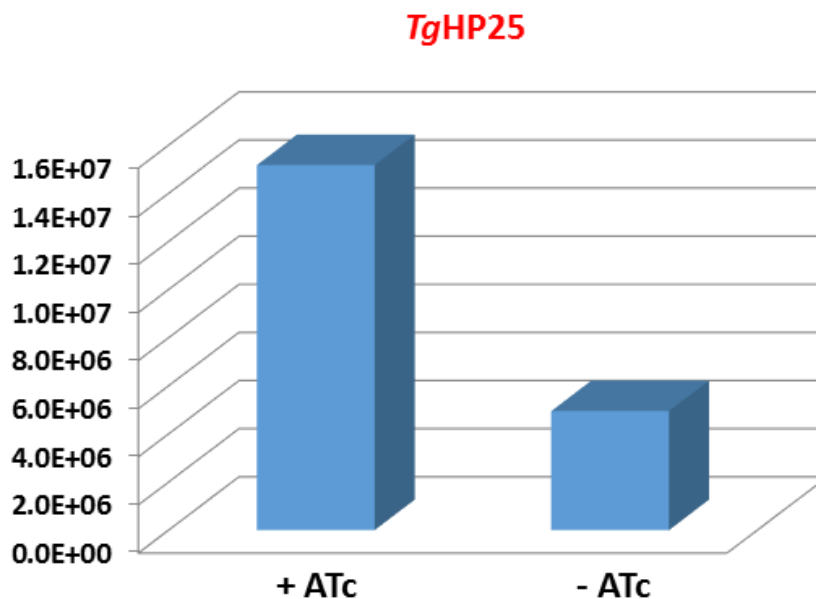


Figure 20 : Quantification « Label free » de la protéine TgHP25 dans les IPs TgVps35. Le Label free est une technique semi-quantitative, permettant de compter le nombre de spectres MS/MS des peptiques spécifiques d'une protéine. La sommation de l'ensemble des spectres permet d'obtenir une relative quantification de la protéine dans l'échantillon. La protéine TgHP25 est 5 fois plus présente dans l'IP en présence d'ATc qu'en absence d'ATc. Echelle unité arbitraire.

Par des analyses structurales de bio-informatique (HCA) (faites par Isabelle Callebaut, Université Paris VI), nous avons confirmé la présence du domaine BAR et la présence éventuelle d'autres domaines pouvant valider l'hypothèse que cette protéine pourrait être une SNX potentielle. Ces analyses confirment bien la présence d'un domaine BAR en position N-terminale (rouge) acides aminés 80-380 et en C-terminale d'un domaine SBF2 (Set Binding Factor) avec un domaine spécifique à *T. gondii* (Trait vert en pointillé) entre les acides aminés 500 et 700 et une partie conservée (trait vert plein) entre les acides aminés 710 et 830 (Figure 21).

La structure du domaine BAR en dimer a été modélisée à partir du domaine EFC de FBP17 (pdb 2efl) (Figure 22). Le domaine SBF2 présente dans les protéines Myotubularine (Kim et al., 2002); (Tsujiita et al., 2004); (Silhankova et al., 2010); (Velichkova et al., 2010) est connu pour avoir une activité GEF (Guanoside Exchange Factor), donc de fixer les protéines Rabs dans leur forme GDP. Ces résultats indiquent que nous avons une protéine hypothétiques chimérique *TgHP25* avec un domaine BAR permettant la fixation et la courbure de membranes et un domaine SBF2 connu pour son activité GEF.

- Domaine F-BAR
- Domaine Set Binding Factor (SBF) conservé
- - - Domaine SBF *Toxoplasma* spécifique

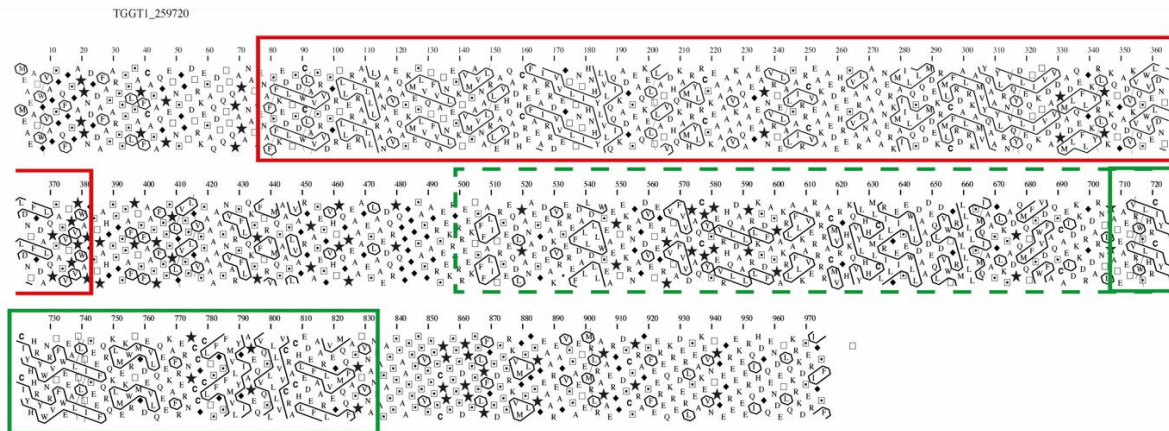


Figure 21 : Approche HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) de la protéine *TgHP25*. Prédiction de la structure secondaire d'une protéine à partir des éléments de séquence. Les acides aminés hydrophobes interactants sont distingués des acides aminés hydrophobes structurants.

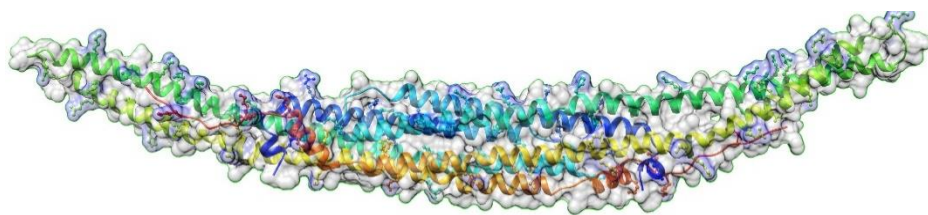


Figure 22 : Model du domaine F-BAR de *TgHP25*. La structure moule est celle du domaine EFC de FBP17 (pdb 2efl)

II. Etudes fonctionnelles de la protéine *TgHP25*

a. La localisation de la protéine *TgHP25*

Afin de déterminer la localisation de *TgHP25* au sein du parasite, nous avons amplifié 3000pb d'ADN génomique (Figure 23) qui est introduit dans le plasmide pLIC-cMyc-TUB5CAT.

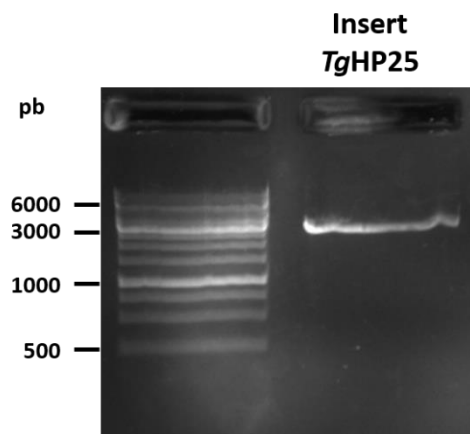


Figure 23 : Amplification de l'insert *TgHP25* à partir de l'ADN génomique du parasite.

Le plasmide a été ensuite utilisé pour transfecter le parasite mutant iKo *TgVps35*. *TgHP25* présente une localisation vésiculaire repartie dans l'ensemble du cytoplasme aussi bien vers le côté apical que basal. Comme on peut le voir sur la Figure 13, la protéine ne présente pas de contact avec la protéine GRA3 délimitant la vacuole parasitophore et GAP45 pour le complexe membranaire interne (Figure 24). Nous avons observé que la protéine *TgHP25*, bien que détectée de manière significative dans l'IP *TgVps35* ; ne co-localise pas particulièrement avec cette dernière. *TgHP25* semble être dans un compartiment au-dessus de *TgVps35* avec quelques points de co-localisations mineures avec *TgVps35* (Figure 25 A). Comme pour *TgVps35*, *TgHP25* co-localise aussi très peu avec le marqueur du TGN, *TgSORTLR* (Figure 25 B).

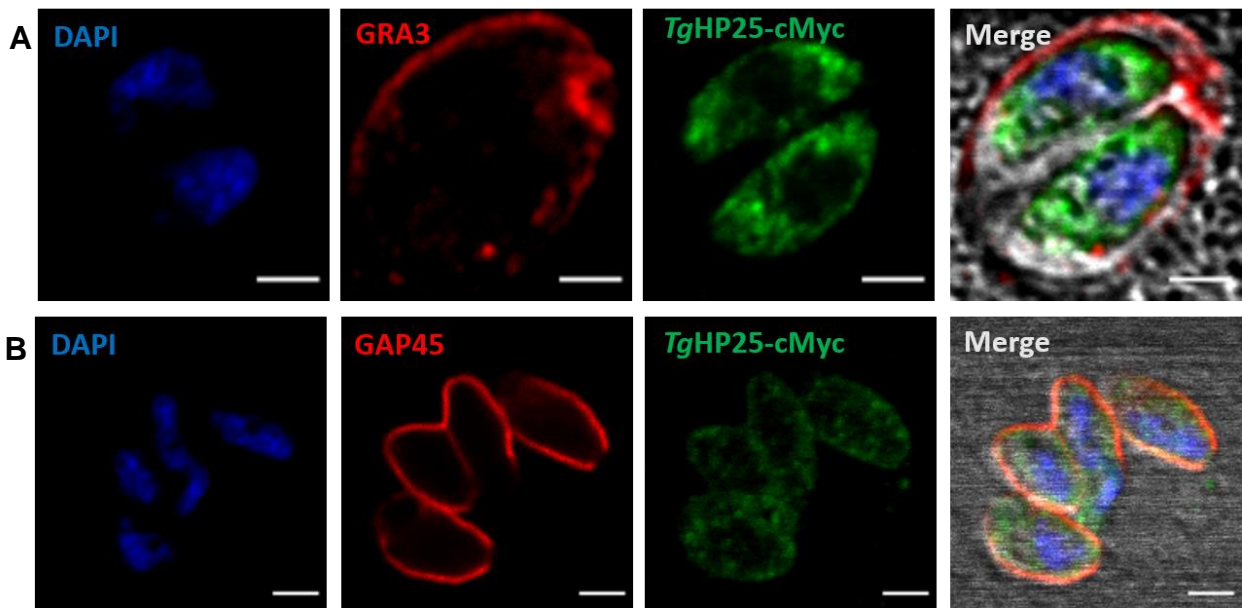


Figure 24: La localisation de *TgHP25* est essentiellement cytoplasmique. (A) et (B) localisation de *TgHP25* (vert) avec GRA3 marqueur de la vacuole parasitophore et GAP45 marqueur de l'IMC (rouge). En bleu les noyaux parasite. Merge : superposition des canaux. Barre d'échelle 2 μ m.

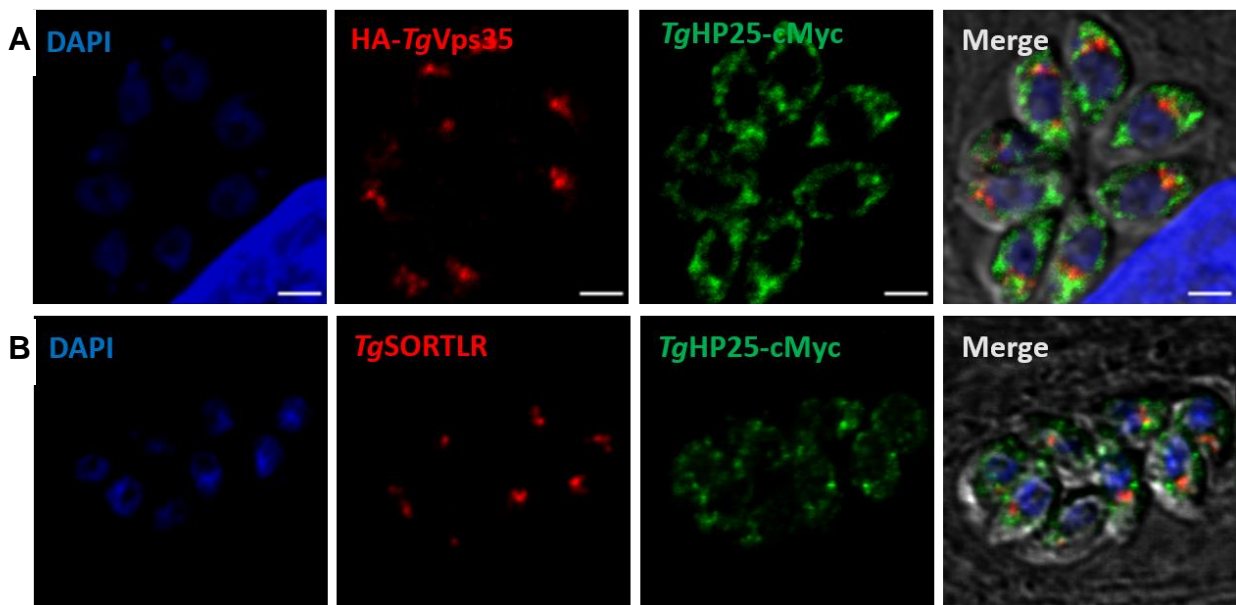


Figure 25 : Une partie de la protéine *TgHP25* présente une localisation au-dessus des compartiments *TgVps35* et TGN. (A) et (B) Localisation de *TgHP25*-cMyc (vert) par rapport à HA-*TgVps35* et *TgSORTLR* (rouge). En bleu les noyaux parasite. Merge : superposition des canaux. Barre d'échelle 2 μ m.

Nous avons ensuite vérifié la localisation de la protéine par rapport aux différents marqueurs de l'ELC. Plusieurs vésicules de *TgHP25* co-localisent nettement avec le CPL (Figure 26 A), de même qu'avec le marqueur des pré-rhoptries proROP4 (Figure 26 C). Nous observons aussi une forte co-localisation avec le marqueur proM2AP (Figure 26 B). Enfin, nous avons étudié au niveau apical la localisation de la protéine par rapport aux organites sécrétoires. Bien que la localisation de *TgHP25* soit très proche de MIC2 il y'a très peu de co-localisation avec les micronèmes (Figure 27 A). Cependant, avec les rhoptries nous remarquons de nombreux points de co-localisation avec la protéine ROP1 (Figure 27 B). L'ensemble de ces résultats indiquent que *TgHP25* est présente dans l'ELC avec des vésicules très proches de proM2AP et pré-rhoptries, au-dessus du compartiment *TgVps35*. Aussi nous avons une co-localisation partielle au pôle apical avec les rhoptries. La localisation de *TgHP25* dans cette région supérieure de l'ELC, avec les protéines immatures présentes dans les pré-organites, suggère un rôle dans le trafic vésiculaire entre ce compartiment et les organites apicaux matures.

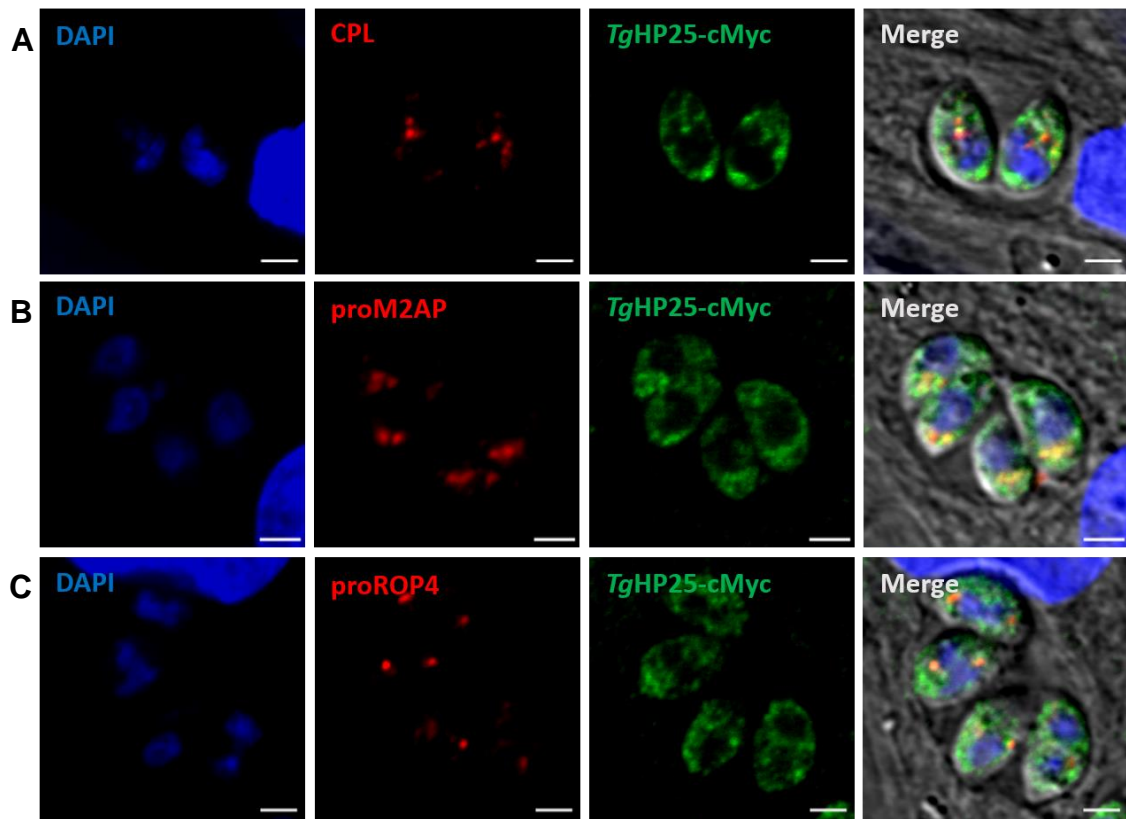


Figure 26 : La protéine *TgHP25* co-localise avec les marqueurs endo-lysosomaux. (A), (B) et (C) Co-localisation de *TgHP25* (vert) avec CPL, proM2AP et proROP4 (rouge). En bleu les noyaux parasite. Merge : superposition des canaux. Barre d'échelle 2 μ m.

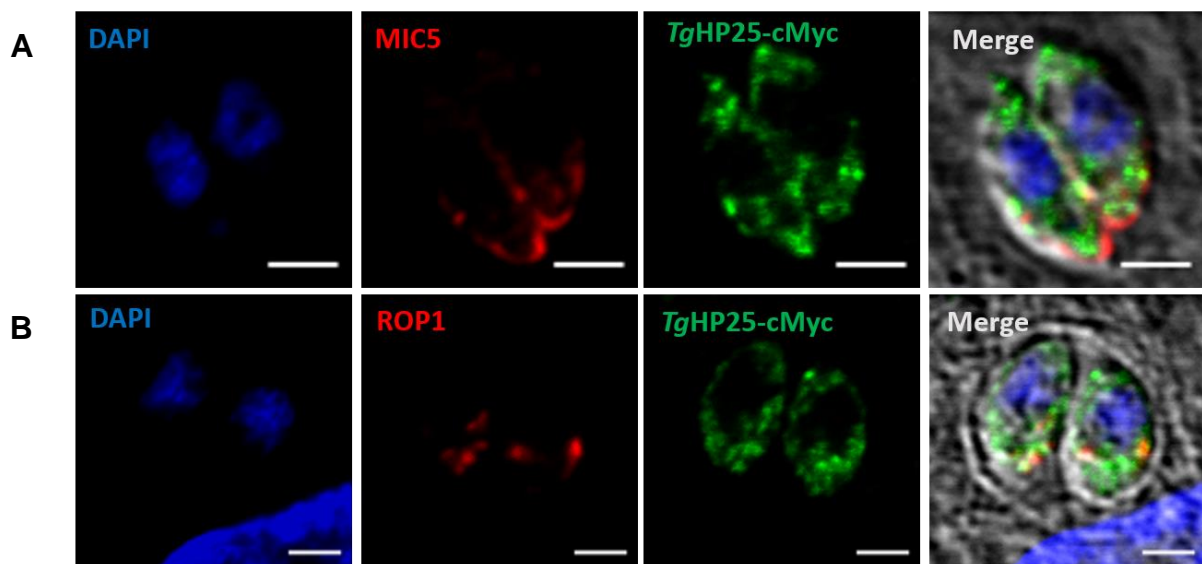


Figure 27 : La localisation de *TgHP25* par rapport aux organites de secretion. (A) et (B) co-localisation de *TgHP25* (vert) avec MIC5 et ROP1 (rouge). En bleu les noyaux parasite. Merge : superposition des canaux. Barre d'échelle 2 μ m.

b. Caractérisation biochimique du domaine BAR de *TgHP25*

Afin de caractériser les fonctions biochimiques des domaines BAR et SBF2 de *TgHP25*, nous avons synthétisé les 3000pb du cDNA de la protéine (Voir séquence matériels et méthodes). A partir du cDNA nous avons cloné les inserts suivants dans le plasmide pGEX-6P3 : *TgHP25*, HA-BAR domaine et His-SBF2 domaine. Les protéines recombinantes ont été exprimées et purifiées (Figure 29 A et B).

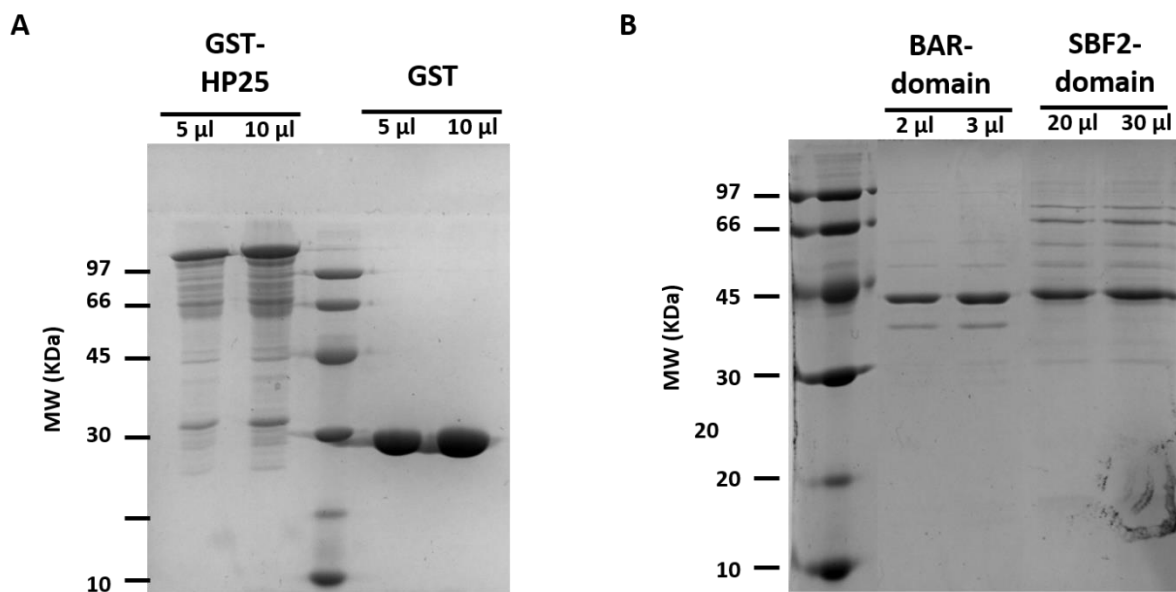


Figure 28 : Purification des protéines recombinantes GST-*TgHP25*, GST, GST-HA-BAR et GST-His-SBF2. (A) 5µl et 10µl de GST-*TgHP25* et GST (B) 2µl et 3µl de GST-BAR et 20µl et 30µl de GST-SBF2 ont été déposés sur un gel SDS-PAGE, et la quantification du signal avec le logiciel Image Lab (Bio-Rad). Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie. Nous observons les protéines GST-*TgHP25* (135 kDa), GST (25 kDa), GST-BAR (45 kDa), GST-SBF2 (45 kDa).

Nous avons vérifié si la protéine *TgHP25* avait la capacité de fixer les lipides des membranes grâce à son domaine BAR. Pour réaliser cette expérience nous avons effectué une expérience de « Lipid overlay » avec différents phospholipides qui sont connus pour leur présence dans les membranes biologiques. Nous avons utilisé les protéines recombinantes GST-*TgHP25* ; GST-HA-BAR domaine, GST-His-SBF2 domaine mais aussi la GST comme contrôle négatif pour cette étude. L'immuno-marquage avec les anticorps α GST lapin (GST-*TgHP25* et GST), α HA rat (GST-HA-BAR domaine), α His souris (GST-His-SBF2 domaine) démontre que la protéine recombinante GST-*TgHP25* possède une affinité pour les lipides phosphorylés par rapport aux lipides non-phosphorylés (Figure 30, première membrane à partir de la gauche), de même pour GST-BAR domaine (Figure 30, seconde membrane à partir de la gauche). Nous n'avons aucune reconnaissance significative avec les protéines recombinantes GST-His-SBF2 domaine et la GST (Figure 30, troisième et quatrième membranes à partir de la gauche). La protéine recombinante GST-*TgHP25* fixe plus fortement les lipides di phosphorylés (PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂) comparativement aux tri phosphorylés et les mono phosphorylés. Bien que moins forte que pour la protéine entière, ce profil est retrouvé avec GST-HA-BAR domaine avec les lipides PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(4,5)P₂ et PtdIns(3,4,5)P₃. Ces résultats démontrent que la protéine *TgHP25* interagit avec les lipides membranaires phosphorylés, avec une forte affinité pour les PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂, et que le domaine BAR est directement responsable de cette interaction.

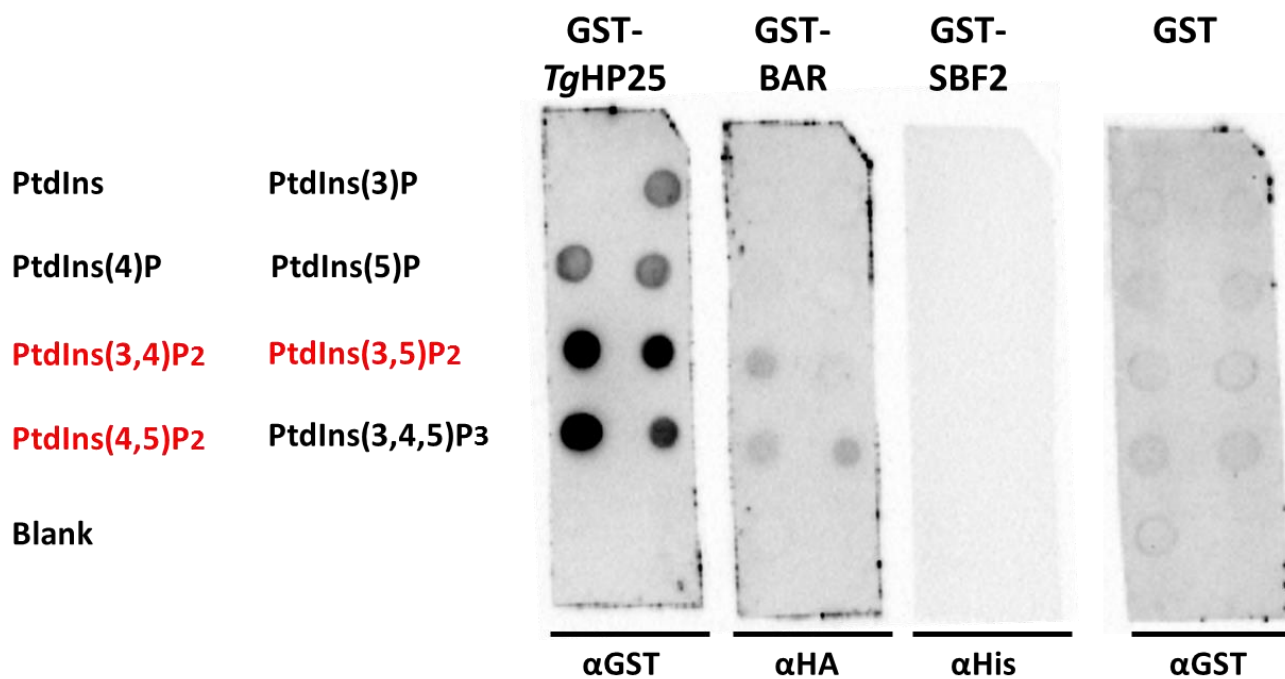


Figure 29 : Tests de « Lipid Overlay » des protéines recombinantes *TgHP25* ; **BAR et **SBF2**.** Les phospholipides PtdIns (phosphatidylinositol) ont été déposés sur des membranes de nitrocellulose, et incubées avec les protéines. La révélation en immuno-marquage a été faite avec les anticorps anti-GST, anti-HA et anti-His.

c. Rôle fonctionnel de la protéine *TgHP25*

Afin de déterminer le rôle fonctionnel de la protéine *TgHP25*, nous avons décidé de générer un parasite de déplétion conditionnelle du gène *TgHP25* avec le système ATc. Après plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à obtenir le mutant. Avec la collaboration du laboratoire du Dr Mohamed Ali Hakimi (Grenoble) nous avons obtenu un plasmide CRISPR/CAS9 (Article Figure S2) contenant une séquence ADN spécifique du gène *TgHP25* flanqué du site de restriction d'une endonucléase CAS9 avec une étiquette GFP. Le plasmide s'intègre dans le génome grâce à la séquence spécifique d'ADN, l'expression de la GFP indique le clivage du gène par la CAS9 avec un processus de réparation de l'ADN. Cette réparation peut conduire à plusieurs mutations ou l'introduction d'un codon stop conduisant à l'inactivation du gène. Après transfection des parasites RH sauvages, avec ce plasmide, nous avons vérifié la localisation des protéines de micronèmes, rhoptries et granules denses dans des parasites exprimant la GFP. Nous n'avons pas observé d'effets sur la localisation des protéines de micronèmes et de granules denses. Cependant, les protéines de rhoptries semblent être affectées notamment RON4 (Figure 31 B), ceci est moins bien évident pour ROP1 (Figure 31 D).

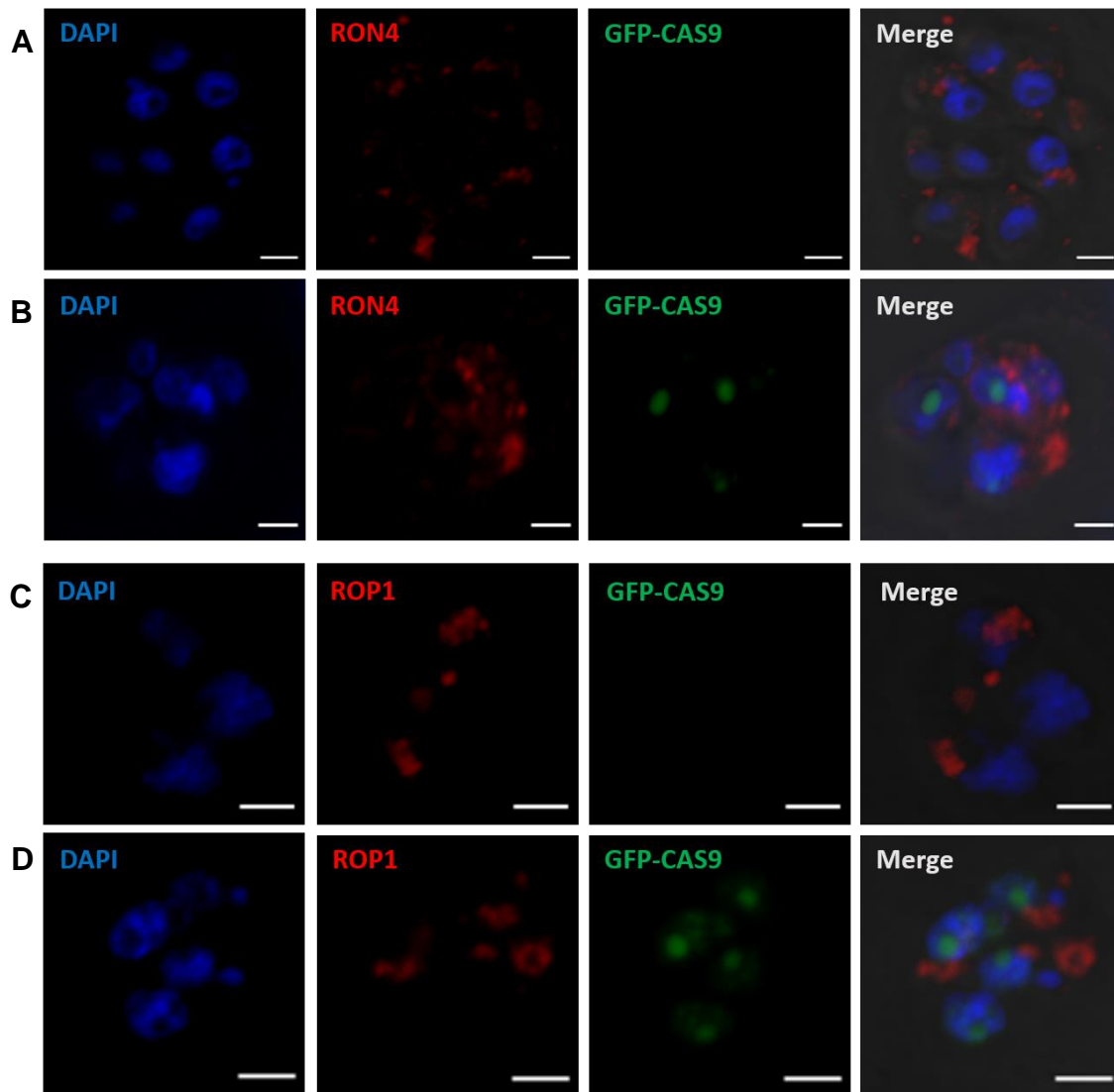


Figure 30 : La strategie CRISPR/CAS9 sur le gène *TgHP25*. En bleu les noyaux parasitaires. En vert l'expression de la CAS9 dans le noyau. En rouge proteines de rhoptries (A et B) RON4, (C et D) ROP1. Merge: surperposition des canaux. Barre d'échelle 2 μ m.

d. Production d'anticorps anti-*TgHP25*

Pour mieux caractériser la protéine *TgHP25*, nous avons produit des anticorps polyclonaux spécifiques anti-*TgHP25* chez la souris en utilisant les protéines recombinantes contenant les domaines GST-BAR et GST-SBF2, respectivement. Les protéines recombinantes ont été produites, purifiées, clivées et injectées aux souris pour la production d'anticorps. La protéine recombinante domaine BAR, les sérums (dilution 1/200 et 1/1000) en immuno-marquage, trois souris donnent une bande à 107 kDa correspondante à la taille escomptée de la protéine native *TgHP25* chez le parasite. Pour le domaine SBF2 spécifique *T. gondii*, les sérums à 1/200, de deux souris donnent une réponse faible mais spécifique, le troisième une bande légèrement supérieure à 107KDa et pas de réponse pour la quatrième souris. Ces anticorps pourront être utilisés en microscopie de fluorescence pour confirmer que le phénotype observé dans le CRISPR/CAS9 est bien due à la disparition de la protéine *TgHP25*. Aussi en microscopie électronique afin de déterminer le type de vésicules sur les quelles la protéine est localisée.

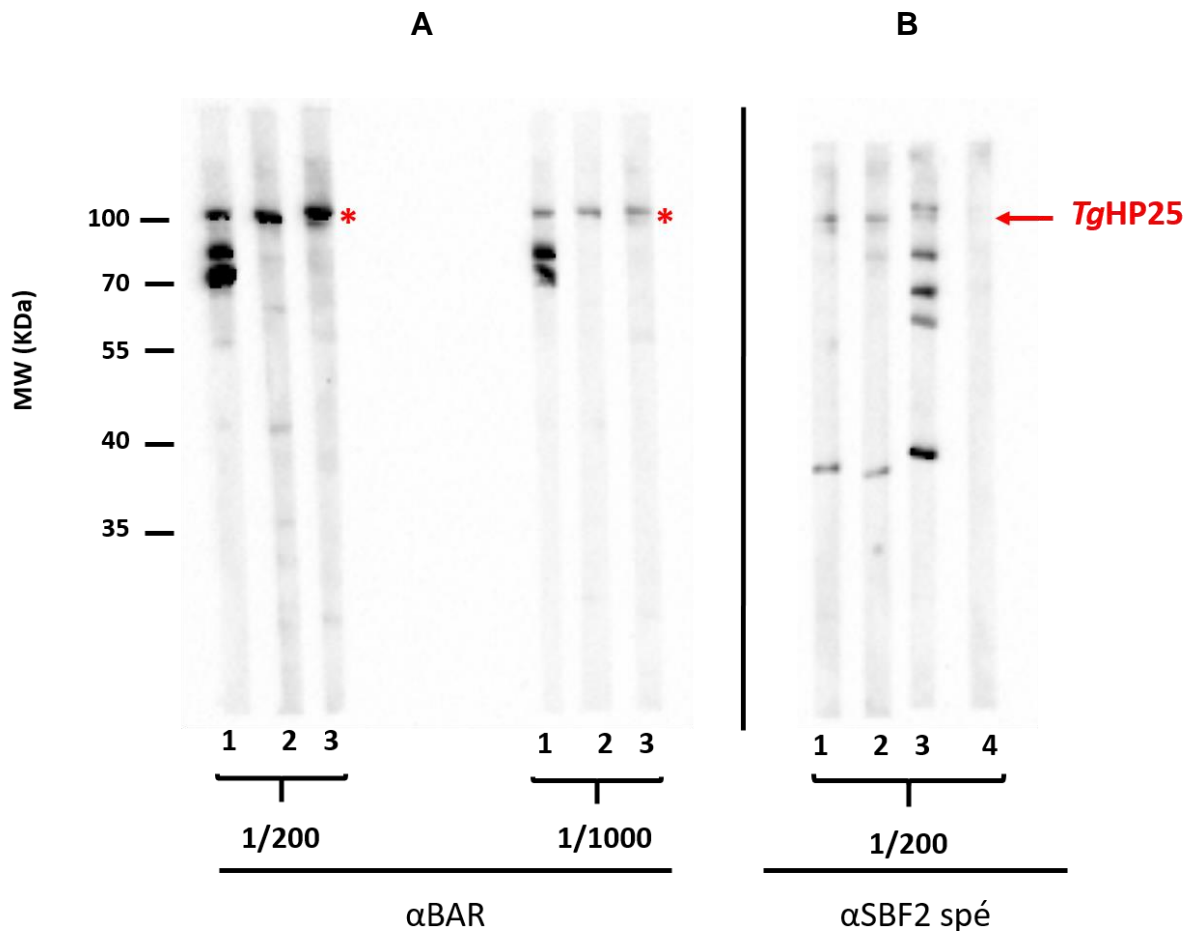


Figure 31 : Tests en immuno-marquage des sérums de souris pour les protéines recombinantes BAR et SBF2 spécifique. (A) Les sérums de trois souris (préalablement immunisées avec la protéine recombinante du domaine BAR) au 1/200 et 1/1000 ont été testés indépendamment sur un lysa parasite. Une bande correspondante à la protéine *TgHP25* (107kDa) en asterix rouge, est détectée en immuno-marquage pour les souris 2 et 3. La souris 1 présente aussi cette bande, en plus deux autres bandes non spécifiques. (B) Quatre souris ont été immunisées avec le domaine SBF2 spécifique aux Apicomplexes. Les sérums ont été testés au 1/200. Les souris 1, 2, 3 donnent une bande correspondante à la protéine *TgHP25* et des bandes non spécifiques. La souris 4 ne donne aucune bande.

Discussion et conclusion

Dans cette première partie de la discussion nous aborderons la caractérisation fonctionnelle du complexe CRC chez *T. gondii*. Au cours de ce travail nous avons démontré que le CRC est composé des trois protéines *TgVps26*, *TgVps29* et *TgVps35* comme chez les mammifères et *S.cerevisiae*. Nos travaux sur la stœchiométrie indiquent que *TgVp29* pourrai être l'élément régulateur de la formation du complexe. Car en effet ces données nous indiquent que la protéine *TgVps29* se trouve sous deux formes : une forme complexée à *TgVps35* et *TgVps26* ; et une forme libre non complexée. Nos résultats sont en accord avec la structure de cette protéine connue chez les mammifères. En effet *Vps29* est une métallophosphoesterase sans activité catalytique (Hierro et al., 2007), capable d'interagir avec les ions divalents. Il a été montré que la région d'affinité avec les ions est celle régulant l'interaction avec *Vps35* (Hierro et al., 2007). Il semble que chez les Apicomplexes la régulation de la formation de ce complexe soit conservée.

Ce travail nous a ensuite amené à générer un réseau d'interactions ou « interactome » du CRC sur la base d'expériences biologiques *in vitro*. Cet outil nous a permis de voir que le CRC interagit avec plusieurs acteurs du trafic vésiculaire connus comme les protéines GTPase Rab5B homologue d'ARA6 chez les plantes dans le recyclage entre les endosomes et la membrane plasmique (Ebine et al., 2011) ; (Ebine et al., 2012), Rab11B montré comme impliqué dans le recyclage et la maturation du complexe membranaire interne ou IMC (Agop-Nersesian et al., 2010). Aucune interaction n'a été montrée entre le Rétromère et ces deux protéines Rabs jusqu'à présent chez *T. gondii*. Par contre chez les mammifères, l'interaction entre le Rétromère et Rab7 a été clairement démontrée, et est essentielle au recrutement du complexe sur les membranes (Liu et al., 2012) ; (Priya et al., 2015). Toutefois, Rab7 n'a pas été identifié dans l'interactome, au contraire une protéine homologue TBC1D5 connue pour réguler l'activité GTPase de Rab7 a été découverte. Nous avons conclu que la présence de ce régulateur TBC1D5 suggère donc que l'interaction entre le Rétromère et Rab7 serait dépendante de son état GTP ou GDP. Notre expérience de « GST pull down » confirme cette hypothèse en montrant que seulement *TgVps26* fixe uniquement Rab7 dans son état GTP (Voir Article Figure S1) comme chez *Entamoeba histolytica* (Dacks et al., 2003), ce qui est contraire pour les mammifères et *S. cerevisiae* où *Vps35* interagit avec Rab7. Cependant, nous observons une interaction avec Rab11B et Rab5B indépendamment de l'état GTP ou GDP. Ces résultats

suggèrent donc que le Rétromère pourrait être recruté dans différentes voies de trafics régulées par les protéines Rabs, dont une serait dépendante de l'état GTP, GDP de Rab7. Le rôle important des protéines Rab5A et Rab5C dans la spécificité des voies de trafics au niveau des endosomes a déjà été clairement démontré chez *T. gondii* (Kremer et al., 2013). Au cours de ce travail, il semble que Rab7 n'est pas essentiel à la biogenèse d'organites apicaux du parasite. Ceci soulève la question de savoir si la synergie protéine Rab7/complexe Rétromère est essentielle à la voie de biogenèse des organites apicaux? Chez l'*Homme*, la diversité des cargos et des voies de trafics du Rétromère est dépendante des SNX (Cullen and Korswagen, 2012), or notre interactome ne présente aucune protéines de ce type. Cela n'exclut pas que d'autres protéines parasitaires pourraient jouer ce rôle chez *T. gondii*.

Le CRC est connu pour reconnaître directement le cargo par l'intermédiaire de Vps35 et vps26, c'est le cas avec *TgVps35* et *TgVps26* qui interagissent toutes deux avec le transporteur des protéines de rhoptries et micronèmes, *TgSORTLR* comme nous avons montré par IP au cours de cette étude (Sloves et al., 2012). L'homologue de cette protéine chez l'*Homme* est bien connu pour être un cargo du complexe Rétromère (Harbour et al., 2010); (Lane et al., 2010). La particularité de notre interactome (Voir Article Figure 1D), est la présence de plusieurs protéines hypothétiques HP ne présentant aucune homologie avec des protéines déjà connues comme partenaires du Rétromère. Ces protéines HP pourraient avoir les fonctions des protéines accessoires comme le complexe WASH qui est essentiel à la scission de vésicules de recyclage (Gomez and Billadeau, 2009) ; (Derivery et al., 2009) ou des cargos spécifiques aux voies de trafics vésiculaires chez *T.gondii* .

La localisation des trois composants du CRC (Article Figure 1E) correspond bien aux protéines partenaires identifiées dans l'interactome. Le CRC co-localise avec la *TgSORTLR* marqueur du TGN et des endosomes, mais aussi avec les principaux marqueurs du Endosomal-Like Compartment ELC ; proM2AP et le CPL. Cela souligne donc la position de ce complexe dans le compartiment régulant le transport des facteurs de virulence du parasite vers leurs organites respectifs. Vu les particularités du complexe Rétromère de *T. gondii*, le CRC est-il fonctionnel et cette fonction est-elle essentiel à la biogenèse des organites apicaux ?

Nous avons généré un parasite KO inductible pour la protéine *TgVps35* (Article Figure 2) afin de démontrer les fonctions précises du Rétromère chez le parasite. Cette

protéine est connue pour être le « core » du CRC sur laquelle les deux autres composants se fixent. Les études phénotypiques *in vitro* montrent que la protéine *TgVps35* est essentielle au cycle lytique d'invasion et de re-invasion de la cellule hôte (Article Figure 2). Les mutants en absence de *TgVps35* sont incapables d'induire la maladie et de tuer les souris comparativement aux parasites sauvages. De plus, ces mutants de *TgVps35* ne confèrent pas une immunité aux souris lors d'une seconde infection. Nous avons déjà observé des phénotypes similaires avec le mutant *TgSORTLR* (Sloves et al., 2015); (Sloves et al., 2012). Dans ce travail, il a été démontré que la présence des protéines de rhoptries et de micronèmes n'est pas suffisante pour induire une protection, mais il faut surtout la présence d'organites fonctionnels garantissant l'intégrité du système de sécrétion, et la présence de protéines matures, et bien conformées (Sloves et al., 2015). La microscopie électronique nous confirme bien cela car dans le mutant *TgVps35* les parasites sont dépourvues de tous les organites de sécrétions tels que les micronèmes, rhoptries et même de granules denses. L'absence de ce dernier organite est une particularité du mutant *TgVps35*; longtemps la biogenèse des granules denses est associée à la voie d'exocytose constitutive connue chez les mammifères. Notre travail indique que la biogenèse de cet organite est elle aussi dépendante du compartiment ELC comme pour les micronèmes et rhoptries ; et que le transport des protéines pourrait être assuré par un cargo spécifique. De plus nous avons remarqué que l'architecture de la membrane plasmique du parasite mutant était complètement désorganisée et détachée de l'IMC, qui semble ne pas être affecté. Cette observation pour la membrane plasmique peut être un effet direct ou indirect à l'absence de *TgVps35*. Bien que Rab11B soit présente dans notre interactome, il apparaît que les fonctions du Rétromère ne soient pas essentielles à la maturation de l'IMC.

En l'absence des organites apicaux, l'ensemble des protéines de rhoptries, micronèmes et de granules denses sont complètement délocalisées (Article Figure 4A), et la maturation des protéines de micronèmes et de rhoptries est affectée. Il est connu que la maturation protéolytiques des protéines de rhoptries et de micronèmes s'opère dans le compartiment ELC, avec la présence de différentes protéases appelées cathepsines. Ce résultat indique alors qu'en absence de *TgVps35*, les protéines de rhoptries et de micronèmes sont délocalisées dès le compartiment TGN d'où ils sont normalement pris en charge par la *TgSORTLR* (Sloves et al., 2012). Il est important de signaler que les deux populations de micronèmes sont affectées, ce qui

va dans le sens du rôle importants des protéines Rabs dans le tri protéique au niveau de l'ELC. Nous avons fait toutes ces observations, sachant que la *TgSORTLR* est toujours présente, même en absence de *TgVps35*. La protéine n'est donc pas déroutée vers la voie de dégradation. L'utilisation de microscopie à fluorescence de haute résolution (SIM), nous a permis de démontrer qu'en absence de *TgVps35*, la *TgSORTLR* est bloquée dans les compartiments Rab5A et particulièrement Rab7. En conclusion, nous proposons un modèle (Article Figure 5G) selon lequel, l'une des fonctions du CRC est le recyclage du transporteur *TgSORTLR*, du compartiment endosomale vers le compartiment TGN. Ce recyclage est essentiel à la fonction de transport de la *TgSORTLR* et à la biogenèse des organites de sécrétions rhoptries et micronèmes. Ce travail démontre bien chez les Apicomplexes, la conservation d'un système de recyclage protéique essentiel à la biogenèse d'organites spécifiques.

Un seul transporteur transmembranaire de type 1 est connu dans le génome de *T. gondii*, nous nous sommes demandé si le système de recyclage ne prendrait pas en charge d'autres transporteurs encore non identifiés. Le mutant *TgVps35* montre une altération de la voie de trafic de granules denses. Cela laisse supposer qu'il existe un transporteur des granules denses et qu'il serait recyclé comme la *TgSORTLR* par le Rétromère. La première fonction connue pour les protéines de granules denses est la maturation de la VP, avec la mise en place du réseau sous-vacuolaire, le passage de molécules entre la cellule et le parasite (Persat et al., 2012) ; (Cesbron-Delauw et al., 2008) ; (Gold et al., 2015). Récemment, plusieurs travaux démontrent aussi l'implication des protéines de granules dense dans la modulation des voies de signalisation de la cellule hôte (Rosowski et al., 2011). Chez *P. falciparum*, la plupart de ces protéines de granules denses présentent un motif PEXEL en position N-terminale nécessaire à leur exportation dans le cytoplasme de la cellule hôte. La question se pose de savoir si pour les granules denses nous avons plusieurs populations et peut être aussi plusieurs voies de trafics distinctes (Mercier and Cesbron-Delauw, 2015).

La Figure 6A de l'Article nous démontre que la bonne localisation de *TgVps35* n'est pas totalement dépendante de la présence de *TgSORTLR*. Cela suggère que dans le compartiment ELC le Rétromère prend en charge d'autres cargos permettant son maintien au niveau des membranes endosomales. Pour explorer cette question, nous avons analysé en bio-informatique les protéines HP identifiées dans notre interactome. Cette analyse nous a permis de considérer *TgHP12* une protéine transmembranaire

de type 1. Cette protéine présente en position C-terminale un domaine d'interaction coiled-coil. En revanche la localisation TGN avec une forte co-localisation avec la *TgSORTLR* et *TgVps35* nous indique cette protéine pourrait être un autre candidat cargo. La protéine *TgHP12*, ne co-localise avec aucun marqueur de la voie de trafic des rhoptries et micronèmes, bien que tous les composants du CRC interagissent avec *TgHP12*. La déplétion du gène *TgHP12* n'affecte pas la biogenèse des organites apicaux. De ces résultats, *TgHP12* pourrait être un transporteur ou une protéine accessoire du CRC dont la fonction serait indépendante de la biogenèse des organites apicaux. Nos analyses bio-informatiques indiquent la présence de faibles homologies de séquences du domaine coiled-coil avec la rabenosyne-5 un effecteur soluble des protéines rabs (Eathiraj et al., 2005) et une syntaxin impliquée dans la fusion des membranes. Pour la fonction rabenosyne-5 les tests *in vitro* avec certaines Rabs (*Rab5B*, *Rab7* et *Rab11B*) n'ont pas été concluants et de plus nous n'avons pas identifié de Rabs dans les IPs de *TgHP12* (voir article Figure 6 Tableau 2). Nous envisageons une fonction syntaxin, permettant la fusion de vésicules de recyclage au niveau du TGN. L'analyse des partenaires HP identifiés en spectrométrie de masse nous permettra peut-être d'identifier le partenaire syntaxin de *TgHP12*.

Nos analyses bio-informatiques nous ont permis aussi d'identifier *TgHP03*, une protéine à 12 domaines transmembranaires appartenant à la famille des MSF (major facilitator superfamily) (Article Figure 7A). Les MSF facilitent le mouvement de petites molécules telles que les oligosaccharides, des ions et drogues, à travers la membrane plasmique (Law et al., 2008). Dans le mutant *TgVps35* sans ATc, nous avons validé la localisation membranaire de *TgHP03*-cMyc avec un marquage sans perméabilisation, de plus nous savons que les extrémités N-terminale et C-terminale sont à l'extérieure du cytoplasme du parasite. Cette topologie est atypique dans la famille de MSF, ces protéines ont en général les extrémités dans le cytosol de la cellule. Cette information remet en question l'appartenance de *TgHP03* à la famille des MSF, et suppose un nouveau type de transporteur membranaire chez *T. gondii*. Nous avons constaté qu'en absence de *TgVps35*, *TgHP03* perd sa localisation membranaire et devient plus vésiculaire dans le cytosol. Nous avons vérifié si cette observation est identique pour les protéines de surface SAG. Il n'y a aucune perturbation pour les protéines SAG, indiquant que les perturbations observées sont restreintes aux protéines transmembranaires telles que *TgHP03*. Ces observations établissent aussi

pour la première fois chez *T. gondii*, un lien direct ou indirect entre une protéine transmembranaire et le complexe Rétromère localisé dans l'ELC.

Cette observation amène plusieurs questions par rapport à l'existence d'un mécanisme d'endocytose, et la présence de système de dégradation lysosomale chez le parasite. Le mécanisme d'endocytose classique dépendant de la clathrine n'a pas encore été montré chez *T. gondii*. Et si ce mécanisme existe il pourrait être clathrine indépendant, au vu de l'absence de manteau de clathrine à la membrane plasmique du parasite. Une étude récente montre que le parasite est capable d'ingérer et de dégrader une protéine cytosolique de la cellule hôte. Le mécanisme de dégradation s'opère au niveau de l'ELC et est dépendante de la protéase cathepsine L (Dou et al., 2014). Toutefois, le mécanisme d'entrée des protéines à l'intérieur du parasite n'est pas élucidé, et serait probablement indépendante de la clathrine et des protéines accessoires. De plus nous ne savons pas si ce phénomène nécessite un recyclage de cargo, des endosomes vers la membrane plasmique. Chez les mammifères le mécanisme de recyclage par le Rétromère est indépendant de la clathrine et des adaptateurs (McGough and Cullen, 2013). Le KO d'un composant du CRC comme Vps29 chez la souris, montre une accumulation et une dégradation du transporteur plasmidique GLUT1 dans le compartiment lysosomale. Chez *T. gondii*, nous n'observons aucune dégradation de la protéine TgHP03 en absence de TgVps35. Notre étude suggère donc l'absence d'un système de dégradation de type lysosomale chez *T. gondii*, ce qui n'est pas très surprenant puisque des lysosomes classiquement présents chez les mammifères n'existent pas, même si un organite de dégradation VP1 a été récemment découvert (Miranda et al., 2010) ; (Francia et al., 2011).

En conclusion cette première partie du travail de thèse montre que le CRC est bien conservé chez *T. gondii* et suggère une régulation de l'activité du complexe par une forme complexée et décomplexée de TgVps29 dans le compartiment ELC du parasite. Il souligne la présence de protéines Rabs parmi ses partenaires pouvant réguler sa spécificité aux membranes vésiculaires. Il démontre le rôle essentiel du recyclage protéique dans la biogenèse des organites apicaux. Il met en lumière la présence de protéines parasite-spécifiques partenaires du Rétromère. Enfin l'existence d'un système de recyclage Rétromère dépendant entre l'ELC et la membrane plasmique. Ce dernier point est d'une grande importance car il peut être un outil pour étudier l'existence d'un système d'endocytose non dépendante de la clathrine chez *T. gondii*.

Dans la deuxième partie du travail, nous discuterons de la caractérisation fonctionnelle de la protéine chimérique *TgHP25*. Nous avons identifié cette protéine dans des conditions particulières de l'IP *TgVps35* en absence de la *TgSORTLR*. Ceci dans le but d'identifier de nouvelles voies de trafics différentes. Nos analyses bio-informatiques ont découvert la présence de deux domaines protéiques, un premier en position N-terminale appelé BAR et un autre domaine en position C-terminale SBF2. Le premier domaine est très bien connu et caractérisé chez les protéines SNX des mammifères. En plus du domaine BAR en position C-terminale, les SNX possèdent un domaine PX en position N-terminale essentiel pour la reconnaissance des phospholipides membranaires. Le second domaine est moins bien connu, il est retrouvé dans les protéines de la famille des myotubularin-related proteins (MTMRs) et contient essentiellement des phosphatases et des pseudos phosphatases spécifiques aux PI(3)P et PI(3,5)P₂ (Laporte et al., 1996); (Bolino et al., 2000); (Taylor et al., 2000); (Berger et al., 2002); (Kim et al., 2002). Les MTMs ont été identifiés avec leur rôle sur la spécificité de trafic des récepteurs de surface et l'adhésion des protéines sur les endosomes (Kim et al., 2002); (Tsujita et al., 2004); (Silhankova et al., 2010); (Velichkova et al., 2010). La pseudo phosphatase sbf/MTMR13 de la Drosophile est capable de coordonner en même temps le renouvellement du pool de PI(3)P et l'activation de la GTPase Rab21 dans les membranes des endosomes (Jean et al., 2012). Le domaine SBF interagit dynamiquement avec une phosphatase MTM et une phosphatidylinositol 3-kinase de classe II pour renouvellement du pool de PI(3)P des endosomes. Aussi le domaine SBF a la fonction de GEF (guanine exchange factor) en activant la GTPase Rab21 essentielle à sa fixation sur le PI(3)P des membranes (Jean et al., 2012).

Dans un premier temps nous avons déterminé la distribution de *TgHP25* dans le parasite. Nous avons remarqué que la protéine est très diffuse et vésiculaire dans l'ensemble du cytoplasme. Nous avons aussi remarqué qu'au niveau apical, au-dessus du compartiment *TgVps35*, la protéine co-localise avec les marqueurs pro-rhoptries et partiellement avec les organites matures, rhoptries.

Nous avons ensuite caractérisé le domaine BAR de *TgHP25*, par « Lipid Overlay », le résultat nous indique que la protéine *TgHP25* avec son domaine BAR a une forte affinité pour les bi-phospholipides membranaires PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,5)P₂ (Figure 30). Ces deux premiers bi-phospholipides sont très présents au niveau de la membrane plasmique de cellules mammifères ; le PtdIns(3,4)P₂ est plus

connu pour son rôle dans la signalisation cellulaire, sa synthèse au niveau de la membrane plasmique active de nombreuses voies de signalisation; le PtdIns(4,5)P₂ joue un rôle de substrat pour des protéines impliquées dans la signalisation. Pour le troisième phospholipide, le PtdIns(3,5)P₂ régule les mécanismes de fusion et de scission au niveau des membranes endosomales. In vitro le PtdIns(3,5)P₂ régule positivement la scission des « multivacuolar bodies » ou MVB provenant des endosomes précoces, et un rôle négatif sur la fusion des endosomes (Sbrissa et al., 2007); (Ikonomov et al., 2006). De plus, ce lipide est connu pour son rôle dans le rétrograde transport microtubule dépendant des endosomes vers le TGN (Rutherford et al., 2006); (Ikonomov et al., 2009). La composition lipidique exacte des membranes endosomales chez *T. gondii* n'est pas connue. Une étude récente sur le parasite démontre le rôle essentiel de la lipide kinase PIKfyve sur l'homéostasie de l'apicoplaste (Daher et al., 2015) . En effet, cette enzyme est connue pour phosphoryler le PI(3)P en PI(3,5)P₂, ce qui démontre bien la présence de ce lipide dans les membranes et de son rôle dans l'homéostasie du parasite. La présence du MVB chez *P. falciparum* a été mise en évidence grâce à l'accumulation du marqueur Vps4 (membre du complexe ESCORTIII), dans un compartiment contenant aussi du cholestérol, Rab5 et des protéines de rhoptries (Yang et al., 2004). Au niveau des endosomes tardifs, les protéines ESCORT reconnaissent les protéines cargo et sont impliquées dans la formation du MVB, permettant l'acheminement des protéines vers les lysosomes (Henne et al., 2011) ; (Leung et al., 2008). Chez les Apicomplexes, par leur pH acide et la présence de cholestérol, les rhoptries sont associés aux lysosomes et les pré-rhoptries au MVB (Ngô et al., 2004) ; (Ngô et al., 2003). Nos résultats montrent que la protéine TgHP25 co-localise au pôle apical du parasite en même temps avec les pré-rhoptries et les rhoptries matures. Le mécanisme de maturation des pré-rhoptries en rhoptries matures n'est pas connu. Dans notre hypothèse, TgHP25 jouerait un rôle important dans la reconnaissance des membranes pré-rhoptrie. Fonctions qui pourront être essentielles à la maturation des pré-rhoptries en rhoptries matures.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord cherché sans succès à générer un mutant conditionnel ATc. Puis nous avons opté pour la stratégie CRISPR/CAS9. Les résultats préliminaires présentés en Figure 31, ne nous permettent pas d'être précis sur le phénotype observé après transfection des parasites. Cela est dû au faible taux de transfection et à une très grande variété de phénotypes observés. Ceci peut être la résultante des différents types de réparation de l'ADN après clivage du gène par la

CAS9, et donc la présence sous une forme ou autre de la protéine, ou encore son absence totale. Pour pallier à ce problème nous avons produit des anticorps contre la protéine *TgHP25* donc les premiers tests en immuno-marquage sont concluants (Figure 32).

En conclusion, cette seconde partie du travail décrit les particularités structurales d'une protéine parasitaire-spécifique découverte dans des conditions particulières d'IPs de *TgVps35*. Par sa forte présence dans cette IP en absence de la *TgSORTLR* nous avons pensé à une autre voie de trafic différente du transport des protéines rhoptries et micronèmes. Nos prédictions bio-informatique nous ont indiqués la présence simultanée de deux domaines BAR et SBF2, jamais encore observée chez les protéines connues des Eucaryotes. La protéine présente une localisation diffuse et vésiculée dans l'ensemble du cytoplasme, co-localisant avec les pré-organites rhoptries et l'organite mature au niveau apical.

La biochimie nous a confirmé que la protéine *TgHP25* fixe bien les lipides membranaires, grâce à son domaine BAR. Ces lipides sont essentiellement présents à la membrane plasmique et surtout dans le MVB. Ce dernier compartiment correspond aux pro-rhoptries chez les Apicomplexes, et le compartiment de destination est connu pour être les lysosomes ou rhoptries dans notre modèle. Cependant nous n'avons pas encore démontré un impact clair du KO sur la biogenèse de cet organite. L'hypothèse que nous tirons de ce travail est évidente, avec ces domaines *TgHP25* est certainement impliquée dans les mécanismes de maturation des pro-rhoptries en rhoptries matures. La suite de ce travail permettra de donner plus de détails quant à la maturation de cet organite très particulier et des mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

Perspectives

Pour la suite de ce travail de thèse il serait important d'aborder les différentes questions qui se posent à la fin des deux parties du travail.

La régulation et le recrutement du complexe rétromer

- Nous pourrions tout d'abord caractériser l'assemblage du CRC afin de comprendre comment *TgVps29* régule l'activité du complexe. La recherche de modifications post-traductionnelles pourrait être envisagée, car dans ToxoDB, seule la protéine *TgVps35* est retrouvée dans un phospho protéome avec une phosphorylation de serine. L'utilisation du mutant de complémentation avec une protéine résistante ou constamment phosphorylée à cette position peut nous apporter des réponses claires. Aussi il serait important de démontrer *in vitro* l'impact sur la formation du complexe avec la production des protéines recombinantes des trois composants du CRC.
- Il serait pertinent de comprendre comment le Rétromère de *T. gondii* est recruté au niveau des membranes endosomales ? Notre interactome ne nous permet pas de répondre à cette question. Nous pourrions étudier l'ensemble des protéines répertoriées dans la base de données ToxoDB avec la présence putative d'un domaine PX et/ou BAR. La forte affinité de ces protéines avec les lipides et une faible affinité avec le CRC peuvent expliquer pourquoi il est difficile de les identifier par simple IP. En déterminant par simple fluorescence leur localisation par rapport au CRC. La génération de KO nous permettra d'identifier une protéine déterminante pour la localisation du CRC au compartiment ELC. Nous envisageons aussi d'approfondir l'interaction du CRC avec les protéines Rabs afin de savoir si cela est déterminant pour la spécificité de transport des cargos.

L'identification de cargos du complexe Rétromère :

- Etudier la question de la fonction du complexe Rétromère avec le trafic des protéines de granules denses. L'identification d'une autre voie de recyclage entre les endosomes et le TGN, différente de celle de la *TgSORTLR*. Car, en effet les granules denses sont fortement perturbées dans le KO *TgVps35*, cela indique une

relation direct ou indirect avec les fonctions du CRC. Nous avons déjà élaboré une expérience d'IP de *TgVps35* en l'absence de la *TgSORTLR*, afin d'augmenter l'interaction avec d'autres cargos, minoritaire dans les conditions normales.

La question de l'endocytose :

- L'utilisation du mutant *TgVps35* pour démontrer l'existence d'un type d'endocytose non dépendante de la clathrine, grâce aux protéines de la membrane plasmique, présentent dans notre interactome. En effet la présence d'une protéine membranaire de surface dont le substrat est connu pourrait servir à observer un mécanisme d'entrer dans le parasite. Nous pouvons étiqueter la protéine *TgHP03* avec une étiquette fluorescente et observé l'entrée en vidéo microscopie.

Caractérisation de la fonction de *TgHP25*:

- Pour approfondir les fonctions du domaine BAR ; nous pourrions utiliser des membranes artificielles avec les lipides spécifiques de *TgHP25* pour déterminer si le domaine BAR est capable de faire des tubules de membranes. La protéine pourra être par exemple couplée avec une molécule fluorescente, pour observer des formations de tubules en microscopie. Ceci apportera une réponse essentielle à sa fonction avec les lipides et dans la maturation d'organites. Nous pouvons aussi vérifier chez le parasite l'interaction de *TgHP25* avec le $PI(3,5)P_2$. En utilisant des inhibiteurs spécifiques de la synthèse de ce lipide.
- Nous allons rechercher les partenaires protéiques de *TgHP25* en spectrométrie de masse. Ceci nous permettra de confirmer la fonction putative GEF en identifiant des partenaires Rabs.
- Grâce aux anticorps anti-*TgHP25* nous pouvons utiliser la microscopie électronique pour déterminer avec précision la localisation apicale de *TgHP25* par rapporte aux pré-rhoptries et aux organites matures. Nous réfléchissons aussi à comment coupler la transfection CRISPR/CAS9 avec une observation des phénotypes en microscopie électronique.

Bibliographie

Fast, NM., Xue, L., Bingham, S. et al. (2002). Re-examining alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. *J. Eukaryot. Microbiol.* *49*, 30-37.

Patterson, D. (1999). The Diversity of Eukaryotes. *Am. Nat.* *154*, S96-S124.

Vaidya, AB. and Mather, MW. (2009). Mitochondrial evolution and functions in malaria parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* *63*, 249-267.

Hoppenrath, M. and Leander, BS. (2009). Molecular phylogeny of Parvilucifera prorocentri (Alveolata, Myzozoa): Insights into perkinsid character evolution. *J. Eukaryot. Microbiol.* *56*, 251-256.

Melo, MB., Jensen, KDC. and Saeij, JPJ. (2011). Toxoplasma gondii effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol.* *27*, 487-495.

Jones, JL., Kruszon-Moran, D. and Wilson, M. (2003). Toxoplasma gondii infection in the United States, 1999-2000. *Emerging Infect. Dis.* *9*, 1371-1374.

McQuillan, GM., Kruszon-Moran, D., Kottiri, BJ. et al. (2004). Racial and ethnic differences in the seroprevalence of 6 infectious diseases in the United States: data from NHANES III, 1988-1994. *Am J Public Health* *94*, 1952-1958.

Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F. et al. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* *353*, 1829-1833.

[Nussenblatt1994] Nussenblatt, RB. and Belfort, RJ. Ocular toxoplasmosis. An old disease revisited. In . 1994.

Butcher, BA., Kim, L., Johnson, PF. et al. (2001). Toxoplasma gondii tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J. Immunol.* *167*, 2193-2201.

Reichmann, G., Długońska, H., Hiszczyńska-Sawicka, E. et al. (2001). Tachyzoite-specific isoform of Toxoplasma gondii lactate dehydrogenase is the target antigen of a murine CD4(+) T-cell clone. *Microbes Infect.* *3*, 779-787.

Yap, GS. and Sher, A. (1999). Cell-mediated immunity to Toxoplasma gondii: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* *201*, 240-247.

Mordue, DG. and Sibley, LD. (2003). A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 1015-1025.

Robben, PM., LaRegina, M., Kuziel, WA. et al. (2005). Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J. Exp. Med.* *201*, 1761-1769.

Frenkel, JK. and Taylor, DW. (1982). Toxoplasmosis in immunoglobulin M-suppressed mice. *Infect. Immun.* *38*, 360-367.

- Grimwood, J. and Smith, JE. (1992). *Toxoplasma gondii*: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Exp. Parasitol.* 74, 106-111.
- Hauser, WEJ. and Remington, JS. (1981). Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Infect. Immun.* 32, 637-640.
- Couper, KN., Roberts, CW., Brombacher, F. et al. (2005). *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. *Infect. Immun.* 73, 8060-8068.
- Brown, CR. and McLeod, R. (1990). Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 145, 3438-3441.
- Gazzinelli, RT., Hakim, FT., Hieny, S. et al. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 146, 286-292.
- Kodjikian, L., Wallon, M., Fleury, J. et al. (2006). Ocular manifestations in congenital toxoplasmosis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 244, 14-21.
- Tomavo, S., Schwarz, RT. and Dubremetz, JF. (1989). Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4576-4580.
- de Macedo, CS., Shams-Eldin, H., Smith, TK. et al. (2003). Inhibitors of glycosyl-phosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Biochimie* 85, 465-472.
- Mineo, JR. and Kasper, LH. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol.* 79, 11-20.
- Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, MF. et al. (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.
- He, X., Grigg, ME., Boothroyd, JC. et al. (2002). Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nat. Struct. Biol.* 9, 606-611.
- Lekutis, C., Ferguson, DJ., Grigg, ME. et al. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* 31, 1285-1292.
- Manger, ID., Hehl, AB. and Boothroyd, JC. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.* 66, 2237-2244.
- 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.

- Morrisette, NS., Murray, JM. and Roos, DS. (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 1), 35-42.
- Porchet, E. and Torpier, G. (1977). [Freeze fracture study of *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infective stages (author's transl)]. *Z Parasitenkd* 54, 101-124.
- Hu, K. (2008). Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 4, e10.
- Sheffield, HG. and Melton, ML. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 54, 209-226.
- Dobrowolski, JM., Carruthers, VB. and Sibley, LD. (1997). Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 26, 163-173.
- Fréchal, K., Polonais, V., Marq, J. et al. (2010). Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. *Cell Host Microbe* 8, 343-357.
- Ménard, R. (2001). Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell. Microbiol.* 3, 63-73.
- 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.
- Nichols, BA. and Chiappino, ML. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 34, 217-226.
- Cyrklaff, M., Kudryashev, M., Leis, A. et al. (2007). Cryoelectron tomography reveals periodic material at the inner side of subpellicular microtubules in apicomplexan parasites. *J. Exp. Med.* 204, 1281-1287.
- Russell, DG. and Burns, RG. (1984). The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. *J. Cell. Sci.* 65, 193-207.
- Morrisette, NS. and Sibley, LD. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 21-38; table of contents.
- Tran, JQ., de Leon, JC., Li, C. et al. (2010). RNG1 is a late marker of the apical polar ring in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 586-598.
- Carruthers, VB. and Sibley, LD. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 114-123.
- Pelletier, L., Stern, CA., Pypaert, M. et al. (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature* 418, 548-552.
- He, CY., Shaw, MK., Pletcher, CH. et al. (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* 20, 330-339.

- Carruthers, VB., Giddings, OK. and Sibley, LD. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell. Microbiol.* 1, 225-235.
- Soldati, D., Dubremetz, JF. 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.
- Tomley, FM. and Soldati, DS. (2001). Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.* 17, 81-88.
- Bromley, E., Leeds, N., Clark, J. et al. (2003). Defining the protein repertoire of microneme secretory organelles in the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *Proteomics* 3, 1553-1561.
- Carruthers, VB. and Tomley, FM. (2008). Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell. Biochem.* 47, 33-45.
- Kremer, K., Kamin, D., Rittweger, E. et al. (2013). An overexpression screen of *Toxoplasma gondii* Rab-GTPases reveals distinct transport routes to the micronemes. *PLoS Pathog.* 9, e1003213.
- Bradley, PJ., Ward, C., Cheng, SJ. 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.
- Lerliche, MA. and Dubremetz, JF. (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.
- Foussard, F., Lerliche, MA. and Dubremetz, JF. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology* 102 Pt 3, 367-370.
- Bradley, PJ. and Sibley, LD. (2007). Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 582-587.
- Ngô, HM., Yang, M. and Joiner, KA. (2004). Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules?. *Mol. Microbiol.* 52, 1531-1541.
- Mercier, C., Adjogble, KDZ., Däubener, W. et al. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?. *Int. J. Parasitol.* 35, 829-849.
- Persat, F., Mercier, C., Ficheux, D. et al. (2012). A synthetic peptide derived from the parasite *Toxoplasma gondii* triggers human dendritic cells' migration. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1241-1250.
- Cesbron-Delauw, M., Gendrin, C., Travier, L. et al. (2008). Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic* 9, 657-664.
- Gold, DA., Kaplan, AD., Lis, A. et al. (2015). The *Toxoplasma* Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole. *Cell Host Microbe* 17, 642-652.

- Mercier, C. and Cesbron-Delauw, M. (2015). Toxoplasma secretory granules: one population or more?. *Trends Parasitol.* 31, 60-71.
- Hiller, NL., Bhattacharjee, S., van Ooij, C. et al. (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306, 1934-1937.
- Sargeant, T.J., Marti, M., Caler, E. et al. (2006). Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol.* 7, R12.
- Hsiao, CC., Luisa Hiller, N., Haldar, K. et al. (2013). A HT/PEXEL motif in Toxoplasma dense granule proteins is a signal for protein cleavage but not export into the host cell. *Traffic* 14, 519-531.
- Curt-Varesano, A., Braun, L., Ranquet, C. et al. (2015). The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the Toxoplasma GRA16 and GRA24 effectors into host cells. *Cell. Microbiol.* , .
- Barragan, A., Brossier, F. and Sibley, LD. (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.
- Harper, JM., Hoff, EF. and Carruthers, VB. (2004). Multimerization of the Toxoplasma gondii MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 134, 201-212.
- Blumenschein, TMA., Friedrich, N., Childs, RA. et al. (2007). Atomic resolution insight into host cell recognition by Toxoplasma gondii. *EMBO J.* 26, 2808-2820.
- Cérède, O., Dubremetz, JF., So  te, M. et al. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in Toxoplasma gondii virulence. *J. Exp. Med.* 201, 453-463.
- Cérède, O., Dubremetz, JF., Bout, D. et al. (2002). The Toxoplasma gondii protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *EMBO J.* 21, 2526-2536.
- Jewett, T.J. and Sibley, LD. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol. Cell* 11, 885-894.
- Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S. et al. (1999). Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J. Cell Biol.* 147, 937-944.
- Alexander, DL., Mital, J., Ward, GE. et al. (2005). Identification of the moving junction complex of Toxoplasma gondii: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* 1, e17.
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J. et al. (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.
- Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H. et al. (2005). The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during Toxoplasma gondii invasion. *Cell. Microbiol.* 7, 1823-1833.

- Straub, KW., Cheng, SJ., Sohn, CS. et al. (2009). Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. *Cell. Microbiol.* 11, 590-603.
- Magno, RC., Lemgruber, L., Vommaro, RC. et al. (2005). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Tech.* 67, 45-52.
- Fentress, SJ., Behnke, MS., Dunay, IR. et al. (2010). Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe* 8, 484-495.
- Steinfeldt, T., Könen-Waisman, S., Tong, L. et al. (2010). Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol.* 8, e1000576.
- Ong, Y., Reese, ML. and Boothroyd, JC. (2010). *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *J. Biol. Chem.* 285, 28731-28740.
- Yamamoto, M., Standley, DM., Takashima, S. 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.
- Rosowski, EE., Lu, D., Julien, L. et al. (2011). Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J. Exp. Med.* 208, 195-212.
- Lemgruber, L., De Souza, W. and Vommaro, RC. (2008). Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. *Micron* 39, 177-183.
- Dubremetz, JF. and Torpier, G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). *J. Ultrastruct. Res.* 62, 94-109.
- Agop-Nersesian, C., Egarter, S., Langsley, G. et al. (2010). Biogenesis of the inner membrane complex is dependent on vesicular transport by the alveolate specific GTPase Rab11B. *PLoS Pathog.* 6, e1001029.
- Hartmann, J., Hu, K., He, CY. et al. (2006). Golgi and centrosome cycles in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 125-127.
- Nishi, M., Hu, K., Murray, JM. et al. (2008). Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 121, 1559-1568.
- Anderson-White, B., Beck, JR., Chen, C. et al. (2012). Cytoskeleton assembly in *Toxoplasma gondii* cell division. *Int Rev Cell Mol Biol* 298, 1-31.
- Ogino, N. and Yoneda, C. (1966). The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. *Arch. Ophthalmol.* 75, 218-227.

Bannister, LH., Hopkins, JM., Fowler, RE. et al. (2000). Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. *Parasitology* 121 (Pt 3), 273-287.

Shaw, MK., Roos, DS. and Tilney, LG. (1998). Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 117 (Pt 5), 435-443.

Di Cristina, M., Spaccapelo, R., Soldati, D. et al. (2000). Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7332-7341.

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

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T. et al. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895-907.

Hoppe, HC. and Joiner, KA. (2000). Cytoplasmic tail motifs mediate endoplasmic reticulum localization and export of transmembrane reporters in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* 2, 569-578.

Sloves, P., Delhaye, S., Mouveaux, T. 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.

Breinich, MS., Ferguson, DJP., Foth, BJ. et al. (2009). A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. *Curr. Biol.* 19, 277-286.

Liu, SH., Wong, ML., Craik, CS. et al. (1995). Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* 83, 257-267.

Wang, C., Yan, X., Chen, Q. et al. (2013). Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 499-516.

Hirst, J. and Robinson, MS. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1404, 173-193.

Nevin, WD. and Dacks, JB. (2009). Repeated secondary loss of adaptin complex genes in the Apicomplexa. *Parasitol. Int.* 58, 86-94.

Tomavo, S., Slomianny, C., Meissner, M. et al. (2013). Protein trafficking through the endosomal system prepares intracellular parasites for a home invasion. *PLoS Pathog.* 9, e1003629.

Fomovska, A., Wood, RD., Mui, E. et al. (2012). Salicylanilide inhibitors of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Chem.* 55, 8375-8391.

Yang, M., Coppens, I., Wormsley, S. et al. (2004). The *Plasmodium falciparum* Vps4 homolog mediates multivesicular body formation. *J. Cell. Sci.* 117, 3831-3838.

Parussini, F., Coppens, I., Shah, PP. et al. (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.

Miranda, K., Pace, DA., Cintron, R. 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.

Francia, ME., Wicher, S., Pace, DA. et al. (2011). A *Toxoplasma gondii* protein with homology to intracellular type Na^+/H^+ exchangers is important for osmoregulation and invasion. *Exp. Cell Res.* *317*, 1382-1396.

Nickerson, DP., Brett, CL. and Merz, AJ. (2009). Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 543-551.

Peplowska, K., Markgraf, DF., Ostrowicz, CW. et al. (2007). The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endolysosomal biogenesis. *Dev. Cell* *12*, 739-750.

Seals, DF., Eitzen, G., Margolis, N. et al. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 9402-9407.

Ostrowicz, CW., Bröcker, C., Ahnert, F. et al. (2010). Defined subunit arrangement and rab interactions are required for functionality of the HOPS tethering complex. *Traffic* *11*, 1334-1346.

Solinger, JA. and Spang, A. (2013). Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS. *FEBS J.* *280*, 2743-2757.

Morlon-Guyot, J., Pastore, S., Berry, L. et al. (2015). *Toxoplasma gondii* Vps11, a subunit of HOPS and CORVET tethering complexes, is essential for the biogenesis of secretory organelles. *Cell. Microbiol.* *17*, 1157-1178.

Trousdale, C. and Kim, K. (2015). Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *Eur. J. Cell Biol.* , .

Renard, H., Simunovic, M., Lemièrre, J. et al. (2015). Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature* *517*, 493-496.

Johannes, L., Parton, RG., Bassereau, P. et al. (2015). Building endocytic pits without clathrin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 311-321.

Dou, Z., McGovern, OL., Di Cristina, M. et al. (2014). *Toxoplasma gondii* ingests and digests host cytosolic proteins. *MBio* *5*, e01188-14.

Seaman, MN., McCaffery, JM. and Emr, SD. (1998). A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J. Cell Biol.* *142*, 665-681.

Bonifacino, JS. and Hurley, JH. (2008). Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 427-436.

Farias, GG., Gershlick, DC. and Bonifacino, JS. (2014). Going forward with retromer. *Dev. Cell* *29*, 3-4.

Griffin, CT., Trejo, J. and Magnuson, T. (2005). Genetic evidence for a mammalian retromer complex containing sorting nexins 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 15173-15177.

McGough, IJ. and Cullen, PJ. (2011). Recent advances in retromer biology. *Traffic* 12, 963-971.

Shi, H., Rojas, R., Bonifacino, JS. et al. (2006). The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 540-548.

Collins, BM., Norwood, SJ., Kerr, MC. et al. (2008). Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex. *Traffic* 9, 366-379.

Bugarcic, A., Zhe, Y., Kerr, MC. et al. (2011). Vps26A and Vps26B subunits define distinct retromer complexes. *Traffic* 12, 1759-1773.

Kerr, MC., Bennetts, JS., Simpson, F. et al. (2005). A novel mammalian retromer component, Vps26B. *Traffic* 6, 991-1001.

Hierro, A., Rojas, AL., Rojas, R. et al. (2007). Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* 449, 1063-1067.

Collins, BM., Skinner, CF., Watson, PJ. et al. (2005). Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 594-602.

Gokool, S., Tattersall, D., Reddy, JV. et al. (2007). Identification of a conserved motif required for Vps35p/Vps26p interaction and assembly of the retromer complex. *Biochem. J.* 408, 287-295.

Nothwehr, SF., Bruinsma, P. and Strawn, LA. (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.

Nothwehr, SF., Ha, SA. and Bruinsma, P. (2000). Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p. *J. Cell Biol.* 151, 297-310.

Gullapalli, A., Garrett, TA., Paing, MM. et al. (2004). A role for sorting nexin 2 in epidermal growth factor receptor down-regulation: evidence for distinct functions of sorting nexin 1 and 2 in protein trafficking. *Mol. Biol. Cell* 15, 2143-2155.

Seaman, MNJ. and Williams, HP. (2002). Identification of the functional domains of yeast sorting nexins Vps5p and Vps17p. *Mol. Biol. Cell* 13, 2826-2840.

Strochlic, TI., Setty, TG., Sitaram, A. et al. (2007). Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J. Cell Biol.* 177, 115-125.

Song, J., Zhao, KQ., Newman, CLL. et al. (2007). Solution structure of human sorting nexin 22. *Protein Sci.* 16, 807-814.

van Weering, JRT., Sessions, RB., Traer, CJ. et al. (2012). Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. *EMBO J.* 31, 4466-4480.

- Gilooly, DJ., Morrow, IC., Lindsay, M. et al. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 19, 4577-4588.
- Cullen, PJ. (2008). Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 574-582.
- Harbour, ME., Breusegem, SYA., Antrobus, R. et al. (2010). The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J. Cell. Sci.* 123, 3703-3717.
- Liu, T., Gomez, TS., Sackey, BK. et al. (2012). Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol. Biol. Cell* 23, 2505-2515.
- Harrison, MS., Hung, C., Liu, T. et al. (2014). A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 267-272.
- Seaman, MNJ., Harbour, ME., Tattersall, D. et al. (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.
- Gomez, TS. and Billadeau, DD. (2009). A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev. Cell* 17, 699-711.
- Derivery, E., Sousa, C., Gautier, JJ. et al. (2009). The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev. Cell* 17, 712-723.
- Cullen, PJ. and Korswagen, HC. (2012). Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat. Cell Biol.* 14, 29-37.
- Seaman, MN., Marcusson, EG., Cereghino, JL. et al. (1997). Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *J. Cell Biol.* 137, 79-92.
- Lane, RF., Raines, SM., Steele, JW. et al. (2010). Diabetes-associated SorCS1 regulates Alzheimer's amyloid-beta metabolism: evidence for involvement of SorL1 and the retromer complex. *J. Neurosci.* 30, 13110-13115.
- Hesketh, GG., Pérez-Dorado, I., Jackson, LP. et al. (2014). VARP is recruited on to endosomes by direct interaction with retromer, where together they function in export to the cell surface. *Dev. Cell* 29, 591-606.
- Krai, P., Dalal, S. and Klemba, M. (2014). Evidence for a Golgi-to-endosome protein sorting pathway in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 9, e89771.
- Koumandou, VL., Klute, MJ., Herman, EK. et al. (2011). Evolutionary reconstruction of the retromer complex and its function in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell. Sci.* 124, 1496-1509.
- Seaman, MNJ. (2012). The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J. Cell. Sci.* 125, 4693-4702.

Kim, S., Taylor, GS., Torgersen, KM. et al. (2002). Myotubularin and MTMR2, phosphatidylinositol 3-phosphatases mutated in myotubular myopathy and type 4B Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Biol. Chem.* 277, 4526-4531.

Silhankova, M., Port, F., Harterink, M. et al. (2010). Wnt signalling requires MTM-6 and MTM-9 myotubularin lipid-phosphatase function in Wnt-producing cells. *EMBO J.* 29, 4094-4105.

Tsujita, K., Itoh, T., Ijuin, T. et al. (2004). Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction. *J. Biol. Chem.* 279, 13817-13824.

Velichkova, M., Juan, J., Kadandale, P. et al. (2010). Drosophila Mtm and class II PI3K coregulate a PI(3)P pool with cortical and endolysosomal functions. *J. Cell Biol.* 190, 407-425.

Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y. et al. (2011). A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat. Cell Biol.* 13, 853-859.

Ebine, K., Miyakawa, N., Fujimoto, M. et al. (2012). Endosomal trafficking pathway regulated by ARA6, a RAB5 GTPase unique to plants. *Small GTPases* 3, 23-27.

Priya, A., Kalaidzidis, IV., Kalaidzidis, Y. et al. (2015). Molecular insights into Rab7-mediated endosomal recruitment of core retromer: deciphering the role of Vps26 and Vps35. *Traffic* 16, 68-84.

Dacks, JB., Davis, LAM., Sjögren, AM. et al. (2003). Evidence for Golgi bodies in proposed 'Golgi-lacking' lineages. *Proc. Biol. Sci.* 270 *Suppl* 2, S168-71.

Sloves, P., Mouveaux, T., Ait-Yahia, S. et al. (2015). Apical Organelle Secretion by Toxoplasma Controls Innate and Adaptive Immunity and Mediates Long-Term Protection. *J. Infect. Dis.* , .

Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C. et al. (2005). Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* 436, 415-419.

Law, CJ., Maloney, PC. and Wang, D. (2008). Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 289-305.

McGough, IJ. and Cullen, PJ. (2013). Clathrin is not required for SNX-BAR-retromer-mediated carrier formation. *J. Cell. Sci.* 126, 45-52.

Berger, P., Bonneick, S., Willi, S. et al. (2002). Loss of phosphatase activity in myotubularin-related protein 2 is associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1569-1579.

Bolino, A., Muglia, M., Conforti, FL. et al. (2000). Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat. Genet.* 25, 17-19.

Laporte, J., Hu, LJ., Kretz, C. et al. (1996). A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* 13, 175-182.

Taylor, GS., Maehama, T. and Dixon, JE. (2000). Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8910-8915.

Jean, S., Cox, S., Schmidt, EJ. et al. (2012). Sbf/MTMR13 coordinates PI(3)P and Rab21 regulation in endocytic control of cellular remodeling. *Mol. Biol. Cell* 23, 2723-2740.

Ikonomov, OC., Sbrissa, D. and Shisheva, A. (2006). Localized PtdIns 3,5-P₂ synthesis to regulate early endosome dynamics and fusion. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 291, C393-404.

Sbrissa, D., Ikonomov, OC., Fu, Z. et al. (2007). Core protein machinery for mammalian phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate synthesis and turnover that regulates the progression of endosomal transport. Novel Sac phosphatase joins the ArPIKfyve-PIKfyve complex. *J. Biol. Chem.* 282, 23878-23891.

Ikonomov, OC., Fligger, J., Sbrissa, D. et al. (2009). Kinesin adapter JLP links PIKfyve to microtubule-based endosome-to-trans-Golgi network traffic of furin. *J. Biol. Chem.* 284, 3750-3761.

Rutherford, AC., Traer, C., Wassmer, T. et al. (2006). The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *J. Cell. Sci.* 119, 3944-3957.

Daher, W., Morlon-Guyot, J., Sheiner, L. et al. (2015). Lipid kinases are essential for apicoplast homeostasis in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* 17, 559-578.

Henne, WM., Buchkovich, NJ. and Emr, SD. (2011). The ESCRT pathway. *Dev. Cell* 21, 77-91.

Leung, KF., Dacks, JB. and Field, MC. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* 9, 1698-1716.

Ngô, HM., Yang, M., Paprotka, K. et al. (2003). AP-1 in *Toxoplasma gondii* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* 278, 5343-5352.