

N° d'ordre :

*Université des Sciences et Technologies
de Lille Flandres-Artois*

*Thèse de Doctorat
Pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de la vie et de la Santé*

Présentée par
Catherine TOURSEL



*Clonage et expression des gènes codant pour les
protéines mitochondriales cytochrome b et Hsp60
de Toxoplasma gondii*

Soutenue le 1^{er} octobre 1999

Composition du jury :

Président :	Pr. André VERBERT
Rapporteur :	Dr. Ginette JAUREGUIBERRY
Rapporteur :	Dr. Daniel DIVE
Examineur :	Pr. Daniel CAMUS
Examineur :	Pr. Steven BALL
Directeur de thèse :	Dr. Stan TOMAVO

I. N. S. E. R. M. Unité 42
Biologie et Biochimie Parasitaires et Fongiques
Villeneuve d'Ascq

REMERCIEMENTS

A Mrs. les Professeurs Daniel Camus, Jean-Claude Ameisen, et André Verbert,

Je tiens à vous exprimer, Messieurs, ma profonde gratitude pour m'avoir offert la possibilité de travailler au sein de vos laboratoires.

A Mr. le Professeur André Verbert,

C'est un honneur pour moi de vous avoir Monsieur André Verbert comme président du jury.

A Mr. le Professeur Daniel Camus,

Je tiens à vous exprimer, Monsieur Daniel Camus, toute ma reconnaissance de pouvoir vous compter parmi les membres de mon jury.

Au Docteur Stan Tomavo,

Je vous remercie pour votre enthousiasme, votre disponibilité et le partage de vos compétences scientifiques. Je vous remercie également pour vos nombreux conseils et votre encadrement attentif, qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Au Docteur Ginette Jaureguiberry,

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury.

Au Docteur Daniel Dive,

Vous me faites l'honneur de bien vouloir juger ce travail. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Au Professeur Steven Ball,

Je vous suis profondément reconnaissante d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Au Docteur Jean-François Dubremetz,

C'est avec plaisir que vous m'avez initiée aux techniques de fractionnement cellulaire. Veuillez recevoir mes plus vifs remerciements pour vos chaleureux conseils.

Au Docteur Christian Slommiany,

Un grand merci Christian pour ta disponibilité, ta gentillesse, tes encouragements et tes patients conseils. Grâce à ton aide, les analyses phylogéniques et l'informatique en général me paraissent un peu moins barbares.

A Florence Dzierszinski,

Un merci très particulier à toi Florence, pour ton soutien et ton amitié. Merci pour ton aide notamment lors des analyses phylogéniques et surtout pour tous ces échanges au cours des longues journées passées ensemble...

A Annie Bernigaud,

Je te remercie Annie pour ta gentillesse, ton soutien et l'aide technique que tu m'as apportée au cours de ce travail. J'espère que tu conserveras quelques bons souvenirs de la biologie moléculaire...

A Laurence Dufourny,

Je te remercie de ne pas m'avoir fait oublier qu'il y avait une vie en dehors du laboratoire. Ton soutien amical m'a été précieux tout au long de ces années. Merci.

Je voudrais également remercier les membres des ex-unités 415 et 42, pour leur aide et leur sympathie.

PUBLICATIONS

ARTICLES :

1. Dzierszinski, F., Popescu, O., **Toursel, C.**, Slommiany, C., and Tomavo, S. 1999. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes : implications for evolutionary origin of apicomplexans. *J. Biol. Chem.* Sous presse.
2. **Toursel, C.**, Bernigaud, A., Touzel, J. P., Camus, D., and Tomavo, S. 1999. Molecular cloning and expression of mitochondrial cytochrome b in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* Manuscrit en révision.
3. **Toursel, C.**, Camus, D., and Tomavo, S. 1999. Developmentally regulated expression of the mitochondrial chaperone HSP60 in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Soumis pour publication.
4. Ödberg-Ferragut, C., Renault, J. P., Viscogliosi, E., **Toursel, C.**, Briche, I., Engels, A., Lepage, G., Morgenstern-Badarau, I., Camus, D., Tomavo, S. and Dive, D. 1999. Molecular cloning, expression analysis and iron metal cofactor characterisation of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. Soumis pour publication.
5. Reiss, M., Meissner, M., Brecht, S., Ajioka, J., **Toursel, C.**, Tomavo, S., Dubremetz, J. F., and Soldati, D. 1999. Characterisation of a novel family of transmembrane micronemal proteins of *Toxoplasma gondii* containing EGF-like domains. Manuscrit en préparation.

COMMUNICATIONS :

1. **Toursel, C.**, Dubremetz, J. F., and Tomavo, S. Analyse par mutagenèse de la fonction mitochondriale chez *Toxoplasma gondii*. Journée des jeunes chercheurs. Institut Pasteur de Lille. Octobre 1995.
2. **Toursel, C.**, Dubremetz, J. F., and Tomavo, S. Isolation of the mitochondrion from *Toxoplasma gondii*. VII Molecular Parasitology Meeting. Woods Hole, USA. Septembre 1996.

RESUME

La différenciation de *Toxoplasma gondii* en ses formes tachyzoïtes ou bradyzoïtes est un mécanisme clé dans la pathogenèse du parasite. Alors que les fonctions de la mitochondrie sont largement définies dans d'autres organismes, elles sont peu connues chez *T. gondii* et seraient régulées lors de la différenciation. Nous avons choisi d'aborder la fonctionnalité de la mitochondrie chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes par l'étude du gène mitochondrial codant pour le cytochrome b et du gène nucléaire codant pour le chaperon mitochondrial Hsp60. Les ADNc codant pour ces deux protéines ont été clonés et séquencés. Pour la première fois, un ARNm de 1234 pb codé par l'ADNmt de *T. gondii* a été amplifié. Il code pour une protéine de 368 AA, homologue aux cytochromes b. Pour l'Hsp60, deux ARNm de 2430 et 2442 pb ont été isolés. Ils ne divergent que sur leur extrémité 5', sont codés par le même gène nucléaire et résultent d'un épissage alternatif. Un seul de ces messagers présente un cadre ouvert de lecture codant pour une Hsp60 de 575 AA. Elle est localisée dans la mitochondrie de *T. gondii* et possède une préséquence N-terminale capable d'importer, *in vivo*, la protéine exogène CAT dans l'organite parasitaire. L'expression de ces gènes a été analysée dans les deux stades parasitaires. L'amplification de l'ARNm codant pour le cytochrome b chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes a ainsi démontré la transcription de l'ADNmt dans ces deux formes du toxoplasme. Quant à l'Hsp60, par RT-PCR semi-quantitative, une quantité plus abondante des deux types de messagers a été amplifiée chez les bradyzoïtes. En revanche, nous avons démontré que la protéine Hsp60 est exclusivement exprimée dans les formes virulentes tachyzoïtes en dépit de l'abondance des messagers chez les bradyzoïtes. De plus, nous avons confirmé que ce chaperon, absent des bradyzoïtes réapparaît lorsque ces derniers se différencient en tachyzoïtes. L'ensemble de ces résultats suggère une corrélation entre la différenciation de *T. gondii* et la régulation des fonctions mitochondriales qui pourrait impliquer une altération dans le métabolisme des carbohydrates et/ou la production d'énergie.

NOMENCLATURE INTERNATIONALE DES ACIDES AMINES

Acides aminés	Code 3 lettres	Code 1 lettre	Propriétés
Alanine	Ala	A	Non Polaire
Arginine	Arg	R	Basique
Asparagine	Asn	N	Polaire
Acide Aspartique	Asp	D	Acide
Cystéine	Cys	C	Polaire
Glutamine	Gln	Q	Polaire
Acide glutamique	Glu	E	Acide
Glycine	Gly	G	Polaire
Histidine	His	H	Basique
Isoleucine	Ile	I	Hydrophobe fort
Leucine	Leu	L	Hydrophobe fort
Lysine	Lys	K	Basique
Méthionine	Met	M	Hydrophobe faible
Phénylalanine	Phe	F	Hydrophobe fort
Proline	Pro	P	Non Polaire
Sérine	Ser	S	Polaire
Thréonine	Thr	T	Polaire
Tryptophane	Trp	W	Hydrophobe faible
Tyrosine	Tyr	Y	Hydrophobe faible
Valine	Val	V	Hydrophobe fort

ABREVIATIONS ET ANGLICISMES

AA	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	acide désoxyribonucléique génomique
ADNmt	acide désoxyribonucléique mitochondrial
ARN	acide ribonucléique
ARNmt, r, t	acide ribonucléique messenger, ribosomal, et de transfert
ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BET	bromure d'éthidium
CAT	chloramphénicol acétyl transférase
CI50	concentration donnant 50% d'inhibition
Cox 1, Cox3	cytochrome c oxydase, sous unité 1 et 3
CTP	cytidine triphosphate
Cyt b	cytochrome b
Da	dalton
ddNTP	didésoxynucléotides triphosphates
DHFR	dihydrofolate réductase
DL50	dose létale donnant 50% de mortalité
DMEM	« Dulbecco's Modified Eagle's Medium »
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNTP	désoxynucléotides triphosphates
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EMS	« Episomal Maintenance Sequence », séquence de réplication autonome
FAD	flavine-adénine-dinucléotide
GTP	guanosine triphosphate
HXGPRT	hypoxanthine xanthine guanine phosphoribosyl transférase
IFN- γ	interféron gamma
Ig	immunoglobuline
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb	kilobases (=10 ³ pb)
kDa	kilodalton (=10 ³ Da)
LS ARNr	ARN de la grande sous-unité ribosomale
m.	masse
MCS	« multiple cloning site », site multiple de clonage
MPA	acide mycophénolique
NAD	nicotinamide-adénine-dinucléotide
NBT	nitro bleu de tétrazolium
NTPase	nucléoside triphosphate hydrolase
ORF	« Open Reading Frame », cadre ouvert de lecture
pb	paire de bases
PBS	« phosphate buffer saline », solution saline phosphatée
PCR	« polymerase chain reaction », réaction de polymérisation en chaîne
Pi	phosphate inorganique
RACE-PCR	« Rapid Amplification of cDNA Ends », amplification rapide des extrémités de l'ADNc
RT-PCR	« Reverse Transcriptase PCR », PCR après transcription inverse des ARNm en ADNc
SDS	sodium dodécylsulfate
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
SS ARNr	ARN de la petite sous-unité ribosomale
TAE	tris acétate EDTA
TBE	tris borate EDTA
Tris	Tri-hydroxyméthyl aminométhane
TTP	thymine triphosphate
UTR	« Untranslated region », région non codante
Vol.	volume
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Sommaire

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
Chapitre I. Le parasite <i>Toxoplasma gondii</i>	3
I. Historique et classification	3
II. Le cycle parasitaire	3
II. 1. Le cycle sexué	4
II. 2. Le cycle asexué	4
III. La pathogenèse	5
III. 1. La toxoplasmose	5
III. 1. 1 La toxoplasmose congénitale	5
III. 1. 2. La toxoplasmose de l'immunodéprimé	6
III. 2. Immunologie et diagnostic de la toxoplasmose	7
III. 2. 1. Immunologie	7
III. 2. 2. Diagnostic	8
III. 3. Vaccins et traitements	9
III. 3. 1. Vaccins	9
III. 3. 2. Traitements	9
III. 3. 3. La mise au point de nouvelles thérapies	11
IV. La biologie du parasite	14
IV. 1. Ultrastructure du toxoplasme	14
IV. 1. 1. Les organites communs aux eucaryotes	14
IV. 1. 2. Les organites spécifiques	14
IV. 2. Les interactions entre le toxoplasme et la cellule hôte	17
IV. 2. 1. Invasion de la cellule hôte	18
IV. 2. 2. La vacuole parasitophore	19
IV. 2. 3. Multiplication des toxoplasmes	20
IV. 2. 4. Les interactions entre la cellule hôte et le parasite	21
IV. 3. Le bradyzoïte et le tachyzoïte: comparaison et différenciation	22
IV. 3. 1. Comparaison entre les deux formes parasitaires	22
IV. 3. 2. La différenciation parasitaire	26
IV. 4. La génétique du toxoplasme	28
IV. 4. 1. Le génome	28
IV. 4. 2. Manipulations génétiques du toxoplasme	29
Chapitre II. La mitochondrie	31
I. Structure, génétique et fonctions de la mitochondrie	31
I. 1. La structure de la mitochondrie	31
I. 2. Génétique mitochondriale	32
I. 3. Fonctions de la mitochondrie	33
II. La chaîne respiratoire et le complexe <i>b-c1</i>	34
II. 1. La chaîne respiratoire	34
II. 1. 1. La chaîne de transport d'électrons	34
II. 1. 2. Le gradient électrochimique de protons	34
II. 1. 3. La synthèse d'ATP	35

II. 1. 4. Gradient électrochimique de protons, production d'ATP et transport de molécules	35
II. 2. Le complexe <i>b-c1</i> et le cytochrome b	36
II. 2. 1. Structure et fonction du complexe <i>b-c1</i>	36
II. 2. 2. Les inhibiteurs du complexe <i>b-c1</i>	38
III. Le système d'importation et la chaperonine Hsp60	39
III. 1. Le système d'importation	40
III. 1. 1. Le mécanisme général d'importation	40
III. 1. 2. L'importation dans les différents sous-compartiments	41
III. 1. 3. Des protéines mitochondriales essentielles pour la cellule	42
III. 2. Les chaperonines	43
III. 2. 1. La protéine GroEL	43
III. 2. 2. Les homologues eucaryotes	44
IV. La mitochondrie chez les Apicomplexa	44
IV. 1. La mitochondrie chez <i>Plasmodium</i>	44
IV. 2. La mitochondrie chez <i>Theileria</i>	50
CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE DE NOS TRAVAUX	52
LES OBJECTIFS DE LA THESE	55
RESULTATS	56
Chapitre I. Isolement et caractérisation du cytochrome b de <i>T. gondii</i>	56
I. Obtention et caractérisation de l'ADNc codant pour le cyt b	56
I. 1. Obtention d'un fragment de 420 pb par RT-PCR	56
I. 2. Les extrémités 5' et 3' de l'ADNc codant pour le cyt b	56
I. 3. L'ADNc entier codant pour le cyt b de <i>T. gondii</i>	57
II. Caractérisation structurale de la protéine cyt b de <i>T. gondii</i>	58
II. 1. Analyse de la séquence primaire	58
II. 2. Analyse du profil d'hydrophobicité	58
II. 3. Proposition de la structure 2D et des sites catalytiques du cyt b	59
III. Etude de l'expression du cyt b chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes	60
III. 1. L'analyse transcriptionnelle du gène codant pour le cyt b	60
III. 1. 1. Analyse en Northern blot	60
III. 1. 2. Analyse par RT-PCR	60
III. 2. Expression au niveau protéique	61
III. 2. 1. Etude de la sensibilité des mutants 4-pyridone ^R vis à vis de l'atovaquone	62
III. 2. 2. Etude de la sensibilité de mutants atovaquone ^R vis à vis de la 4-pyridone	63
III. 2. 3. La 4-pyridone et le cytochrome b	63
III. 2. 4. Complémentation de la souche RH HXGPRT ⁻	64
Chapitre II. Identification de la molécule chaperon Hsp60 de <i>T. gondii</i>	66
I. Obtention et caractérisation de l'ADNc codant pour l'Hsp60	66
I. 1. Le clone 57 de la banque soustractive	66
I. 2. Les extrémités 5' et 3' de l'ADNc codant pour l'Hsp60	67
I. 3. Obtention de deux types d'ADNc	67

I. 4. Caractérisation de l'ADNc1 codant pour l'Hsp60	68
II. La protéine Hsp60 de <i>T. gondii</i>	69
II. 1. Caractérisation de la protéine Hsp60	69
II. 2. Obtention d'un sérum polyclonal anti-Hsp60	71
II. 3. Le peptide signal d'importation	72
II. 4. Co-localisation de la protéine endogène Hsp60 avec le rapporteur CAT	74
III. Clonage du gène Hsp60 de <i>T. gondii</i>	76
III. 1. Analyse en Southern blot	76
III. 2. Criblage d'une banque génomique	76
IV. Etude de l'expression de la protéine Hsp60 au cours d'un choc thermique	78
V. Etude de l'expression différentielle de l'Hsp60 chez les tachyzoïtes et les bradyzoïtes	79
V. 1. Etude de l'expression au niveau transcriptionnel	79
V. 1. 1. Analyse en Northern blot	80
V. 1. 2. Analyse par RT-PCR	80
V. 1. 3. Analyse par RT-PCR semi-quantitative	80
V. 2. Expression de l'Hsp60 au niveau protéique	81
V. 2. 1. Analyse par immunoempreinte	81
V. 2. 2. Cinétique d'apparition de la protéine Hsp60 au cours de la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes	82
DISCUSSION	83
Chapitre I. Caractérisation du cytochrome b de <i>T. gondii</i>	83
I. L'ADNmt de <i>T. gondii</i> contient le gène du cyt b et celui-ci est activement transcrit	83
II. Le gène codant pour le cyt b de <i>T. gondii</i> est conservé parmi différentes souches du toxoplasme	83
III. La protéine cyt b chez <i>T. gondii</i>	84
IV. Les résistances à la 4-pyridone et à l'atovaquone ne sont pas liées à des mutations sur le cytochrome b de <i>T. gondii</i>	85
V. Analyse du gène impliqué dans la double résistance à la 4-pyridone et à l'atovaquone par complémentation	87
VI. L'ADNc codant pour le cyt b de <i>T. gondii</i> : une sonde pour caractériser son ADN mitochondrial	88
VII. L'ARNm codant pour le cytochrome b est présent chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes	90
VIII. La protéine cyt b serait présente chez les tachyzoïtes	91
Chapitre II. Caractérisation de l'Hsp60 de <i>T. gondii</i>	92
I. Un gène nucléaire, deux ARNm	92
II. Une protéine Hsp60 localisée dans la mitochondrie	93
III. Identification d'un peptide signal pour l'importation de protéines dans la mitochondrie de <i>T. gondii</i>	95
IV. L'Hsp60 de <i>T. gondii</i> n'est pas inductible par un choc thermique	96
V. Les Hsp60 des deux parasites Apicomplexa <i>T. gondii</i> et <i>P. falciparum</i> sont proches des Hsp60 des plantes supérieures	96
VI. Les transcrits Hsp60 sont présents dans les deux stades parasitaires et sont plus abondants au stade bradyzoïte	97
VII. L'Hsp60 est régulée au niveau post-transcriptionnel	99

Chapitre III. Implication de l'expression des gènes cyt b et Hsp60 sur les fonctions mitochondriales aux stades tachyzoïtes et bradyzoïtes	101
I. La mitochondrie des tachyzoïtes et des bradyzoïtes est capable d'importer des protéines cytoplasmiques	101
II. Le complexe <i>b-c1</i> serait fonctionnel chez les tachyzoïtes	102
III. Les bradyzoïtes dépendraient moins de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale	103
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	105
MATERIELS ET METHODES	107
I. Techniques de Biologie Moléculaire	107
I. 1. Extraction d'acides nucléiques	107
I. 1. 1. Extraction d'ADN	107
I. 1. 2. Extraction des ARN totaux	107
I. 2. Réactions de polymérisation en chaîne (« PCR »)	108
I. 3. Obtention d'un fragment d'ADNc codant pour le cytochrome b de <i>T. gondii</i> par RT-PCR	109
I. 4. Purification de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose	109
I. 5. Les techniques de clonage d'ADN	110
I. 6. Séquençage	111
I. 7. Obtention des extrémités 5' et 3' des ADNc (« RACE »)	112
I. 7. 1. Construction de la banque d'ADNc	112
I. 7. 2. Amplification des extrémités 5' et 3' des ADNc codant pour le cyt b ou l'Hsp60 de <i>T. gondii</i>	113
I. 8. Obtention des ADNc complets	114
I. 9. Préparation des sondes marquées à la digoxygénine	115
I. 10. « Southern blot »	115
I. 11. « Northern blot »	116
I. 12. Analyse des ARNm par RT-PCR	117
I. 12. 1. RT-PCR	117
I. 12. 2. RT-PCR semi-quantitative	119
I. 13. Clonage du gène codant pour l'Hsp60 par criblage d'une banque génomique	119
I. 13. 1. Titration de la banque	119
I. 13. 2. Criblage de la banque génomique	120
I. 13. 3. Amplification des clones positifs et extraction d'ADN de phages	121
I. 13. 4. Sous-clonage et séquençage	121
I. 14. Constructions plasmidiques	122
I. 14. 1. Constructions plasmidiques pour le ciblage de l'enzyme CAT	122
I. 14. 2. Construction plasmidique pour l'expression de la protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60	123
I. 14. 3. Construction plasmidique pour la complémentation de la souche RH de <i>T. gondii</i> sensible à la 4-pyridone	124
I. 15. Comparaison de séquences et analyse phylogénique	126
II. Techniques de Biologie Cellulaire	127
II. 1. Culture et purification des parasites	127
II. 1. 1. Culture des parasites	127

II. 1. 2. Purification des parasites	127
II. 2. Préparation des inhibiteurs	128
II. 3. Incorporation d'uracile tritiée	129
II. 4. Transfection transitoire	129
II. 5. Transfection stable	130
II. 6. Analyse par immunofluorescence indirecte	130
II. 7. Isolement et purification des mitochondries	131
II. 8. Microscopie électronique	132
II. 9. Différenciation <i>in vitro</i> des bradyzoïtes en tachyzoïtes	133
II. 10. Choc thermique	133
II. 11. Complémentation	133
III. Techniques biochimiques	135
III. 1. Détection de l'activité CAT	135
III. 2. Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	135
III. 3. Coloration au Bleu de Coomassie	136
III. 4. Immunoempreinte	136
III. 5. Production de la protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60	137
III. 5. 1. Analyse des clones recombinants	137
III. 5. 2. Production massive de la protéine recombinante	138
III. 6. Obtention d'un sérum polyclonal anti-Hsp60	138
III. 6. 1. Electroélution de la protéine recombinante	138
III. 6. 2. Immunisation	139
III. 7. Dosage des protéines	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140

Introduction

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire, intracellulaire obligatoire, extrêmement répandu dans les populations humaines et animales. Chez les hôtes intermédiaires, *T. gondii* existe sous deux formes : les tachyzoïtes et les bradyzoïtes. Les tachyzoïtes se multiplient activement au cours de la phase aiguë de l'infection et se différencient, sous la pression du système immunitaire, en bradyzoïtes. Cette forme de latence persiste dans des kystes durant toute la vie de l'hôte. Lors d'immunodépression acquise (SIDA) ou post-thérapeutique (greffes d'organes), les bradyzoïtes se différencient à nouveau en tachyzoïtes. La multiplication intracellulaire n'est alors plus contrôlée par le système immunitaire et de nombreuses lésions tissulaires apparaissent, certaines pouvant être fatales (Luft and Remington, 1988). *T. gondii* est ainsi le deuxième agent opportuniste derrière *Pneumocystis carinii* chez les patients immunodéficients.

Les mécanismes moléculaires permettant l'interconversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes et réciproquement ne sont pas encore élucidés. *In vitro*, dans des cellules n'ayant plus de chaîne respiratoire mitochondriale fonctionnelle, des inhibiteurs de la mitochondrie comme l'antimycine A (inhibiteur de la chaîne de transport des électrons) et l'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthétase) induisent la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes (Bohne, *et al.*, 1994 ;Tomavo and Boothroyd, 1995). Dans les macrophages, la différenciation est également induite par l'IFN- γ . En effet, l'oxyde nitrique, produit par les macrophages activés agirait sur les centres fer-soufre des protéines de la chaîne de transport des électrons (Bohne, *et al.*, 1994 ;Bohne, *et al.*, 1993). Le fait que des drogues anti-mitochondriales induisent la conversion en bradyzoïtes suggère que des fonctions mitochondriales sont altérées ou absentes de ce stade parasitaire. Ceci pourrait être l'un des mécanismes par lesquels la réponse immunitaire de l'hôte peut induire, *in vivo*, la différenciation en bradyzoïtes.

La mitochondrie dont les fonctions sont largement connues dans d'autres systèmes biologiques est totalement méconnue chez *T. gondii*, tant au niveau de son génome, qu'au niveau de ses métabolismes. Cependant, certaines fonctions semblent être corrélées avec la différenciation. L'objectif de ce travail a donc consisté à explorer la fonctionnalité de la

mitochondrie chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes. Notre choix s'est porté sur deux gènes codant pour des protéines mitochondriales essentielles et trouvées de façon universelle dans tous les organismes étudiés : le cytochrome b et le chaperon Hsp60. Le cyt b, maillon essentiel du complexe *bc-1* de la chaîne de transport des électrons est codé par le génome mitochondrial. L'Hsp60 est un chaperon moléculaire codé par un gène nucléaire puis importé dans la mitochondrie où il intervient dans l'assemblage des structures oligomériques.

Dans un premier temps, nous avons cloné et séquencé les ADNc codant pour ces deux protéines. Un sérum polyclonal anti-Hsp60 a été obtenu et le peptide signal permettant l'importation de protéines dans la mitochondrie de *T. gondii* a été caractérisé par transfection transitoire et stable.

Dans un second temps, l'expression du cyt b et de l'Hsp60 a été étudiée chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes au niveau transcriptionnel. L'existence de la protéine cyt b chez les tachyzoïtes a été abordée par la caractérisation de mutants résistants à un inhibiteur de la mitochondrie : la 4-pyridone dont le site d'action serait le complexe *bc-1*. L'expression de la protéine Hsp60 a également été abordée chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes ainsi qu'au cours de la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes.

L'ensemble de nos résultats démontre une implication moindre de la mitochondrie chez les bradyzoïtes. Ceci suggère une corrélation entre la différenciation de *T. gondii* et une diminution ou l'arrêt de certaines fonctions mitochondriales, notamment l'altération du métabolisme des carbohydrates et de la production d'énergie.

Généralités

Chapitre I. Le parasite *Toxoplasma gondii*

I. Historique et classification

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire, en forme d'arc (« Toxon » en grec). Il fut décrit pour la première fois par Nicolle et Manceaux en 1908 chez le gondi (*Ctenodactylus gondi*), un petit rongeur sauvage du sud de la Tunisie (Nicolle and Manceaux, 1908). Il fut découvert simultanément au Brésil, chez un lapin, par Splendore (Splendore, 1909). La première toxoplasmose humaine fut découverte en 1923 par Janku (Janku, 1923), et l'observation de formes infectieuses dans les fèces de chat fut affirmée dès 1965 par Hutchinson (Hutchinson, 1965). Frenkel démontra en 1970 que les chats sont les hôtes définitifs (Frenkel, *et al.*, 1970) et proposa le cycle parasitaire complet en 1973 (Frenkel, 1973).

Il n'existe à l'heure actuelle qu'une espèce de Toxoplasme. Ce Protozoaire (organisme eucaryote unicellulaire) fait partie du sous-règne des Protistes. Il est classé selon Levine dans le phylum des *Apicomplexa*, la classe des *Sporozoa*, la sous-classe des *Coccidia*, l'ordre des *Eucoccidiida*, le sous-ordre des *Eimeriina* aux côtés de *Isospora* et *Sarcocystis* et la famille des *Toxoplasmatidae* (Levine, *et al.*, 1980).

II. Le cycle parasitaire

Toxoplasma gondii possède un cycle hétéroxène (Frenkel, 1988). Le cycle évolutif complet (phase asexuée et sexuée) n'intervient que chez l'**hôte définitif**, le chat. Un cycle incomplet ne faisant intervenir que la phase asexuée se déroule chez tous les vertébrés homéothermes ou **hôtes intermédiaires** (figure 1).

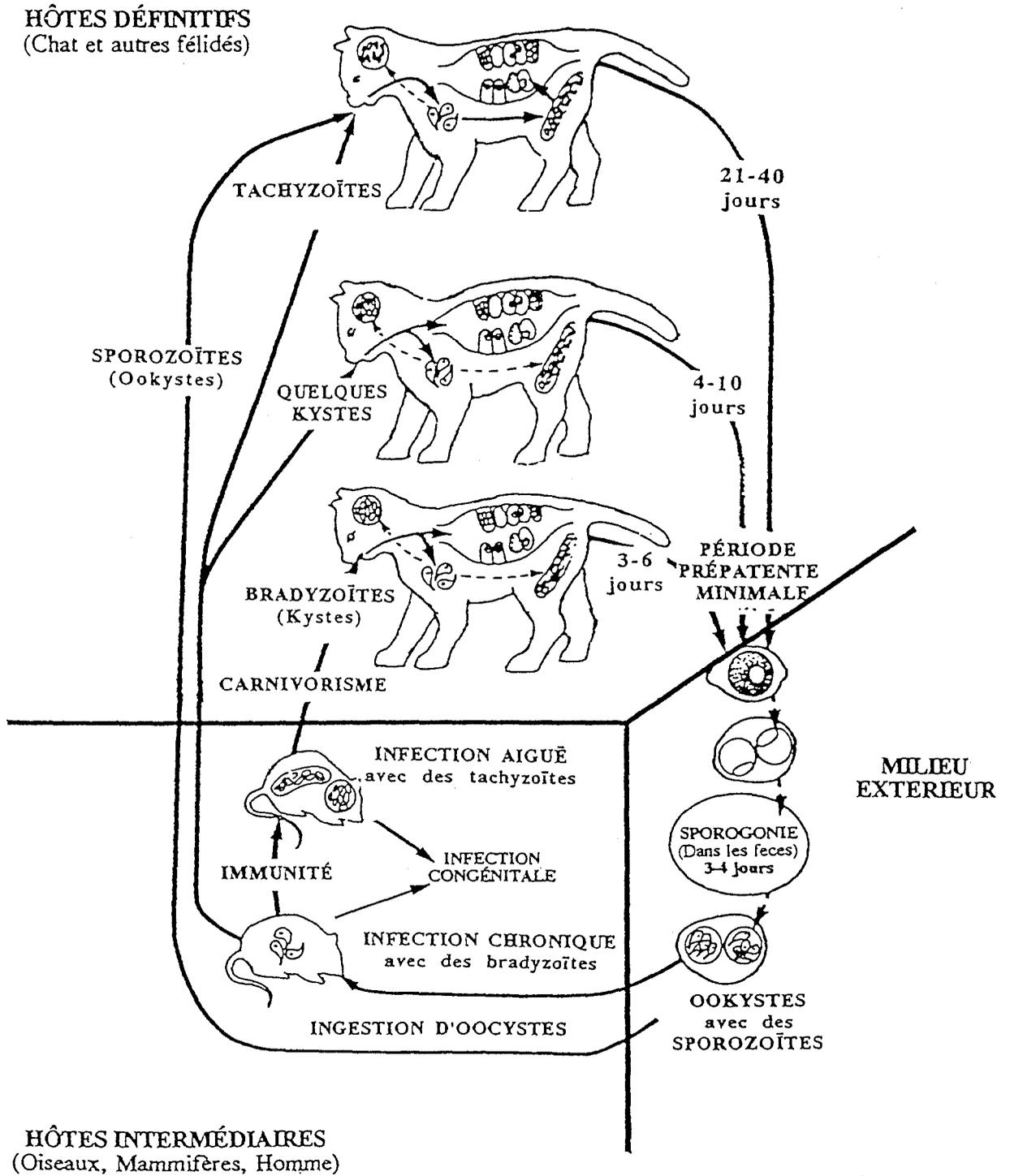


Figure 1 : Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii*. (D'après Frenkel, 1988).

II. 1. Le cycle sexué

Le chat s'infeste le plus souvent par ingestion de **kystes** présents dans le cerveau ou les muscles de petits rongeurs. Après digestion enzymatique de la paroi du kyste, les **bradyzoïtes** libérés envahissent les cellules épithéliales de l'intestin et s'y multiplient activement par schizogonie. Les **schizontes** issus de cette multiplication asexuée donnent naissance, par division du cytoplasme, aux mérozoïtes qui vont se différencier en **macrogamètes** (gamètes femelles immobiles) et **microgamètes** (gamètes mâles flagellées). Les oocystes qui résultent de la fécondation des gamétocytes dans les microvillosités de l'intestin, sont éliminés avec les fèces du chat dans le milieu extérieur. La sporulation des **oocystes** va alors donner deux sporocystes contenant chacun quatre **sporozoïtes** infestants. Les oocystes sont extrêmement résistants aux agents physiques et chimiques et peuvent survivre plus d'un an dans le sol.

II. 2. Le cycle asexué

Le cycle asexué qui se déroule chez les hôtes intermédiaires dont l'Homme, résulte de l'ingestion de kystes contenus dans la viande parasitée mal cuite ou d'oocystes présents dans les aliments souillés. Les formes parasitaires infestantes, bradyzoïtes ou sporozoïtes, sont libérées au niveau de l'intestin après digestion de la paroi du kyste ou de l'oocyste. Les parasites se différencient ensuite rapidement en tachyzoïtes et se disséminent par voie sanguine et lymphatique dans tout l'organisme. Les tachyzoïtes envahissent les cellules, s'y multiplient activement jusqu'à rupture de la membrane de la cellule hôte et pénètrent alors dans les cellules avoisinantes. C'est la **phase aiguë** de l'infection. Après quelques jours, des défenses immunitaires spécifiques s'établissent et permettent le contrôle de cette infection. Les tachyzoïtes sont alors progressivement éliminés. Quelques unes de ces formes prolifératives se différencient alors en bradyzoïtes. Ces formes parasitaires à multiplication lente s'entourent d'une paroi épaisse et forment des kystes principalement dans le cerveau et les muscles de l'hôte. L'enkystement correspond à la **phase chronique** de la maladie qui persiste de manière latente pendant toute la durée de la vie de l'hôte. Ce cycle asexué peut également se dérouler chez les félinés.

III. La pathogenèse

III. 1. La toxoplasmose

L'infection par *T. gondii* est le plus souvent asymptomatique chez les sujets immunocompétents, et engendre une pathogenèse bénigne caractérisée par des adénopathies, une fièvre modérée et une asthénie dans 15% des cas. Le pourcentage de personnes séropositives pour la toxoplasmose varie d'un pays à l'autre, en fonction des habitudes alimentaires et des conditions d'hygiène. En France, 80% des adultes sont porteurs d'anticorps anti-toxoplasmiques, témoin d'une infection ancienne. L'infection résulte principalement de la consommation de kystes contenus dans des viandes crues ou peu cuites (Morlat, *et al.*, 1993).

Les formes graves de toxoplasmose sont rencontrées en cas d'immaturité du système immunitaire (toxoplasmose congénitale) ou d'immunodéficience acquise (SIDA) ou post-thérapeutique (greffe de moelle osseuse, transplantations d'organes, thérapie anti-cancéreuse) (Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993a ; Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993b).

III. 1. 1. La toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale survient en cas de primo-infection toxoplasmique en cours de gestation. Le fœtus, contaminé par voie transplacentaire, possède un système immunitaire immature et est incapable de réagir contre le parasite. Cette infection congénitale est un problème en médecine humaine et vétérinaire.

a) Chez l'Homme

La toxoplasmose congénitale est la conséquence d'une toxoplasmose acquise par la mère en cours de grossesse. Dans une étude réalisée en France en 1995 (Ancelle, *et al.*, 1996), 54,3% des femmes enceintes examinées sont séropositives pour la toxoplasmose. Dès lors, une femme sur deux est exposée au risque de séroconversion pendant sa grossesse et dans 45% des cas de séroconversion de la mère, les tachyzoïtes traversent le placenta et contaminent le fœtus.

Des tests de dépistage mensuels permettent une surveillance sérologique des mères exposées au risque toxoplasmique et assurent un dépistage précoce des formes évolutives qui surviennent chez 1 à 2% des femmes séronégatives (Thulliez, 1993).

Lorsque la primo-infection maternelle survient tardivement au cours de la grossesse, la contamination foetale est plus fréquente mais les lésions sont plus atténuées. La contamination du fœtus dans le premier trimestre de grossesse est faible mais les lésions sont importantes, entraînant la mort du fœtus et l'avortement spontané ou la formation de foyers nécrotiques responsables d'atteintes céphaliques particulièrement graves. Une infection plus tardive du fœtus peut se traduire par une toxoplasmose congénitale latente. Une rechute peut alors survenir tardivement, généralement lors de la puberté, avec le plus souvent des manifestations oculaires (Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993a ; Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993b).

b) Chez l'animal

La toxoplasmose congénitale pose de graves problèmes économiques dans les activités d'élevage car elle touche les bovins et surtout les ovins (Buxton, *et al.*, 1989). La moitié des avortements chez les brebis sont en effet liés à l'infection toxoplasmique (Buxton, 1993). L'avortement n'ayant lieu qu'en cas de primo-infection en cours de gestation, un vaccin à injecter en dehors des périodes de gestation a été commercialisé (Buxton and Innes, 1995).

III. 1. 2. La toxoplasmose de l'immunodéprimé

A la suite d'une primo-infection, le parasite persiste sous forme kystique dans certains organes tels que les muscles, le myocarde et le cerveau. Une réactivation parasitaire, c'est-à-dire une reprise de la multiplication du parasite à la faveur d'un déficit de l'immunité cellulaire, est à l'origine de la quasi-totalité des infections toxoplasmiques graves chez les greffés de la moelle osseuse et chez les patients atteints du SIDA. Au contraire, chez les patients subissant une transplantation cardiaque, la pathologie provient d'une primo-infection (Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993a ; Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993b ; Rousseau, *et al.*, 1993).

a) Chez les malades du SIDA

La toxoplasmose cérébrale est rarement consécutive à une primo-infection par *T. gondii* mais résulte le plus souvent de la rechute de toxoplasmose chronique. La fréquence

d'apparition de la toxoplasmose cérébrale varie donc en fonction de la séroprévalence toxoplasmique dans une population. On estime que 15 à 40% des malades du SIDA vont développer une toxoplasmose cérébrale (Morlat, *et al.*, 1993). Elle représente la deuxième infection opportuniste, en terme de fréquence, après la pneumocystose pulmonaire.

Les symptômes de la toxoplasmose cérébrale varient mais ils associent généralement fièvre, céphalée et troubles neurologiques. En absence de traitement, la toxoplasmose cérébrale évolue vers une encéphalite toxoplasmique mortelle. Plus rarement, des toxoplasmoses extra-cérébrales (oculaires, pulmonaires, disséminées, myocardiques, etc) sont observées au cours du SIDA (May, *et al.*, 1993).

b) Chez des patients transplantés et greffés

Les patients séronégatifs pour la toxoplasmose et recevant une greffe d'organe d'un donneur positif pour *T. gondii*, présentent un risque élevé de développer la maladie. Par exemple, le risque de transmission *via* un coeur parasité est de 57% (Luft, *et al.*, 1983). La réactivation des kystes contenus dans le greffon lui-même est d'autant plus facilitée par le traitement immuno-suppresseur subit par le patient greffé afin d'éviter les épisodes de rejet.

En revanche, la toxoplasmose associée à la greffe de moelle osseuse provient de la réactivation des kystes latents présents chez le greffé séropositif. En effet, irradié avant la greffe, le patient deviendrait immunodéprimé et immunologiquement naïf vis-à-vis du parasite. Et le greffon, ne contenant pas de cellules immunocompétentes vis-à-vis de *T. gondii* ne pourrait restaurer la capacité à répondre contre le parasite (Derouin, *et al.*, 1992).

III. 2. Immunologie et diagnostic de la toxoplasmose

III. 2. 1. Immunologie

Chez l'individu immunocompétent, la phase aiguë de la maladie est rapidement contrôlée par le système immunitaire. Cette réponse fait intervenir à la fois des composants humoraux et cellulaires. Les anticorps, constituent la première barrière de défense de l'organisme et interviendraient dans de nombreux mécanismes comme la protection locale de la muqueuse digestive (notamment par les IgA), la lyse ou l'opsonisation des parasites

extracellulaires. La réponse cellulaire constitue le facteur majeur de résistance contre l'infection toxoplasmique et fait intervenir les lymphocytes T CD8⁺, CD4⁺ et $\gamma\delta$, les cellules NK (« Natural killer ») et les macrophages (Denkers and Gazzinelli, 1998). Parmi les cytokines impliquées dans la protection contre l'infection toxoplasmique, l'IFN- γ semble être un médiateur majeur du contrôle de l'infection anti-toxoplasmique.

L'immunité acquise lors de la primo-infection permet le contrôle de la prolifération des parasites libérés par la rupture de kystes. Il semble que la rupture occasionnelle des kystes assurerait également une protection totale et définitive contre toute réinfection.

III. 2. 2. Diagnostic

Le diagnostic de la toxoplasmose repose principalement sur la mise en évidence d'anticorps spécifiques. Les techniques sérologiques (ELISA, « Enzyme linked immunosorbent assay »), de part la cinétique d'apparition de différents isotypes d'anticorps, permettent de dater l'infection. Ceci est essentiel dans le cas de la toxoplasmose congénitale. Chez les patients atteints du SIDA, seule la mise en évidence des IgA et IgE sont utiles pour établir une toxoplasmose cérébrale liée à la réactivation de formes latentes enkystées.

Dans le cas où la production d'anticorps est très faible (immaturité du système immunitaire) ou ne varie pas (réactivation de la toxoplasmose chez les personnes immunodéficientes), la mise en évidence directe du parasite peut être nécessaire pour confirmer le diagnostic. Les tests diagnostiques maintenant basés sur l'amplification par « Polymerase Chain Reaction » (PCR), remplacent avantageusement la mise en culture *in vitro* des parasites ou l'inoculation à des animaux d'expérience. La fiabilité et la rapidité de ces tests PCR permettent la mise en place précoce d'un traitement. Enfin, les techniques d'imagerie médicale sont un atout récent dans le diagnostic de la toxoplasmose cérébrale. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est par exemple une technique extrêmement sensible pour détecter les lésions encéphaliques lors de la toxoplasmose cérébrale chez les patients atteints du SIDA (Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993a ; Morlat, *et al.*, 1993).

III. 3. Vaccins et traitements

III. 3. 1. Vaccins

L'infection toxoplasmique est l'une des rares maladies parasitaires pour laquelle il existe une immunité à la réinfection durable et spécifique. Un vaccin efficace doit développer une immunité stérilisante sans enkystement des parasites afin d'éviter les rechutes de toxoplasmose chronique lors d'immunodéficiences. Le développement d'un vaccin devrait également éliminer la toxoplasmose congénitale tant chez l'Homme que chez les animaux d'élevage.

Un vaccin pour lutter contre la toxoplasmose chez les ovins est commercialisé. Il repose sur l'inoculation de tachyzoïtes vivants d'une souche atténuée de *T. gondii* (souche S48), incapable de se différencier en bradyzoïtes. Ce vaccin permet de lutter efficacement contre l'avortement chez les brebis (Buxton and Innes, 1995 ;Buxton, *et al.*, 1991).

Chez l'Homme, aucun vaccin n'est disponible. La recherche d'antigènes protecteurs, cibles de la réponse immunitaire, s'est portée sur l'antigène majeur de surface SAG1 et sur les antigènes d'excrétion-sécrétion (Darcy, *et al.*, 1988 ;Darcy, *et al.*, 1992 ;Godard, *et al.*, 1994).

III. 3. 2. Traitements

Seules, la toxoplasmose congénitale et la toxoplasmose de l'immunodéprimé nécessitent un traitement. La toxoplasmose est habituellement traitée par les inhibiteurs de la voie des folates mais de nombreuses molécules sont maintenant développées afin d'éviter les effets secondaires et d'éradiquer les parasites enkystés.

a) Molécules agissant sur la synthèse des folates

La voie de synthèse des folates est inhibée de façon synergique par les **sulfamides** (inhibition de la dihydroptéroate synthétase) et la **pyriméthamine** ou le **triméthoprime** (inhibition de la dihydrofolate réductase). La carence en folates est responsable, secondairement d'altérations de la synthèse des bases puriques et de troubles de la division parasitaire. L'activité de ces médicaments est limitée à la forme répliquative du parasite et n'a pas d'effet sur les kystes.

Cette association médicamenteuse est la thérapie de référence de la toxoplasmose cérébrale au cours du SIDA (Leport, *et al.*, 1988). Son inefficacité sur les kystes nécessite par ailleurs un traitement continu pour éviter la réactivation des formes latentes. Mais le traitement est interrompu dans 20% à 30% des cas en raison de la faible tolérance à la sulfadiazine (Morlat, *et al.*, 1993).

De part l'effet tératogène de la pyriméthamine, ce traitement n'est utilisé dans le cas de la toxoplasmose congénitale qu'au delà des vingt premières semaines de grossesse (Couvreur, 1993).

b) Macrolides

La **clindamycine**, lincosamide apparenté aux macrolides, se substitue, en association avec la pyriméthamine, au traitement de la toxoplasmose cérébrale en cas d'intolérance aux sulfamides. Mais, à nouveau, le traitement est inefficace sur les kystes et comporte des effets secondaires (Caumes, *et al.*, 1995 ;Morlat, *et al.*, 1993).

Les macrolides de « nouvelle génération » tels que la roxithromycine, l'azithromycine et la clarithromycine sont caractérisés par une longue demi-vie et une bonne pénétration cellulaire, notamment au niveau pulmonaire. Ils restent cependant sans effet sur les kystes. Une activité synergique a été démontrée *in vivo* mais pas *in vitro* entre les macrolides et d'autres médicaments antiparasitaires (Alder, *et al.*, 1994 ;Araujo, *et al.*, 1991b).

La bonne tolérance et l'absence de toxicité de la **spiramycine** en fait une molécule de choix pour le traitement de la toxoplasmose congénitale. Sa persistance au niveau tissulaire et notamment au niveau du placenta, empêche le passage transplacentaire des tachyzoïtes. Ce traitement, efficace contre la contamination foetale est toutefois inactif contre la toxoplasmose chronique (Schoondermark-van de Ven, *et al.*, 1994).

c) Cyclines

L'activité anti-toxoplasmique de la **tétracycline** est connue de longue date, mais son efficacité reste modeste. Parmi les « nouvelles » cyclines, la **minocycline** est la plus active, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Un effet synergique important est observé lorsque la minocycline et la clarithromycine sont associées; ce qui pourrait représenter une thérapie alternative à l'utilisation des inhibiteurs de la synthèse des folates (Araujo, *et al.*, 1992b ;Lacassin, *et al.*, 1995).

d) Atovaquone

L'**atovaquone** a pour cible la chaîne respiratoire mitochondriale (Pfefferkorn, *et al.*, 1993). Contrairement aux autres médicaments, cette molécule présente non seulement un effet parasiticide sur les tachyzoïtes, mais elle est également active sur les kystes (Araujo, *et al.*, 1991a ; Araujo, *et al.*, 1992a). Son administration prolongée permet une réduction significative du nombre de kystes sans toutefois éradiquer complètement le réservoir parasitaire qu'ils constituent (Katlama, *et al.*, 1996 ; Kovacs, 1992 ; Torres, *et al.*, 1993). L'atovaquone offre donc une bonne alternative pour les patients immunodéprimés intolérants aux autres médicaments, et en réduisant la charge kystique, limite les risques de réactivation.

e) Autres thérapies

L'**IFN- γ** est la principale cytokine produite au cours de la toxoplasmose. Elle présente un effet synergique avec la pyriméthamine et la clindamycine (Israelski and Remington, 1990). Son emploi dans le traitement de l'encéphalite toxoplasmique est envisagée (Leport and Remington, 1992 ; Suzuki and Remington, 1993).

III. 3. 3. La mise au point de nouvelles thérapies

En raison des effets secondaires, de l'inefficacité des traitements sur les formes latentes enkystées et de la nécessité d'un traitement curatif à long terme chez les patients atteints du SIDA, la mise au point de nouvelles thérapies s'impose.

a) Recherche empirique et étude des métabolismes parasitaires

La recherche de nouvelles molécules peut se faire de façon **empirique**, en testant les molécules déjà disponibles et en observant leur activité biologique contre le pathogène d'intérêt. La majorité des drogues actuellement utilisées furent ainsi identifiées. L'efficacité de l'**atovaquone** contre *P. falciparum* et contre *T. gondii* est un exemple récent de drogue découverte de manière empirique (Hudson, 1994). Les cibles moléculaires sont identifiées secondairement (Pfefferkorn, *et al.*, 1993).

Une autre approche consiste à **définir des molécules clés** pour le développement du parasite, à déterminer leur structure tridimensionnelle et synthétiser des analogues structuraux

comme inhibiteur. La cible moléculaire idéale doit être **spécifique** du parasite ou suffisamment inactive chez l'hôte, **essentielle** à la croissance et à la survie du parasite *in vivo* et être facile à étudier du point de vue moléculaire (enzyme ou métabolite clé et non un complexe macromoléculaire). Cette approche nécessite une bonne connaissance de la biologie et du métabolisme parasitaire. Les voies de biosynthèse des purines et des pyrimidines chez *T. gondii* offrent par exemple de nombreuses cibles potentielles pour l'incorporation d'analogues cytotoxiques dans les nucléotides (Carter, *et al.*, 1997 ;Ullman and Carter, 1995). Les relations structure moléculaire-fonction des protéines ont confirmé que les enzymes **UPRT** (uracil phosphoribosyltransférase) et **HXGPRT** (hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransférase) reconnaissent des analogues structuraux des pyrimidines et des purines et peuvent être spécifiquement inhibées par la 5-fluorodéoxyuridine (Iltzsch and Tankbrsley, 1994 ;Pfefferkorn, 1978 ;Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1977b) et la 6-thioxanthine (Naguib, *et al.*, 1995 ;Pfefferkorn and Borotz, 1994). La **phosphofructokinase**, enzyme de la glycolyse, est spécifique du toxoplasme puisqu'elle dépend du pyrophosphate et non de l'ATP comme chez les Mammifères. Cette enzyme figure parmi les nouvelles cibles potentielles pour inhiber le développement de *T. gondii* (Peng, *et al.*, 1995).

b) Les organites endosymbiotiques comme cible thérapeutique

L'apicoplaste, plaste non photosynthétique probablement dérivé d'une algue verte (Köhler, *et al.*, 1997) et la mitochondrie issue de l'endosymbiose d'une α -protéobactérie (Gray, 1992) possèdent des caractéristiques procaryotiques. Ces organites sont essentiels au développement de *T. gondii* et présentent donc un intérêt thérapeutique possible.

L'**apicoplaste** est particulièrement intéressant puisqu'un organite équivalent n'existe pas chez les Mammifères. Par ailleurs, un inhibiteur appelé **thiostrepton** est capable de se fixer spécifiquement sur l'ARNr de la grande sous-unité ribosomale du plaste codée par le gène *tufA* (Clough, *et al.*, 1997 ;Rogers, *et al.*, 1997) et d'inhiber la croissance *in vitro* de *P. falciparum* (McConkey, *et al.*, 1997). Par contre, le thiostrepton ne semble pas se fixer sur la région GTPase de l'ARNr 23S de *T. gondii* en raison d'une substitution nucléotidique sur la séquence de l'ADN plastidial du toxoplasme (Clough, *et al.*, 1997).

Les inhibiteurs de l'**ARN polymérase** eubactérienne tels que la rifampine (Pukrittayakamee, *et al.*, 1994) et la rifampicine (Strath, *et al.*, 1993) sont efficaces sur

Plasmodium. La **rifapentine** est active *in vitro* et *in vivo* sur *T. gondii* (Araujo, *et al.*, 1996) et la **rifabutine**, en association avec d'autres drogues est également efficace contre *T. gondii* (Olliaro, *et al.*, 1994). Alors que des souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à la rifampicine présentent une mutation dans le gène *rpoB* (Bodmer, *et al.*, 1995 ;Taniguchi, *et al.*, 1996), des mutants spontanés de *P. falciparum* n'ont pas de mutation sur leur gène *rpoB* plastidial (Strath, *et al.*, 1993). Le mode d'action de ces drogues n'est donc pas clairement défini.

Chez *T. gondii*, les macrolides et plus particulièrement la **clindamycine** pourrait agir *via* l'apicoplaste (Fichera and Roos, 1997). Enfin, l'apicoplaste jouerait un rôle vital dans la biosynthèse des acides gras, et la **thiolactomycine**, inhibiteur de cette voie métabolique bloque la croissance de *P. falciparum* (Waller, *et al.*, 1998).

L'inhibition de la **mitochondrie** est plus délicate car cet organe est présent à la fois chez l'hôte et chez le parasite et ses fonctions métaboliques pour le développement du toxoplasme ne sont pas définies. Contrairement aux autres organismes chez qui la **tétracycline** inhibe la mitochondrie, son mécanisme d'action sur *T. gondii* n'est pas connu (Wong and Remington, 1993). Chez *P. falciparum*, la tétracycline bloquerait spécifiquement la synthèse protéique mitochondriale (Kiatfuengfoo, *et al.*, 1989). L'**atovaquone**, inhibiteur de nombreux Apicomplexa (Hudson, 1993), agirait sur le complexe III mitochondrial (Pfefferkorn, *et al.*, 1993) et présenterait une affinité moindre pour le cytochrome b des Mammifères (Vaidya, *et al.*, 1993). Enfin, Nosek *et al.* (Nosek, *et al.*, 1998) proposent de tirer profit de la différence de structure et de réplication entre l'ADNmt de l'hôte et l'ADNmt des microorganismes. Les Mammifères possèdent un ADNmt circulaire alors que de nombreux agents pathogènes tels que *Plasmodium* et *Theileria* possèdent un ADNmt linéaire.

Ainsi, ces deux organites présentent un intérêt thérapeutique indéniable et élucider leurs fonctions métaboliques pourrait permettre de développer et d'améliorer de nouvelles molécules anti-toxoplasmiques.

IV. La biologie de *T. gondii*

IV. 1. Ultrastructure du toxoplasme

La cellule ou « zoïte » de *T. gondii*, forme infectieuse des différents stades de développement : tachyzoïte, bradyzoïte, ou sporozoïte est de forme arquée, longue de 6 à 8 μm et large de 2 à 3 μm (figure 2). L'extrémité apicale est plus effilée que l'extrémité postérieure qui apparaît arrondie (Fortier and Dubremetz, 1993).

C'est une cellule hautement différenciée comprenant les organites communs aux cellules eucaryotes et des organites spécifiques.

IV. 1. 1. Les organites communs aux eucaryotes

T. gondii possède un noyau qui est localisé dans sa moitié postérieure. Une mitochondrie unique et ramifiée, un appareil de Golgi, un réticulum endoplasmique et de nombreux ribosomes sont également présents chez le zoïte. Les substances de réserve sont composées de globules lipidiques et de grains d'amylopectine (Dubey, *et al.*, 1998).

IV. 1. 2. Les organites spécifiques

Le toxoplasme partage avec tous les Apicomplexa, trois structures particulières, une pellicule trimembranaire, un complexe apical situé dans la partie antérieure du parasite, et une structure plurimembranaire nommée « apicoplaste ».

a) La pellicule trimembranaire

Le parasite est délimité par un complexe membranaire organisé en trois feuillets : une membrane plasmique externe classique, sans « cell coat » développé et un complexe membranaire interne (Vivier and Petitprez, 1969). Ce complexe est formé de deux membranes indissociables et constituant les faces opposées de vésicules aplaties. Il pourrait correspondre à une région spécialisée du réticulum endoplasmique (deMelo and de Souza, 1997).

La pellicule membranaire entourant le parasite s'interrompt au niveau du micropore. Le micropore se présente sous la forme d'une invagination, circulaire et latérale, de la membrane



Figure 2 : Morphologie ultrastructurale d'un tachyzoïte intra-cellulaire de *T. gondii*. (D'après Yahiaoui *et al.*, 1999).

Ap: apicoplaste, C: conoïde, Gd: granule dense, M: micronèmes, Mp: mitochondrie parasitaire, N: noyau, R: rhoptries, VP: vacuole parasitophore

plasmique dans un petit puits traversant le complexe membranaire interne (Fortier and Dubremetz, 1993).

b) Le complexe apical

Le complexe apical est la structure la plus caractéristique des Apicomplexa qui lui doivent d'ailleurs leur nom. Il est situé dans la partie antérieure du parasite et comprend les anneaux polaires, le conoïde (absent chez les Hémospodidies), et trois types d'organites, délimités par une membrane et impliqués dans l'invasion des cellules hôtes : les rhoptries, les granules denses et les micronèmes (Fortier and Dubremetz, 1993). Sibley *et al.* proposèrent une nomenclature afin de classer les différentes molécules : les gènes MIC, ROP et GRA codent respectivement pour les protéines de micronèmes, de rhoptries et de granules denses (Sibley, *et al.*, 1991).

Le **conoïde** en forme de tronc est constitué de structures fibrillaires enroulées en spirale. Il est limité en avant, par deux anneaux apicaux et en arrière, par deux anneaux polaires. Un des anneaux polaires situé à la base du conoïde sert d'insertion à vingt-deux microtubules longitudinaux, disposés à intervalles réguliers contre la face interne du complexe membranaire interne. Il pourrait constituer le centre organisateur de ces microtubules (Nichols and Chiappino, 1987). Les tubulines α et β (50-55 kDa) qui copolymérisent pour former les microtubules seraient impliquées dans la formation de l'architecture cellulaire, la mobilité, le transport intracellulaire, la sécrétion et la division cellulaire (Nagel and Boothroyd, 1988).

Les **micronèmes** sont des organites sécrétoires denses aux électrons, en forme de petits bâtonnets et trouvés en quantité variable dans la partie antérieure du parasite. Ils interviendraient dans la reconnaissance et l'attachement à la cellule hôte en exocytant leur contenu au moment de l'invasion (Carruthers and Sibley, 1997). Cette exocytose serait régulée par la concentration en calcium dans le cytoplasme de *T. gondii* (Carruthers and Sibley, 1999). Les protéines MIC1 (60kDa), MIC2 (120 kDa) et MIC3 (90 kDa) ont été identifiées et largement caractérisées. Bien que leur rôle précis ne soit pas déterminé, elles présentent des domaines potentiellement impliqués dans des phénomènes d'adhésion. Des domaines homologues à ceux décrits dans les protéines TRAP (« Thrombospondin Related Adhesive Protein ») et CSP (« Circumsporozoite Protein ») de *Plasmodium* intervenant dans les processus d'attachement et d'invasion avec les hépatocytes sont trouvés sur la protéine MIC1 (Fourmaux, *et al.*, 1996). De même, la protéine MIC2 présente des homologies avec les

protéines TRAP. La protéine MIC3 possède cinq motifs homologues à des domaines du facteur de croissance épidermique (EGF, « Epidermal Growth Factor ») ainsi qu'un domaine apparenté aux lectines; ce qui suggère des interactions protéine-glycane lors des phénomènes de reconnaissance ligand-récepteur (Garcia-Réguet and Dubremetz, non publié).

Les **rhoptries** sont des organites en forme de massues allongées, logés dans le tiers antérieur de la cellule et mesurant de 1 à 4 μm de long. Le pédoncule effilé, dense aux électrons s'insinue dans le conoïde. Ces organites, au nombre de dix, sont des glandes de sécrétion qui vident leur contenu lors de l'invasion du parasite dans la cellule (Fortier and Dubremetz, 1993). Jusqu'à présent une dizaine de protéines de rhoptries (ROP1...ROP11) a été décrite. Bien que chez *T. gondii* aucune fonction n'ait été attribuée à ces protéines, chez d'autres Apicomplexa (*Plasmodium*, *Sarcocystis*), elles seraient impliquées dans les mécanismes d'attachement et d'invasion cellulaire (Sam-yellow, 1996). La protéine ROP1 (60,5 kDa) a été initialement décrite comme un facteur protéique, le PEF (« Penetration Enhancing Factor ») capable d'augmenter la pénétration des toxoplasmes dans la cellule hôte (Lycke, *et al.*, 1975 ;Lycke and Norrby, 1966). Quelques heures après l'invasion, la protéine ROP1 disparaît de la membrane de la vacuole parasitophore suggérant son implication précoce dans la formation de la vacuole (Saffer, *et al.*, 1992). La fonction exacte de la protéine ROP1 n'a pas encore été identifiée puisqu'aucun phénotype lié à la perturbation de l'attachement et de l'invasion n'est observé chez le mutant nul ROP1⁻, obtenu par une interruption du gène ROP1 par double recombinaison homologue (Soldati, *et al.*, 1995).

Les **granules denses** sont des organites cytoplasmiques de 0,2 μm de diamètre répartis de part et d'autre du noyau. Ils sont également limités par une membrane et sont constitués d'un matériel homogène, dense aux électrons. Les protéines GRA (GRA1 à GRA7) constituent une famille de molécules de petit poids moléculaire (20 à 40 kDa) dont la fonction n'est pas encore déterminée (Cesbron-Delauw, *et al.*, 1996). Deux autres protéines, la NTPase1 (240 kDa) et NTPase2 (270 kDa) sont également contenues dans les granules denses. Toutes ces protéines sont stockées sous forme soluble dans les granules denses et sont sécrétées dans la vacuole parasitophore après l'invasion du parasite dans la cellule hôte (Carruthers and Sibley, 1997). Les protéines exocytées sont ensuite ciblées différenciellement au sein de la vacuole parasitophore. Alors que la protéine GRA1 et les NTPases restent solubles et diffusent dans l'espace intravacuolaire, les protéines GRA2, GRA4 et GRA6 s'associent avec les membranes

du réseau intravacuolaire et les protéines GRA3, GRA5 et GRA7 s'associent avec la membrane délimitante de la vacuole parasitophore (Charif, *et al.*, 1990).

c) L'apicoplaste

L'« apicoplaste » est une structure plurimembranaire, ovoïde et située dans la région antérieure au noyau, à proximité de l'appareil de Golgi (Siddall, 1992). McFadden *et al.* (McFadden, *et al.*, 1996) démontrèrent que cette vacuole à quatre membranes contient un génome circulaire de 35 kb apparenté à celui des plastes des organismes photosynthétiques (Wilson, *et al.*, 1996b). Cette structure nommée « apicoplaste » est spécifique des Apicomplexa et se retrouve chez *Plasmodium*, *Theileria* et *Eimeria* (Wilson, *et al.*, 1996b). Elle proviendrait d'une endosymbiose secondaire entre un eucaryote primitif et une algue verte (Köhler, *et al.*, 1997). L'ADN plastidial est transcrit (Wilson and Williamson, 1997) et des protéines codées par le génome nucléaire peuvent être importées dans l'apicoplaste (Waller, *et al.*, 1998). Ces enzymes interviendraient dans la biosynthèse des acides gras de type II, caractéristique des bactéries et des plastes d'algues et de plantes (Waller, *et al.*, 1998). Ces résultats, associés à l'action de drogues anti-plastidiales (Fichera and Roos, 1997) suggèrent que l'organite est fonctionnel et nécessaire au développement de *T. gondii*. Le rôle fonctionnel de ce plaste non photosynthétique n'est pas encore complètement élucidé.

IV. 2. Les interactions entre le toxoplasme et la cellule hôte

Le parasite a une durée de vie limitée à quelques heures en milieu acellulaire et doit obligatoirement envahir une cellule pour assurer sa survie et son développement. *T. gondii* se multiplie dans toutes les cellules nucléées des hôtes homéothermes. Il réussit son invasion en pénétrant de manière active dans la cellule hôte, et se multiplie dans un compartiment spécialisé: la vacuole parasitophore. Les différents organites du complexe apical interviennent séquentiellement, à chaque étape du processus, par l'exocytose de leur contenu (Carruthers and Sibley, 1997).

IV. 2. 1. Invasion de la cellule hôte

Le processus d'infection d'une cellule hôte est artificiellement divisé en deux étapes: une étape d'attachement suivie d'une étape de pénétration (Dubremetz, 1998 ;Sibley, 1995).

a) Attachement

Bien qu'il soit dépourvu de cil ou de flagelle, *T. gondii* est très mobile. Il utilise son substrat pour avancer grâce à des mouvements de rotation et de glissement. Ces mouvements sont nécessaires pour entrer en contact avec la cellule et l'envahir (Dobrowolski and Sibley, 1996 ;Sibley, *et al.*, 1998).

Des récepteurs parasites reconnaissant des molécules de surface communes à tous les types cellulaires et à de nombreuses espèces pourraient être impliqués. La laminine distribuée de façon uniforme à la surface du toxoplasme servirait de pont entre le tachyzoïte et l'intégrine $\alpha\beta 1$ des fibroblastes (Furtado, *et al.*, 1992a ;Furtado, *et al.*, 1992b). L'antigène majeur de surface SAG1, les lectines identifiées sur les molécules sécrétées par les rhoptries et la protéine MIC2 sécrétée par les micronèmes pourraient également intervenir dans l'attachement du parasite à la cellule hôte (de Carvalho, *et al.*, 1991 ;Dobrowolski and Sibley, 1996 ;Grimwood and Smith, 1995 ;Sibley, *et al.*, 1998).

Enfin, la membrane de la cellule hôte ne présenterait pas la même attraction pour le parasite selon la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve. Un récepteur serait spécifiquement exprimé à la surface des cellules hôtes au cours de la phase S de synthèse de l'ADN cellulaire, et privilégierait l'infestation parasitaire (Grimwood, *et al.*, 1996).

b) Invasion

L'invasion est un phénomène actif et rapide (10s à 40s contre 120s pour la phagocytose,(Werk, 1985)). Grâce à son cytosquelette composé de molécules d'actine et de myosine, et à des interactions avec des récepteurs de la cellule hôte, le toxoplasme par des **mouvements de glissement**, se réoriente pour présenter sa partie apicale au contact de la membrane plasmique de la cellule. Les protéines des **micronèmes** sont sécrétées au pôle apical et interviendraient dans le contact initial entre le parasite et la cellule hôte.

La **protrusion du conoïde**, dépendante d'ions Ca^{2+} (Mondragon and Frixione, 1996), entraîne l'invagination de la membrane plasmique de la cellule hôte. Cette dépression

membranaire se transforme en calotte sphérique à la périphérie de laquelle apparaît un anneau faisant une jonction mobile avec le parasite. Lors de cette étape, les protéines contenues dans les **rhoptries** sont déversées au niveau du conoïde, sur la membrane de la cellule hôte afin de la déstabiliser (Carruthers and Sibley, 1997). La phospholipase A₂ agirait sur la fluidité membranaire de la cellule hôte lors de l'invasion (Saffer and Schwartzman, 1991).

La **jonction mobile** ainsi formée entre le parasite et la cellule sert d'appui au zoïte pour glisser dans la vacuole parasitophore en formation. Elle est généralement visualisée par une constriction du toxoplasme qui apparaît au pôle apical et progresse le long du parasite en cours d'invasion. Lorsque la jonction a atteint le pôle postérieur du toxoplasme, la membrane entourant le parasite se pince, se détache du plasmalemme et isole le parasite du cytoplasme de la cellule hôte dans la **vacuole parasitophore** (Dubremetz, 1998 ;Sibley, 1995). L'exocytose des **granules denses** intervient lorsque la vacuole s'est refermée sur le parasite et elle est maximale vingt minutes environ après l'invasion (Carruthers and Sibley, 1997).

IV. 2. 2. La vacuole parasitophore

a) Formation initiale

La formation de la vacuole parasitophore est initiée lors de l'invasion et permet de protéger et d'isoler le parasite. Elle ne fusionne pas avec les compartiments lysosomiaux et ne s'acidifie donc pas (Sibley, *et al.*, 1985). Pour éviter cette fusion, le parasite modifie la composition de la membrane de la vacuole parasitophore en excluant les molécules spécifiques de la membrane plasmique de la cellule hôte. Les mécanismes qui excluent ces molécules ne sont pas entièrement élucidés. Il semblerait que la jonction mobile servirait de barrière à la diffusion des molécules de la membrane de la cellule hôte dans la membrane de la vacuole (de Carvalho and de Souza, 1989). Dans les fibroblastes, la membrane de la vacuole parasitophore est ainsi dépourvue des protéines de surface (Sibley, 1993), et dans les macrophages, les molécules CMH de classe II, les récepteurs Fc et les marqueurs des compartiments lysosomiaux en sont également exclus (Mordue and Sibley, 1997).

Les lipides composant la membrane de la vacuole parasitophore seraient, d'une part, issus de la cellule hôte (Suss-Toby, *et al.*, 1996), et proviendraient, d'autre part, des sécrétions de rhoptries lors de l'invasion (Foussard, *et al.*, 1991). Le pourcentage élevé de

phosphatidylcholine et de cholestérol pourrait aussi être responsable de l'inhibition de fusion de la vacuole avec les compartiments lysosomiaux (Joiner, 1991).

b) Maturation

Les protéines des micronèmes, sécrétées dans la phase initiale de l'invasion et les protéines de rhoptries intervenant dans la biogenèse de la vacuole parasitophore sont ensuite rapidement dégradées et ne se retrouvent pas dans la vacuole mature (Dubremetz, *et al.*, 1993).

La vacuole parasitophore est structurellement modifiée par la sécrétion des protéines de **granules denses** et par la formation d'un réseau de tubules membranaires. Les protéines des granules denses sont sécrétées au niveau de la région antérieure du parasite, sous forme soluble, et sont ciblées à différents endroits de la vacuole parasitophore (Cesbron-Delauw, 1994 ;Dubremetz and Schwartzman, 1993). Les granules denses contiennent également les NTPases qui dégraderaient l'ATP de la cellule hôte dans la vacuole parasitophore (Sibley, *et al.*, 1994). La formation du **réseau de tubules membranaires** se fait par la sécrétion transitoire de vésicules aplaties multilamellaires au niveau de l'invagination postérieure du parasite. Le rôle de ce réseau n'est pas encore connu (Sibley, *et al.*, 1995).

IV. 2. 3. Multiplication des toxoplasmes

La multiplication extracellulaire du parasite n'a jamais été démontrée. Dès l'entrée du toxoplasme dans la cellule, celui-ci perd toute motilité et commence à se multiplier par **endodyogénie**. Ce mode de division s'apparente à une fission binaire au cours de laquelle les cellules filles se différencient complètement au sein du cytoplasme maternel avant de s'individualiser. Le complexe apical et la pellicule de la cellule mère restent intacts jusqu'à maturation complète des cellules filles. Le cycle cellulaire est synchrone au sein d'une vacuole et dure de 5 à 10 heures selon les souches parasitaires. Au cours de ce cycle, le noyau s'étrangle sans rupture de l'enveloppe nucléaire. Chaque duplication parasitaire s'accompagne également d'une duplication des rhoptries, de la mitochondrie et de l'apicoplaste. La vacuole parasitophore augmente de volume, conjointement avec la multiplication parasitaire, jusqu'à occuper tout le cytoplasme cellulaire (Pfefferkorn, 1986).

Les mécanismes intervenant pour la lyse des cellules hôtes et la sortie des parasites sont très mal connus. Le calcium permettrait une reprise de la motilité du parasite et induirait la sortie des toxoplasmes (Stommel, *et al.*, 1997). Les tachyzoïtes, fraîchement sortis des cellules lysées sont alors capables d'envahir les cellules avoisinantes.

IV. 2. 4. Les interactions entre la cellule hôte et le parasite

a) Interactions structurales

En plus de son rôle protecteur vis à vis du parasite, la vacuole parasitophore jouerait un rôle fondamental dans les échanges métaboliques entre le toxoplasme et la cellule hôte. Récemment, la diffusion de molécules de faible poids moléculaires (<1300 Da) de la cellule hôte vers la vacuole a été mise en évidence (Schwab, *et al.*, 1994).

L'observation ultrastructurale de la continuité de la membrane de la vacuole parasitophore et des tubules du réseau suggère que ces tubules sont en contact avec le cytoplasme de la cellule. Ce réseau pourrait donc augmenter la surface d'échange entre le parasite et la cellule hôte (Sibley, *et al.*, 1995).

La vacuole parasitophore est entourée par les mitochondries et le réticulum endoplasmique de la cellule hôte. La proximité de ces organites pourrait faciliter les échanges d'ATP et de nutriments de la cellule hôte vers le parasite. Les protéines sécrétées par le parasite et ciblées vers la membrane de la vacuole pourraient participer à l'ancrage de ces organites cellulaires à la surface de la vacuole parasitophore (Sinai, *et al.*, 1997).

b) Apports biochimiques de la cellule hôte

Les interactions ultrastructurales décrites entre le parasite et la cellule hôte doivent impliquer des échanges de nutriments afin de permettre le développement intracellulaire du parasite.

Jusqu'à présent, il n'a pu être démontré que *T. gondii* dépendait des précurseurs des **acides nucléiques** de la cellule hôte, ou de la synthèse des **protéines** cellulaires pour sa croissance. Alors que *P. berghei* et *E. tenella* sont incapables de synthétiser du cholestérol, on ignore si la cellule hôte est nécessaire pour la synthèse des lipides de *T. gondii* (Pfefferkorn, 1986). En revanche, la vacuole parasitophore est isolée des voies d'endocytose et d'exocytose de la cellule hôte, et aucun lipide ne peut parvenir au parasite par ces voies cellulaires

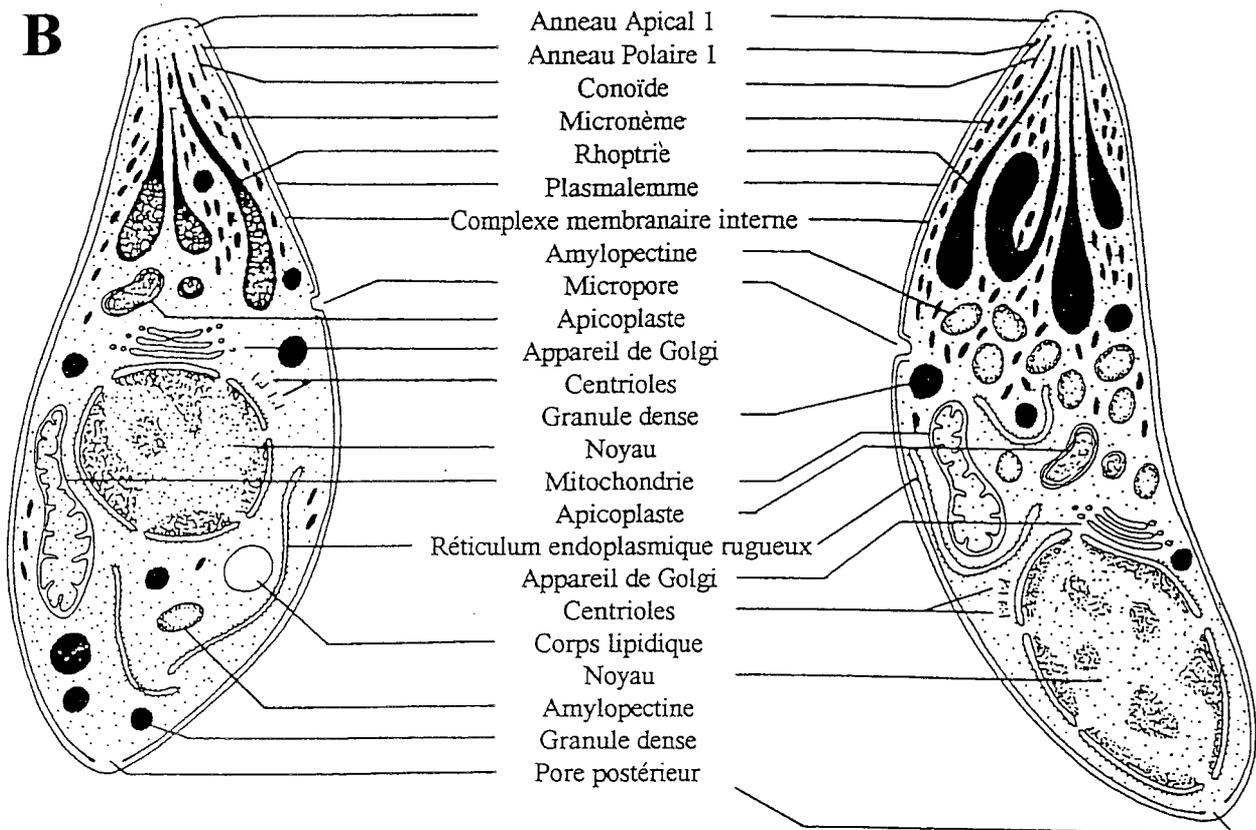


Figure 3: A: Morphologie ultrastructurale d'un bradyzoïte de *T. gondii* (d'après Yahiaoui *et al.*, 1999). M: micronèmes, N: noyau, GA: grains d'amylopectine, PK: paroi du kyste.

B: Comparaison de la structure d'un tachyzoïte (gauche) et d'un bradyzoïte (droite). Les schémas sont basés sur les observations en microscopie électronique. (d'après Dubey *et al.*, 1998).

(Mordue, *et al.*, 1999). De même, Mordue *et al.* ont démontré que les protéines issues de l'appareil de Golgi de la cellule hôte, ne parvenaient pas au compartiment parasitaire (Mordue, *et al.*, 1999).

Comme tous les parasites Protozoaires, *T. gondii* est incapable de faire la synthèse *de novo* des **purines**. Le métabolisme des purines étant indispensable à la survie des toxoplasmes, celles-ci doivent donc provenir de la cellule hôte. Des **NTPases**, localisées dans la vacuole parasitophore, seraient responsables de l'hydrolyse de l'ATP venant de la cellule hôte en adénosine monophosphate (Asai, *et al.*, 1995 ; Bermudes, *et al.*, 1994 ; Sibley, *et al.*, 1994). L'**adénosine kinase** transporterait ensuite l'adénosine dans le parasite (Schwab, *et al.*, 1995) et ce substrat servirait à la synthèse des purines dans le parasite. Une autre enzyme, l'**HXGPRT** interviendrait dans le métabolisme des purines en transformant l'hypoxanthine en inosine monophosphate (Pfefferkorn and Borotz, 1994). L'inosine monophosphate est finalement métabolisée en xanthine monophosphate puis en guanosine monophosphate (Krug, *et al.*, 1989).

Le métabolisme des **pyrimidines** est également décrit chez *T. gondii* (Iltzsch, 1993). L'uracil phosphoribosyltransférase (**UPRT**) est une enzyme de 27 kDa catalysant la conversion de l'uracil en uracil monophosphate. Cette enzyme n'est pas essentielle à la survie du parasite puisque ce dernier possède également les enzymes nécessaires à la synthèse *de novo* des pyrimidines (Carter, *et al.*, 1997).

IV. 3. Le bradyzoïte et le tachyzoïte : comparaison et différenciation

IV. 3. 1. Comparaisons entre les deux formes parasitaires

Au cours de l'infection, *T. gondii* est capable de passer du stade à multiplication rapide, le tachyzoïte, au stade quiescent, le bradyzoïte. Les tachyzoïtes présents durant la phase aiguë de la maladie se différencient alors en bradyzoïtes (figure 3-A) sous la pression de la réponse immunitaire.

a) Différences ultrastructurales et résistance aux endopeptidases

Les tachyzoïtes et les bradyzoïtes possèdent une structure cellulaire très semblable mais quelques différences existent entre les deux formes parasitaires (figure 3-B). Les bradyzoïtes

Protéine de surface	Poids moléculaire (kDa)	Tachyzoïtes	Bradyzoïtes
P18 (SAG4)	18	-	+
P21	21	-	+
P22 (SAG2)	22	+	-
P23	23	+	+
P30 (SAG1)	30	+	-
P34	34	-	+
P35	35	+	-
P36	36	-	+
P43 (SAG3)	43	+	+

Tableau 1: Expression des protéines de surface en fonction du stade parasitaire. Les protéines de surfaces (SAG, pour « Surface Antigen ») sont classées en fonction de leur poids moléculaire (exemple P18) ou en fonction de leur ordre de caractérisation moléculaire (exemple SAG4). Leur présence est symbolisée par un signe plus (+) alors qu'un signe moins (-) illustre leur absence de la surface du parasite.

sont plus petits, plus riches en micronèmes et en grains d'amylopectine qui est un polysaccharide de réserve. Leur noyau est en position plus postérieure. La partie distale de leurs rhoptries apparaît plus homogène et plus dense aux électrons alors qu'elle présente un aspect spongieux chez le tachyzoïte (Dubey, *et al.*, 1998).

Enfin, les bradyzoïtes sont résistants à la digestion par la trypsine et par la pepsine alors que les tachyzoïtes y sont sensibles (Dubey, 1998).

b) La vacuole parasitophore et la paroi kystique

Les bradyzoïtes modifient la vacuole parasitophore pour former la paroi kystique. Ils sont inclus dans un matériel granulaire compact et dense aux électrons. Les kystes constituent avec les oocystes, les formes de résistance du parasite. Ils restent viables après une exposition de 68 jours à 4°C mais sont sensibles à la décongélation et à la salaison ou à une température de 67°C pendant 3 minutes (Dupouy-Camet, *et al.*, 1993).

Les kystes ne sont jamais extracellulaires et par conséquent, des échanges avec la cellule hôte sont également nécessaires pour leur survie (Ferguson and Hutchison, 1987). De la même façon que les mitochondries de la cellule hôte entourent la vacuole parasitophore, il semblerait que ces organites restent en étroite association avec la paroi du kyste (Lindsay, *et al.*, 1993).

Par ailleurs, la paroi du kyste contient du N-acétylglucosamine probablement sous forme de chitine (Boothroyd, *et al.*, 1997).

c) Les protéines des deux formes parasitaires

De nombreux gènes de *T. gondii* sont clonés et séquencés. Ils codent pour des molécules de surface, des molécules de sécrétion ou pour des enzymes. Ces protéines peuvent être présentes dans plusieurs formes du parasite ou être spécifiquement exprimées dans un stade de développement.

Les protéines de surface

De nombreuses molécules de surface sont identifiées (tableau 1). Elles sont numérotées en fonction de la chronologie de leur caractérisation (exemple SAG1 pour antigène de surface 1) ou nommées en fonction de leur masse moléculaire (par exemple la protéine P30 de 30 kDa). Ces antigènes de surface subissent des modifications post-traductionnelles (Tomavo,

1996) et sont ancrées à la membrane plasmique par une structure glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) (Nagel and Boothroyd, 1989 ;Tomavo, *et al.*, 1989). Les protéines SAG1(P30), SAG2(P22) et P35 sont exclusivement exprimées chez les tachyzoïtes. Les protéines SAG3 (P43, proche de SAG1) et P23 sont retrouvées dans les deux formes parasitaires alors que les protéines P18, P21, P34 et P36 sont spécifiques des bradyzoïtes (Tomavo, *et al.*, 1991). Des anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques de ces protéines permettent de différencier les deux formes parasitaires (Couvreux, *et al.*, 1988 ;Tomavo, *et al.*, 1991).

Plus récemment, un gène situé en amont du gène SAG1 a été caractérisé (Hehl, *et al.*, 1997). Il code pour la protéine SRS1 (« SAG1-related sequence »), également proche de SAG1 et de SAG3 (Cesbron-Delauw, *et al.*, 1994) . Ces trois protéines forment la famille des protéines de surfaces liées à SAG1. Elles sont peu ou pas homologues au niveau de leur séquence primaire mais elles présentent une structure secondaire particulièrement conservée. Depuis d'autres gènes codant pour des protéines SRS ont été trouvés parmi les séquences EST de tachyzoïtes (Manger, *et al.*, 1998a ;Manger, *et al.*, 1998b). Cette famille de protéines compterait près de dix membres dont la protéine P36, BSR4, (Knoll and Boothroyd, 1998).

La redondance des protéines de surface impliquées dans l'attachement et l'invasion (Boothroyd, *et al.*, 1998) pourrait expliquer que des mutants chimiques pour le gène SAG1, n'exprimant plus la protéine SAG1 ne présentent pas de phénotype prononcé pour l'attachement et l'invasion des cellules hôtes (Kasper, 1987 ;Kasper, *et al.*, 1992 ;Kim and Boothroyd, 1995). En revanche, l'anticorps anti-SAG1 pourrait être capable d'inhiber plusieurs protéines dont la structure est proche et donc d'inhiber l'invasion des cellules hôtes par le toxoplasme (Mineo, *et al.*, 1993). Un mutant nul SAG3⁻ a été obtenu par double recombinaison homologue. Ce mutant n'exprimant plus la protéine SAG3 présente une réduction de 40% à 60% dans sa capacité à envahir *in vitro* les cellules hôtes ainsi qu'une diminution de sa virulence *in vivo* (Tomavo, 1996).

Les enzymes

Un certain nombre d'enzymes spécifiques du toxoplasme sont caractérisées. Elles sont importantes pour élucider les différents métabolismes intrinsèques au toxoplasme mais peuvent également être la cible d'agents chimiothérapeutiques. C'est le cas pour la dihydrofolate réductase (DHFR) et de la dihydroptéroate synthétase, enzymes impliquées dans la synthèse des folates et respectivement inhibée par la pyriméthamine et la sulfadiazine (Pashley, *et al.*,

1997 ;Roos, 1993). La phosphofructokinase est également spécifique au toxoplasme puisqu'elle dépend de pyrophosphate et non de l'ATP comme chez les Mammifères (Denton, *et al.*, 1996a).

La superoxyde-dismutase (SOD) et la catalase isolées de tachyzoïtes interviendraient dans la survie du parasite à l'intérieur de la vacuole parasitophore, en neutralisant les radicaux libres produits par les macrophages (Sibley, *et al.*, 1986). Récemment, le gène codant pour la SOD à fer a été caractérisé. Sa transcription ainsi que sa traduction en une protéine de 22,6 kDa a été mise en évidence chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes (Ödberg-Ferragut, *et al.*, 1999).

Les enzymes décrites précédemment et intervenant dans les métabolismes des purines et des pyrimidines sont également caractérisées chez les tachyzoïtes.

Des isoformes de la lactate deshydrogénase (LDH) interviendraient spécifiquement chez les tachyzoïtes ou chez les bradyzoïtes. La protéine LDH1 est exprimée spécifiquement chez les tachyzoïtes et présente 71% d'identité avec la protéine LDH2 spécifique des bradyzoïtes (Yang and Parmley, 1995 ;Yang and Parmley, 1997).

Les autres protéines

A l'exception de la protéine GRA4 et des NTPases, les autres protéines des granules denses sont communes aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes. Elles sont présentes dans le kyste avec une topologie similaire à celle observée dans la vacuole parasitophore (Cesbron-Delauw, 1994).

Les protéines de choc thermique Hsp30 (BAG1 ou BAG5, (Bohne, *et al.*, 1995 ;Parmley, *et al.*, 1995), et Hsp70 (Weiss, *et al.*, 1998) sont spécifiquement exprimées chez les bradyzoïtes. Elles seraient synthétisées en réponse au stress induisant la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte.

La protéine MAG1 de 65 kDa (Parmley, *et al.*, 1994), ainsi qu'une protéine de 116 kDa (Weiss, *et al.*, 1992) et une de 29 kDa (Zhang and Smith, 1995) ont été identifiées dans la paroi kystique. La protéine MAG1, de fonction inconnue est abondante dans la matrice.

e) Croissance parasitaire

La croissance parasitaire est active chez les tachyzoïtes, avec un cycle de 5 à 10 heures selon les souches de *T. gondii* (Fortier and Dubremetz, 1993 ;Pfefferkorn, 1986).

Contrairement aux tachyzoïtes, les bradyzoïtes se divisent lentement. Les kystes, de forme sphérique de 5 à 50 µm de diamètre, peuvent renfermer plusieurs centaines ou milliers de bradyzoïtes (Ferguson and Hutchison, 1987 ;Fortier and Dubremetz, 1993). Ils apparaissent dans le cerveau environ deux semaines après le début de l'infection et sont maintenus pendant plusieurs semaines. Leur taille augmente jusqu'à la quatorzième ou quinzième semaine après l'infection. Après six mois d'infestation, il devient extrêmement rare de trouver des bradyzoïtes en cours de division. Pavesio *et al.* (Pavesio, *et al.*, 1992) ont observé l'existence de bradyzoïtes dégénérés au sein de certains kystes âgés.

IV. 3. 2. La différenciation parasitaire

Les facteurs qui déterminent le passage du stade prolifératif tachyzoïte au stade bradyzoïte enkysté et réciproquement ne sont pas complètement connus.

a) Souches virulentes et kystogènes

Les souches de toxoplasmes peuvent être classées en deux catégories : les souches virulentes et les souches avirulentes ou kystogènes. Cette classification est basée sur leur capacité à tuer les souris après infection par des tachyzoïtes injectés de façon intrapéritonéale. Une souche de toxoplasme est dite **virulente** lorsqu'elle montre une DL100 avec un seul tachyzoïte et la mort survient après 6 à 10 jours. Ces souches, dont la souche RH, se multiplient plus rapidement et la formation spontanée de kystes est rare. Les souches **avirulentes** ont une valeur de DL50 supérieure ou égale à 10² parasites, et provoquent la mort de la souris après 10 à 20 jours (Howe, *et al.*, 1996). Ces souches avirulentes (souches CEP, PLK, 76K, etc) ont une croissance ralentie, forment spontanément des kystes *in vitro* et s'enkystent *in vivo* pour s'installer dans la phase chronique de la toxoplasmose.

Une bonne corrélation entre la virulence et le profil **RFLP** (« Restriction Fragment Length Polymorphism ») des souches est également observée (Sibley and Boothroyd, 1992b ;Sibley, *et al.*, 1992). De même, la comparaison des régions 3' du gène **SAG1** démontre un polymorphisme entre les souches virulentes et avirulentes (Rinder, *et al.*, 1995 ;Windeck and Gross, 1996). Howe et Sibley (Howe and Sibley, 1994 ;Howe and Sibley, 1995) proposèrent une classification des souches parasitaires tenant compte à la fois de la virulence et du polymorphisme de restriction de *T. gondii*. Les souches de **type 1** (RH, P) sont très virulentes

pour la souris. Elles se retrouvent plus souvent dans les toxoplasmoses congénitales que dans les toxoplasmoses chroniques. Les souches de type I semblent être clonales (Sibley and Boothroyd, 1992b). Les souches de type 2 et 3 qui sont avirulentes, s'enkystent rapidement et sont responsables de pathologies chroniques chez la souris. Alors que les souches de **type 2** (ME49, Pruniaux, 76K) sont souvent associées aux toxoplasmoses humaines, les souches de **type 3** (CEP, NED) infectent rarement l'Homme et sont retrouvées le plus souvent chez l'animal.

b) La différenciation du tachyzoïte en bradyzoïte

Les tachyzoïtes réduisent leur répllication avant de se différencier en bradyzoïtes (Bohne, *et al.*, 1994 ;Soète, *et al.*, 1994). Les études *in vitro* ont démontré que les facteurs immunologiques n'étaient pas nécessaires à la différenciation. L'enkystement des tachyzoïtes peut en effet être induit *in vitro* par de nombreux agents chimiques et physiques tels qu'un pH basique (pH8-8.5, (Soète, *et al.*, 1994)), une élévation de la température (43°C, (Soète, *et al.*, 1994)), ou des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale (Bohne, *et al.*, 1994 ;Tomavo and Boothroyd, 1995). Bohne *et al.* démontrèrent que l'IFN- γ serait capable d'induire la différenciation *via* l'oxyde nitrique (Bohne, *et al.*, 1994 ;Bohne, *et al.*, 1993).

La différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes est un phénomène progressif qui aboutit à la formation d'un kyste mature. L'induction de la différenciation de tachyzoïtes de la souche PLK, en milieu alcalin, montre que les protéines de bradyzoïtes P36 et P18 ainsi que la protéine de 116 kDa de la paroi kystique apparaissent au bout de 24 h. L'antigène majeur de surface des tachyzoïtes, la protéine SAG1, ne disparaît qu'au bout de 4 jours. Les intermédiaires de la différenciation portent donc des marqueurs spécifiques de chacun des stades. Après 7 jours, la protéine P21 apparaît, les micronèmes et les grains d'amylopectine commencent à s'accumuler. La protéine P21 est utilisée comme marqueur des kystes matures. La paroi kystique se forme bien avant la fin de la différenciation en bradyzoïtes. La vacuole parasitophore s'altère 24h après l'induction de la différenciation, le réseau de tubules membranaires se désorganise, les protéines GRA se redistribuent au sein du kyste et du matériel dense s'accumule dans la vacuole (Soète and Dubremetz, 1996).

La souche virulente RH est par contre incapable de former des kystes matures *in vitro*. La protéine P21 n'est jamais détectée, les micronèmes et les grains d'amylopectine sont nettement moins nombreux au bout de 7 jours, et des tachyzoïtes en division sont toujours

présents. *In vivo*, la souche RH est quasiment incapable de former des kystes spontanément (Soète, *et al.*, 1994).

c) La différenciation du bradyzoïte en tachyzoïte

La différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes a lieu spontanément dans les conditions normales de culture *in vitro* sur des cellules Véro. La différenciation, observée par l'apparition de la protéine SAG1, a lieu avant la division parasitaire : l'antigène SAG1 apparaît dès 15h après la remise en culture de bradyzoïtes alors que la division parasitaire commence au bout de 24h. A nouveau des stades intermédiaires portant des marqueurs spécifiques des bradyzoïtes et des tachyzoïtes sont présents avant la différenciation complète en tachyzoïtes. La cinétique de conversion des bradyzoïtes en tachyzoïtes est très rapide et ne peut être étudiée au delà de 48h en raison de la lyse cellulaire par la multiplication active des tachyzoïtes nouvellement différenciés (Soète, *et al.*, 1993).

IV. 4. La génétique du toxoplasme

IV. 4. 1. Le génome

a) L'ADN

Le toxoplasme présente un cycle de vie complexe comprenant des stades diploïdes et haploïdes. Une mitose et une méiose ont lieu lors de la sporulation des oocystes. Les stades infestants, sporozoïtes, tachyzoïtes et bradyzoïtes sont **haploïdes**. Ils se divisent par mitose classique bien que les chromosomes ne condensent pas en métaphase et que la membrane nucléaire reste intacte (Pfefferkorn, 1986).

Le génome haploïde de *T. gondii* est estimé à 8×10^7 pb, réparti en 11 chromosomes qui sont séparés par électrophorèse en champ pulsé (Sibley and Boothroyd, 1992a). La taille des chromosomes varie de 2 à 8 méga-paires de bases. La plupart des gènes étudiés sont présents sous forme de **copie unique** dans le noyau. Seuls quelques gènes existent sous forme répétée tels que le gène B1 (répété 35 fois, (Burg, *et al.*, 1989)), la séquence TGR1E (Cristina, *et al.*, 1991) et l'unité de transcription codant pour l'ARN ribosomal 26S, 18S et 5S (répété 100 fois, (Ellis, *et al.*, 1995 ;Guay, *et al.*, 1992)). Ces gènes sont utilisés pour le diagnostic par PCR de la toxoplasmose. L'hybridation de différentes sondes sur les chromosomes ou sur

l'ADN génomique digéré par diverses enzymes de restriction permet d'établir une carte physique du toxoplasme (Sibley, *et al.*, 1992). Bien que le génome du toxoplasme ne soit pas encore entièrement séquencé, l'exploitation des séquences Tag (« Expressed Sequence Tag », EST) exprimées dans les stades tachyzoïtes et bradyzoïtes devrait permettre d'identifier un grand nombre de gènes du parasite (Ajioka, *et al.*, 1998 ;Manger, *et al.*, 1998a ;Wan, *et al.*, 1996).

Une activité ADN polymérase présentant certaines propriétés physico-chimiques communes avec l'ADN polymérase α de Mammifères fut identifiée (Makioka, *et al.*, 1993). Son activité, serait liée à la virulence des souches en favorisant une multiplication plus rapide des souches virulentes (Makioka and Ohtomo, 1995).

b) L'ARN

Depuis longtemps, il a été démontré que les tachyzoïtes possèdent les enzymes nécessaires à la synthèse de l'ARN et en particulier l'uridine phosphorylase, permettant l'incorporation spécifique de l'uridine dans les acides nucléiques parasitaires (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1977a). Certains gènes contiennent des introns (TUB1, TUB2, DHFR, GRA2) dont les sites donneur et accepteur d'épissage semblent suivre le consensus ag/GT...cAG/gx (Mercier, *et al.*, 1993 ;Nagel and Boothroyd, 1988 ;Roos, 1993). La maturation des transcrits et la traduction des ARN messagers peuvent se faire *in vitro*, ce qui suggère des mécanismes communs à tous les eucaryotes (Johnson, *et al.*, 1986 ;Nagel and Boothroyd, 1988).

IV. 4. 2. Manipulations génétiques du toxoplasme

Le développement de la transfection de *T. gondii* par électroporation a constitué un outil important dans l'étude des aspects moléculaires de nombreuses fonctions biologiques du toxoplasme.

La **transfection transitoire** a notamment permis l'étude des régions promotrices des gènes SAG1 (Soldati and Boothroyd, 1995) et des gènes GRA1, GRA2, GRA5 et GRA6 (Mercier, *et al.*, 1996). L'expression des protéines SAG1 et ROP1 couplées à la protéine fluorescente GFP (« Green Fluorescent Protein ») a été utilisée pour suivre la maturation et la localisation de ces protéines et pour appréhender les mécanismes de sécrétion chez *T. gondii* (Striepen, *et al.*, 1998).

La **transfection stable** aboutit majoritairement à l'intégration aléatoire d'ADN exogène dans le génome de *T. gondii*. Cette caractéristique, propre au toxoplasme, a permis, par **mutagenèse insertionnelle**, d'identifier les gènes non essentiels codant pour les enzymes UPRT (Donald and Roos, 1995) et HXGPRT (Donald, *et al.*, 1996). Ce gène HXGPRT peut être utilisé comme marqueur de sélection et présente l'avantage d'être sélectionné positivement ou négativement. Son insertion aléatoire dans le génome du toxoplasme, associée à la différenciation *in vitro* des tachyzoïtes en bradyzoïtes, a conduit à l'identification du gène codant pour la protéine de surface P36 (BSR4) spécifique des bradyzoïtes (Knoll and Boothroyd, 1998).

De plus, la création de mutants nuls par **recombinaison homologue** a permis de caractériser les phénotypes de mutants dépourvus de protéines telles que ROP1 (Soldati, *et al.*, 1995) et BAG1 (Zhang, *et al.*, 1999). Bien que de nouvelles techniques (« REMI » (Black, *et al.*, 1995)), « hit and run » (Donald and Roos, 1998) permettent d'augmenter la fréquence de recombinaison homologue, l'inactivation des gènes n'est possible que pour les gènes non essentiels. Pour les gènes essentiels, comme celui codant pour la NTPase, la synthèse *in vivo* d'un **ARN anti-sens** a permis d'observer une réduction drastique de la multiplication des tachyzoïtes démontrant que l'enzyme NTPase est essentielle pour la croissance parasitaire (Nakaar, *et al.*, 1999).

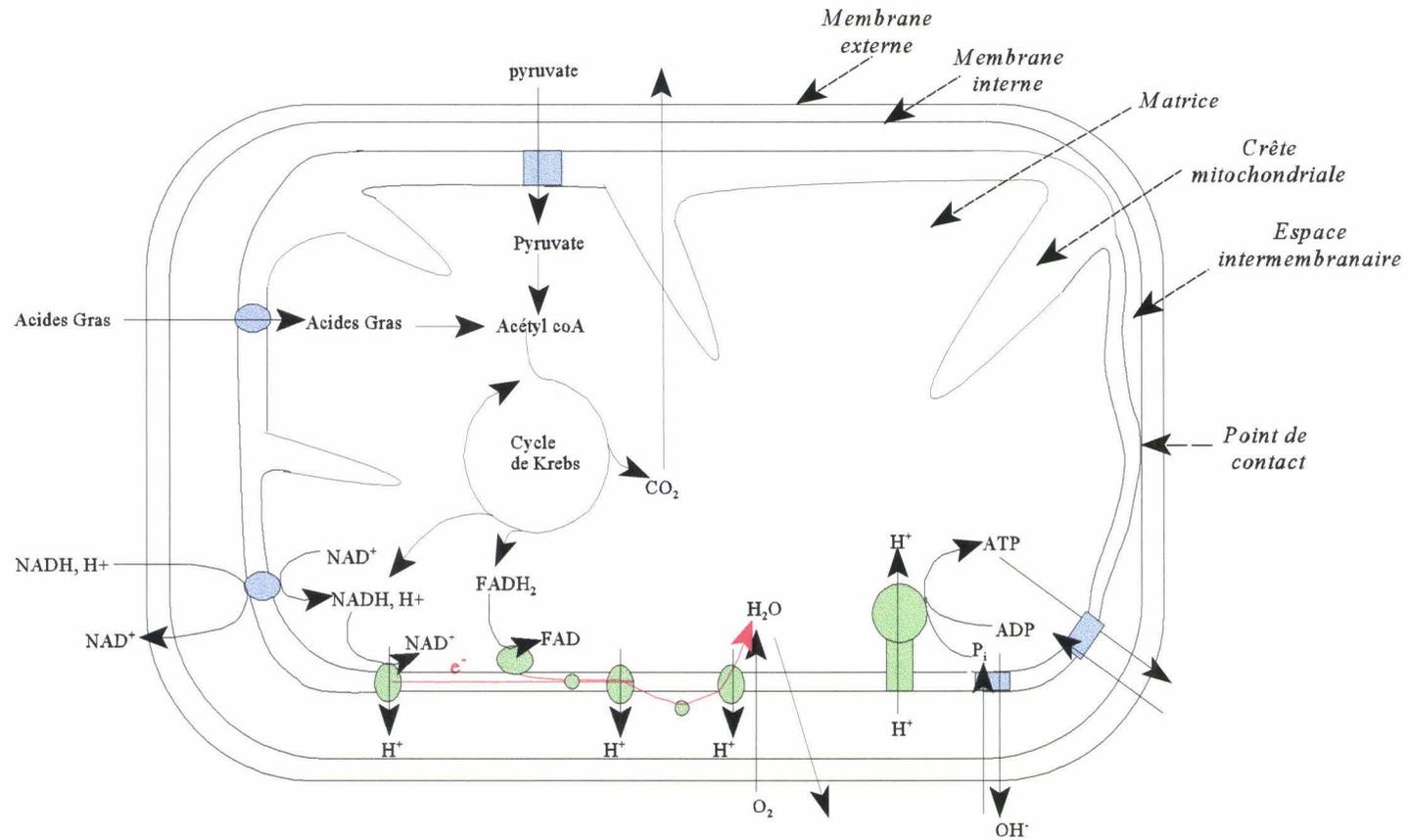


Figure 4: Schéma de la structure de la mitochondrie. La synthèse aérobie de l'ATP est précisée. Le transfert d'électrons figure en rouge et la chaîne respiratoire en vert. Les différents systèmes pour transporter les molécules sont symbolisés en bleu.

Chapitre II. La mitochondrie

La mitochondrie est un organite cellulaire présent chez tous les eucaryotes et spécialisé dans la conversion d'énergie des réactions d'oxydation en une forme plus utilisable : l'ATP, par des mécanismes de transfert d'électrons. De son origine symbiotique entre un eucaryote primitif et un procaryote aérobic il y a plus d'un milliard d'années, elle conserve une structure particulière, un génome restreint qui nécessite à la fois de nombreux échanges avec le noyau cellulaire ainsi qu'un système d'importation de protéines extrêmement développé.

I. Structure, génétique et fonctions de la mitochondrie

I. 1. La structure de la mitochondrie

Les mitochondries sont de petits cylindres rigides et allongés de 0,5 à 1 μm de diamètre, très mobiles et changeant constamment de forme. Leur nombre varie à la fois entre les organismes et entre les différentes cellules d'un organisme pluricellulaire. La mitochondrie comporte deux membranes (figure 4) : la **membrane externe** et la **membrane interne** qui délimitent l'**espace intermembranaire** situé entre les deux membranes et la **matrice**, ou compartiment central. La **membrane externe** est perméable aux molécules de taille inférieure à 10 000 Da grâce à une porine mitochondriale qui constitue un canal à travers la double couche lipidique. Les autres protéines de cette membrane sont impliquées dans la synthèse mitochondriale des lipides et servent à convertir des substrats lipidiques qui seront ensuite métabolisés dans la matrice. L'**espace intermembranaire** est équivalent au cytosol pour sa composition ionique. Il contient également plusieurs enzymes qui utilisent l'ATP, exporté de la matrice, pour phosphoryler d'autres nucléotides. La particularité morphologique de la mitochondrie est liée à une **membrane interne** très développée, formant des crêtes invaginées dans la matrice. Cette membrane, dépourvue de cholestérol, comporte une proportion très élevée de cardiolipides, ce qui la rendrait particulièrement imperméable aux ions. Sa composition protéique en fait également une membrane très spécialisée. Elle contient en effet,

les protéines de la chaîne respiratoire (ou chaîne de transport d'électrons), le complexe enzymatique qui fabrique l'ATP dans la matrice (ATP synthétase), et de nombreuses protéines de transports impliquées dans l'entrée et la sortie d'ions inorganiques et de métabolites. La **matrice** contient les enzymes nécessaires à l'oxydation du pyruvate, des acides gras et au cycle de l'acide citrique. Elle renferme également plusieurs copies de l'ADN mitochondrial (ADNmt), des ribosomes mitochondriaux, des ARNt ainsi que diverses enzymes impliquées dans l'expression des gènes mitochondriaux.

I. 2. Génétique mitochondriale

Il est maintenant admis que la mitochondrie dérive d'un seul événement d'endosymbiose entre une α -protéobactérie et un eucaryote primitif (Gray, 1992). La co-évolution des deux partenaires n'est possible que par l'établissement d'**échanges** entre l'hôte et l'endosymbionte (Poyton, 1996). Une des conséquences majeures de cette co-évolution, est **l'évolution régressive du génome de l'endosymbionte**. Les gènes devenus non essentiels pour l'endosymbionte ainsi que les gènes redondants de par leur présence sur le génome de l'hôte sont en effet perdus. D'autres gènes, initialement sur le génome de l'endosymbionte sont également transférés sur le génome de l'hôte (Gray, 1992).

a) La diversité des génomes

Depuis leur origine monophylétique, les génomes mitochondriaux ont extrêmement évolué. Ils sont de taille très variable (de 6 kb chez *Plasmodium falciparum* jusqu'à 2 400 kb pour *Cucumis melo*) et peuvent être circulaires ou linéaires. Leur rôle est fondamental puisqu'ils codent tous pour deux protéines de la chaîne respiratoire (cox1 et cytb) et pour les ARNr de la petite et de la grande sous-unité ribosomiales (LSU ARNr et SSU ARNr). En fonction des organismes, des gènes supplémentaires pour la chaîne respiratoire ou pour le système de traduction sont localisés sur l'ADNmt. Ainsi, les ARNt peuvent être codés sur l'ADNmt, comme chez l'Homme, ou entièrement codés sur l'ADN nucléaire avant d'être importés dans la mitochondrie, comme chez *Trypanosoma brucei*.

Le code génétique mitochondrial est le seul exemple de **déviations du code génétique universel**. Les règles d'appariement codon-anticodon sont en effet moins rigides, ce qui

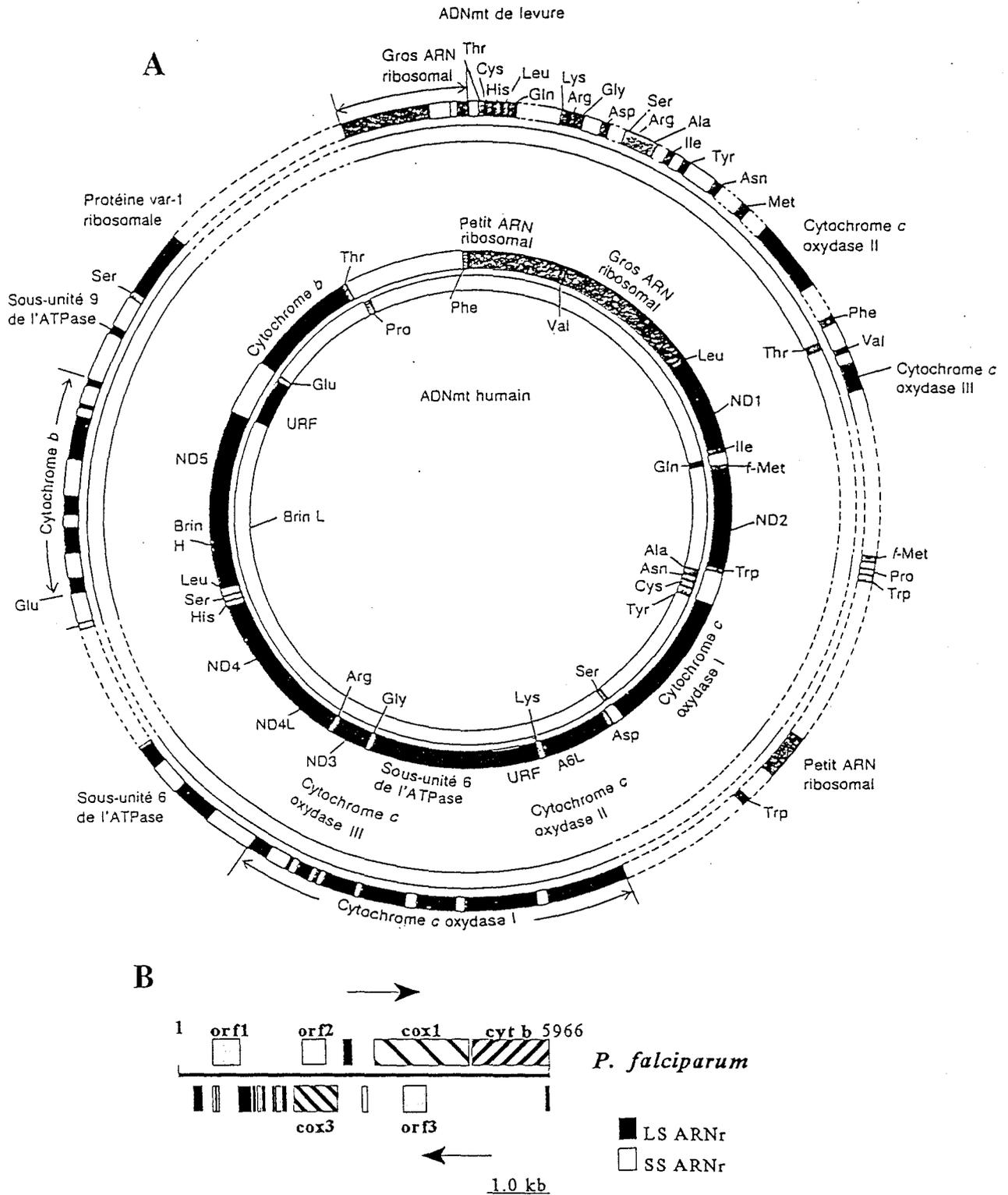


Figure 5 : Organisation de l'ADNmt humain (A, à l'intérieur), de l'ADNmt de la levure (A, à l'extérieur) et de l'ADNmt de *P. falciparum* (B). Les séquences entières de l'ADNmt humain et de *P. falciparum* sont connues. Pour la levure, le schéma est basé sur des connaissances partielles de la séquence. L'ADNmt de *P. falciparum* comprend 6 kb et forme des unités linéaires répétées en tandem. Les ADNmt humain (16,5 kb) et de levure (environ 80 kb) sont circulaires. (A: d'après Alberts, 1994. B: d'après Vaidya *et al.*, 1993).

permet aux ARNt de s'apparier avec plusieurs codons, indépendamment du troisième nucléotide. Les codes génétiques mitochondriaux varient selon les organismes.

b) L'organisation des génomes

Tous les extrêmes de l'organisation génomique sont rencontrés. La figure 5 rassemble les ADNmt de l'Homme, de la levure et du protozoaire responsable de la malaria: *P.falciparum*.

Les animaux, possèdent des génomes de petite taille, avec peu ou pas de nucléotides non codants, et évoluant très rapidement par un taux de mutations élevé (Anderson, *et al.*, 1981).

Les ADNmt des champignons sont circulaires, de taille variable et possèdent de nombreuses séquences intergéniques non codantes. Certains introns codent pour des maturases nécessaires à leur propre excision. Enfin, lors de l'évolution, les ADNmt de levures sont soumis à de nombreux réarrangements par recombinaisons.

Chez les plantes, seul l'ADNmt des Angiospermes est décrit. L'ADNmt est grand, et possède de nombreuses séquences intergéniques non codantes. La présence du gène codant pour un ARNr (ARNr 5S) lui est spécifique. Le taux de mutation est très faible mais l'organisation génomique diverge en raison de nombreux réarrangements. Enfin, ils peuvent insérer des fragments d'ADN plastidial ou nucléaire (Stern and Lonsdale, 1982).

Les protistes ou les eucaryotes unicellulaires anciens présentent une grande diversité de leur génome mitochondrial. Par exemple, le phylum des Zoomastigotes possède un ADNmt complexe formé d'un réseau de molécules circulaires. Les « maxicercles » sont l'équivalent de l'ADNmt des autres eucaryotes. Néanmoins, les séquences des gènes sont difficilement identifiables (cryptogènes) car le transcrit subit l'ajout ou la délétion de nombreuses molécules d'uridine avant d'être traduit (processus « d'editing »).

I. 3. Fonctions de la mitochondrie

La mitochondrie est considérée comme un organite intracellulaire spécialisé dans la **synthèse aérobie de l'ATP**, par oxydation des acides gras et du pyruvate. Le pyruvate, issu de la glycolyse cytoplasmique, et les acides gras sont transportés dans la matrice où ils sont scindés pour former l'acétyl CoA. Ce groupement acétyle alimente alors le cycle de l'acide

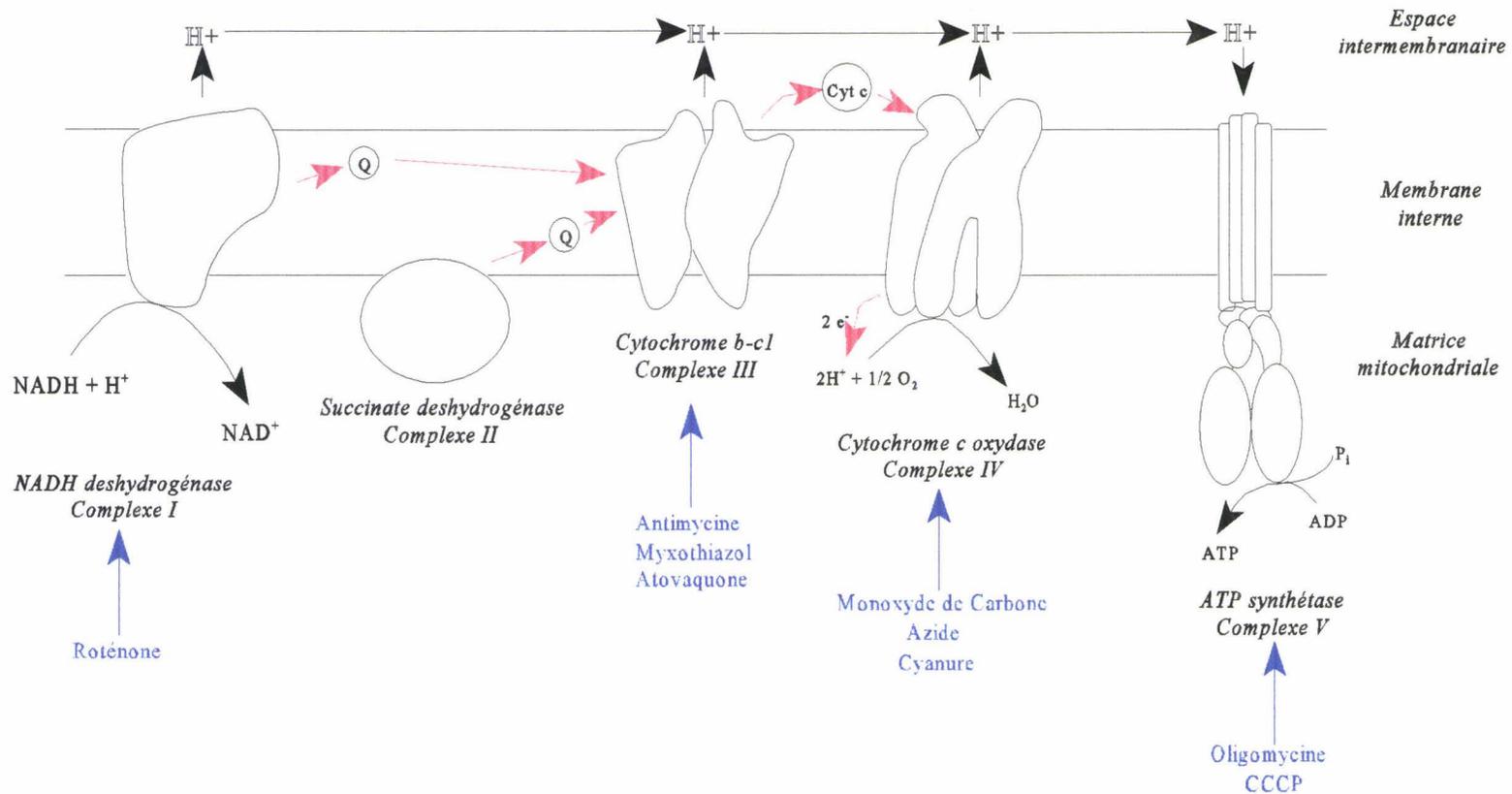


Figure 6: Chaîne de transport d'électrons et synthèse d'ATP dans la mitochondrie des eucaryotes. La chaîne de transport d'électrons située dans la membrane interne consiste en différents complexes (I à IV) liés par des transporteurs mobiles d'électrons (ubiquinone Q et cytochrome c). Lors du passage des électrons, les complexes I, III et IV transfèrent des protons dans l'espace intermembranaire. Un gradient électrochimique de protons se crée et active le complexe V capable de synthétiser l'ATP dans la matrice mitochondriale. Le transfert des électrons est représenté en rouge. Quelques inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont indiqués en bleu.

citrique ou le **cycle de Krebs** pour y être dégradé. Les électrons à haute énergie dérivés des diverses oxydations sont portés par le NADH, H^+ et le $FADH_2$ et passent dans la **chaîne respiratoire** (figure 6) (Alberts, 1994). En plus de ce métabolisme oxydatif, la mitochondrie est le siège de nombreuses étapes des métabolismes cellulaires des glucides, des lipides et des acides aminés (Weil, 1987). Elle intervient notamment dans la synthèse de l'urée, de l'hème, des phospholipides et des acides nucléiques. De plus, grâce à l'imperméabilité et aux transporteurs spécifiques de sa membrane interne, elle permet de réguler la concentration intracellulaire du calcium en servant de réservoir. Enfin, elle aurait un rôle dans le contrôle de l'apoptose ou mort cellulaire programmée (Kroemer, *et al.*, 1998 ;Mignotte and Vayssiere, 1998).

II. La chaîne respiratoire et le complexe *b-c1*

II. 1. La chaîne respiratoire

II. 1. 1. La chaîne de transport d'électrons

Les électrons à haute énergie issus des hydrogènes du NADH, H^+ et du $FADH_2$ sont transmis à la chaîne respiratoire par l'intermédiaire de la NADH déshydrogénase (complexe I) pour le $NADH+H^+$ ou par la succinate déshydrogénase (complexe II) auquel le $FADH_2$ est lié. A partir des complexes I ou II, les électrons passent de l'ubiquinone (coenzyme Q_{10}) soluble dans la membrane interne, au complexe III (ou complexe *b-c1*). Le cytochrome c, situé dans l'espace intermembranaire, transmet les électrons du complexe III au complexe IV (cytochrome c oxydase) où ils sont finalement transférés à l'oxygène (figure 6).

II. 1. 2. Le gradient électrochimique de protons

L'énergie libérée au cours du passage de ces électrons d'un transporteur au suivant est utilisée pour pomper des protons à travers la membrane interne. Seuls les complexes I, III et IV sont des « pompes à protons » capables de transférer des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce mouvement de protons a deux conséquences:

- Il crée tout d'abord un **gradient de pH** à travers la mitochondrie. La matrice, moins riche en protons est alors plus basique que l'espace intermembranaire, dont le pH est identique à celui du cytosol en raison de la perméabilité de la membrane externe.

- Il engendre un **potentiel de membrane** à travers la membrane interne de la mitochondrie. L'intérieur de la membrane interne devient négatif et l'extérieur devient positif consécutivement au flux sortant d'ions positifs.

Le gradient de pH attire les protons vers la matrice et en expulse les OH^- accentuant l'effet du potentiel de membrane qui attire tout ion positif dans la matrice et en expulse tout ion négatif. La résultante du gradient de pH et du potentiel de membrane constitue un **gradient électrochimique de protons**.

II. 1. 3. La synthèse d'ATP

Le gradient électrochimique de protons ainsi créé par les trois complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire permet le reflux des protons vers la matrice en passant par l'ATP synthétase. Ce complexe protéique (complexe V) est alors activé et catalyse la conversion de l'ADP et du P_i en ATP, en utilisant l'énergie du flux protonique.

L'ATP synthétase est un complexe enzymatique réversible. Il peut également utiliser l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP afin de pomper des protons vers l'espace intermembranaire lorsque le gradient électrochimique de protons est insuffisant.

Chaque étape de la chaîne de transport d'électrons et de la synthèse d'ATP peut être spécifiquement inhibée (figure 6).

II. 1. 4. Gradient électrochimique de protons, production d'ATP et transport de molécules

Seuls l'oxygène, l'eau et le dioxyde de carbone diffusent librement à travers la membrane interne (figure 4). Les autres substrats ou produits des réactions mitochondriales sont transportés sous forme chargée à travers cette membrane imperméable. Pour la majorité des métabolites, l'énergie provient du co-transport d'une autre molécule dans le sens décroissant de son gradient électrochimique (antiport ADP/ ATP, antiport P_i / OH^-). Le gradient électrochimique de protons permet de coupler, par un système de symport, le flux

entrant de protons aux flux entrant de pyruvate et de calcium. Enfin, un système de navette transfère les électrons du NADH, H⁺ cytosolique à la chaîne de transport des électrons (LaNoue and Schoolwerth, 1979).

II. 2. Le complexe *b-c1* et le cytochrome b

Le complexe III ou complexe *b-c1* ou ubiquinol-cytochrome c réductase est un complexe protéique localisé dans la membrane plasmique de nombreux procaryotes ou dans la membrane interne mitochondriale (Trumpower, 1990a). C'est un **composant obligatoire** de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est constitutif chez la plupart des eucaryotes, sauf chez *S. cerevisiae* où l'expression des protéines de la chaîne respiratoire est réprimée en présence de glucose et en anaérobie (Attardi and Schatz, 1988 ; Poyton, 1996). Chez *T. brucei* et *L. tarentolae*, le complexe *b-c1* est fonctionnel dans le stade procyclique chez l'insecte vecteur, et est absent des formes sanguines (Priest and Hajduk, 1994). Les mécanismes de répression dans ces formes sanguines ne sont pas élucidés.

II. 2. 1. Structure et fonction du complexe *b-c1*

a) Structure du complexe *b-c1*

Le complexe *b-c1* est actif sous la forme de dimère. Trois protéines, le cytochrome b (cyt b), le cytochrome c1 (cyt c1) et la protéine de Rieske contenant quatre groupement prosthétiques sont universellement présents dans les complexes *b-c1*. Le complexe *b-c1* mitochondrial se différencie du complexe *b-c1* des procaryotes par la présence d'au moins six polypeptides supplémentaires ou « surnuméraires ». **Les protéines « surnuméraires »** sont hydrophiles et localisées de façon asymétrique dans le complexe *b-c1*. Chez les plantes, des sous-unités du complexe *b-c1* ont une activité peptidase intervenant pour la maturation des protéines importées dans la mitochondrie (Glaser, *et al.*, 1994). Les polypeptides « surnuméraires » ne possèdent pas de groupement prosthétiques capables d'oxydo-réduction, et n'interviennent pas dans le transfert d'électrons. Des mutants nuls pour l'une des six protéines « surnuméraires » de *N. crassa* ou de *S. cerevisiae* présentent des troubles dans l'assemblage, la stabilité ou l'activité catalytique du complexe *b-c1* (Trumpower, 1990a). Le

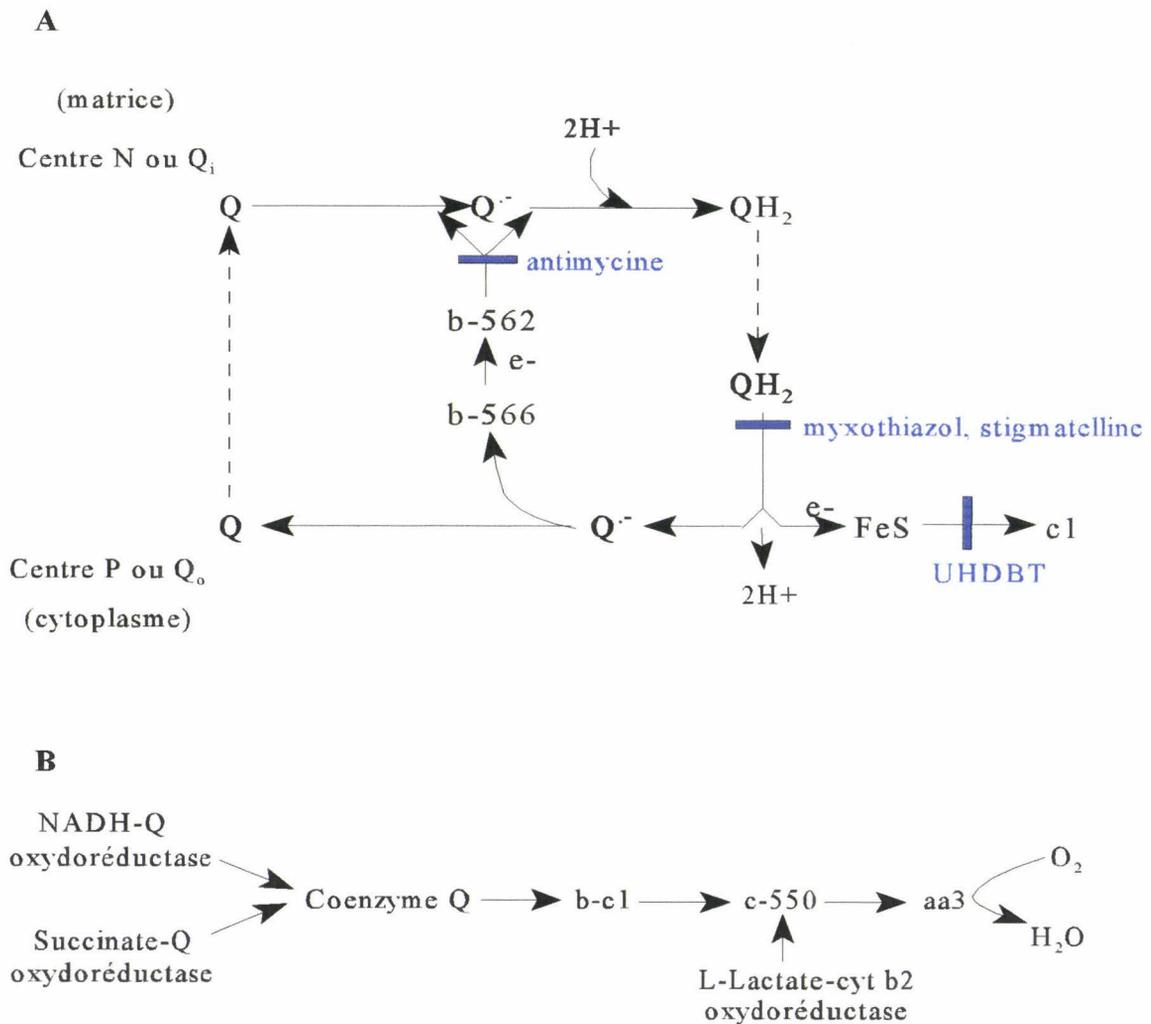


Figure 7: Mécanisme du cycle Q (A) et voie alternative d'ubiquinol oxydase (B). Le transfert des électrons dans le complexe *b-c1* est schématisé en A. Les sites d'actions des différents inhibiteurs sont précisés en bleu. En B, la L-lactate-cyt b2 oxydoréductase permet de contourner la voie du complexe *b-c1* chez *S. cerevisiae* (d'après Trumpower, 1990a). QH_2 , ubiquinol. Q, ubiquinone. $Q^{\bullet-}$, anion ubisemiquinone. FeS, protéine de Rieske. c1, cytochrome c1. b-566 et b-562, hèmes b-566 et b-562 du cytochrome b. aa3, cytochrome c oxydase.

cyt b est une protéine hydrophobe membranaire de 38 à 48 kDa formé de huit hélices α transmembranaires. Deux hèmes (**b-566** et **b-562**) sont liés de façon non covalente par des résidus histidines conservés sur les hélices deux et quatre. L'hème b-562 est près du centre de la bicouche lipidique (**centre Q_i** ou **N**, électronégatif), l'hème b-566 est situé côté cytoplasmique (**centre P** ou **Q_o** , électropositif). Le **cyt c1** est une protéine acide, ancrée du côté électropositif de la membrane interne mitochondriale par un domaine hydrophobe C-terminal. Comme tous les cytochromes c, l'hème de type c est lié de façon covalente à la protéine. Cette liaison fait intervenir sur le cyt c1 deux cystéines, une histidine et une méthionine (Pelmont, 1995). La **protéine de Rieske** ou la protéine Fer-Soufre (protéine Fe-S) est ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie par des acides aminés N-terminaux. Le centre Fe-S est lié à la protéine par deux cystéines et deux histidines. Il est situé dans une poche hydrophobe qui apparaît entourée par deux hélices hydrophobes et deux hélices hydrophiles (Pelmont, 1995).

b) Fonction du complexe b-c1

Grâce aux quatre groupements prosthétiques, le complexe *b-c1* transfère les électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome c et dépose quatre protons dans l'espace intermembranaire par paire d'électrons transférée à deux molécules de cytochrome c (Trumpower, 1990b).

On peut distinguer deux sites catalytiques sur le complexe *b-c1*, un site de chaque côté de la membrane interne mitochondriale (figure 7-A). L'oxydation de l'ubiquinol (QH_2) a lieu du côté cytoplasmique de la membrane (centre Q_o), alors que la réduction de l'ubiquinone (Q) s'effectue du côté de la matrice (centre Q_i). Les deux électrons issus de l'oxydation de l'ubiquinol sont séparés : l'un passe à travers le cyt c1 et la protéine de Rieske jusqu'au cyt c, alors que le second permet la réduction de l'ubiquinone en l'anion ubisemiquinone. Lorsqu'une seconde molécule d'ubiquinol est oxydée, l'anion ubisemiquinone précédemment formé est réduit en ubiquinol. Ces réactions d'oxydo-réduction du coenzyme Q sont appelées le cycle Q (Trumpower, 1990b).

II. 2. 2. Les inhibiteurs du complexe *b-c1*

a) Les inhibiteurs du complexe *b-c1*

L'existence de deux sites de fixation pour l'ubiquinol ou ses produits d'oxydation dans le complexe *b-c1* est maintenant bien établie. Les inhibiteurs du complexe *b-c1* (figure 7-A) dits de « **classe I** » (**myxothiazol**, **stigmatelline**) se fixent sur le cyt b et inhibent le centre externe (centre Q_o).

Le centre Q_o est aussi inhibé par une hydroxyquinone (**UHDBT** pour « 5-*n*-undecyl-6-hydroxy-4,7-dioxybenzoxythiazole »). Cet inhibiteur de **classe II** inhibe le transfert des électrons entre la protéine Fe-S et le cyt c1.

Par ailleurs, le centre Q_i est bloqué par les inhibiteurs de **classe III**. L'**antimycine**, qui se fixe sur le cyt b, bloque par exemple le transfert d'électrons entre le cyt b-562 et l'ubiquinone.

Enfin, il a été démontré que le **DCCD** (*N, N'*-Dicyclohexylcarbodiimide) se fixe au cyt b et bloque la translocation des protons, sans affecter le transfert des électrons du complexe *b-c1* (vonJagow and Link, 1986).

b) Une voie alternative d'ubiquinol oxydase

Toutes les bactéries ayant un complexe *b-c1*, possèdent au moins une voie alternative d'ubiquinol oxydase, qui évite le complexe *b-c1*. Ces voies alternatives ne permettent pas le transfert de protons d'où une croissance bactérienne moins efficace, lorsque le complexe *b-c1* est inhibé ou inactivé (conditions non photosynthétique ou anaérobie). L'émergence d'oxydoréductases alternatives est une protection contre les microorganismes compétiteurs qui produisent des toxines agissant sur le complexe *b-c1* comme le myxothiazol et l'antimycine (Trumpower, 1990a).

Dans la majorité des mitochondries, il n'existe pas d'autre voie de transfert d'électrons de l'ubiquinol vers la cytochrome c oxydase sauf en passant par le complexe *b-c1*. La seule exception, permettant de contourner le complexe *b-c1* dans la chaîne respiratoire est la L-lactate/cytochrome c oxydo-réductase (flavocytochrome b_2) chez *S. cerevisiae* (Figure 7-B). Cette enzyme, localisée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie de *S. cerevisiae* oxyde spécifiquement le L-lactate et transfère directement ses électrons au cyt c. Cette voie, bien que moins avantageuse quant à la production d'ATP, offre un avantage sélectif à ces

souches de *S. cerevisiae* lorsqu'elles cohabitent avec d'autres microorganismes (deVries and Marres, 1987).

De part la position essentielle du complexe *b-c1* dans la chaîne respiratoire, ses inhibiteurs sont toxiques contre tous les eucaryotes dépourvus d'oxydoréductases alternatives.

c) Le cytochrome b, une protéine essentielle

Ainsi, le complexe *b-c1* est quasiment incontournable pour transmettre les électrons de l'ubiquinol jusqu'à l'oxydase terminale. Le cyt b, de part sa structure, joue un rôle prépondérant dans les sites d'oxydo-réduction de ce complexe. La description de nombreuses mutations sur le gène du cyt b entraînant la résistance aux inhibiteurs du complexe *b-c1* confirme l'importance de cette protéine. Enfin, sa structure très conservée témoigne du rôle universel et essentiel du cyt b dans la transduction d'énergie.

III. Le système d'importation mitochondrial et la chaperonine Hsp60

L'ADNmt ne code que très peu de protéines de la chaîne respiratoire et dépend du génome nucléaire à la fois pour sa réplication et l'expression de ses gènes mitochondriaux, mais également pour une chaîne respiratoire fonctionnelle. Les protéines codées par le génome nucléaire sont synthétisées sous forme de **précurseurs** sur les polysomes cytoplasmiques puis transportées dans la mitochondrie grâce à leur **séquence signal d'importation** et au système d'importation mitochondrial. Les expériences d'importation développées *in vitro* sur des mitochondries isolées de *N. crassa* et *S. cerevisiae* ont permis de disséquer chaque étape du mécanisme d'importation et de caractériser les protéines qui y sont impliquées. Parmi ces protéines, l'**Hsp60** est **essentielle** pour l'assemblage des complexes multienzymatiques (Cheng, *et al.*, 1989).

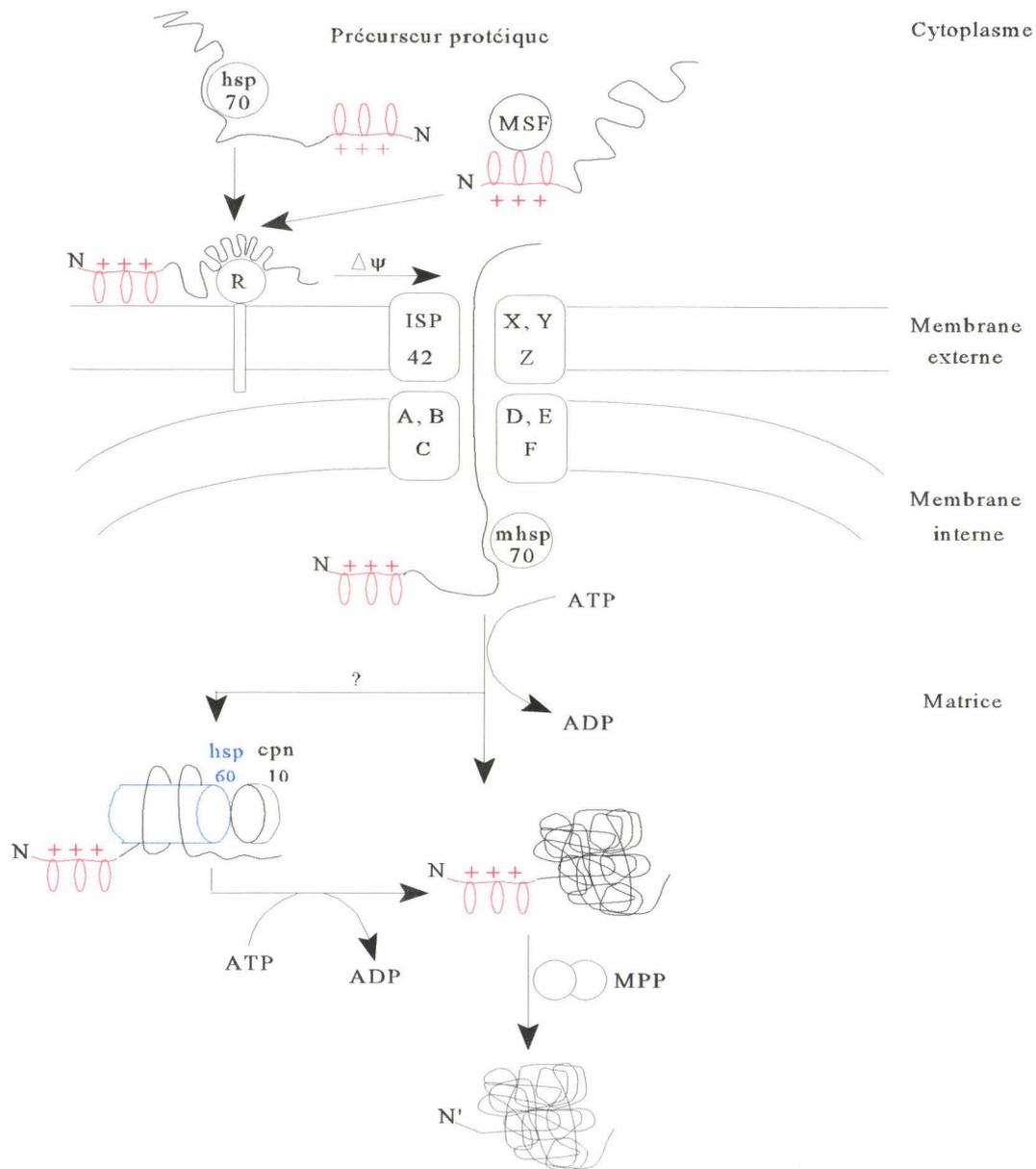


Figure 8: Mécanisme général d'importation dans la mitochondrie. Les précurseurs protéiques sont pris en charge par des chaperons cytoplasmiques (hsp70, MSF). Ils sont alors transférés sur des récepteurs (R) situés sur la membrane externe de la mitochondrie. Grâce au potentiel de membrane ($\Delta\Psi$), les précurseurs sont importés au niveau des pores (sous-unités ISP42, A à F et X à Z) formés à travers les deux membranes. Les interactions entre les chaperons mitochondriaux mhsp70 et hsp60 (en bleu) ainsi que l'étape de clivage de la préséquence N-terminale (en rouge) par les protéases (MPP) de la matrice ne sont pas bien établies. La maturation et l'assemblage des complexes protéiques est assistée par les chaperons hsp60 et cpn10. (D'après Glick and Schatz, 1991).

III. 1. Le système d'importation

III. 1. 1. Le mécanisme général d'importation

L'importation des précurseurs protéiques synthétisés dans le cytoplasme est un mécanisme post-traductionnel qui nécessite plusieurs étapes catalysées par des protéines spécifiques (Glick and Schatz, 1991 ; Pfanner and Neupert, 1990). Dès leur synthèse, les précurseurs sont pris en charge par des **chaperons** cytoplasmiques qui maintiennent les polypeptides dans une conformation déroulée non mature (figure 8). La protéine de choc thermique de 70kDa (Hsp70) et la protéine Yjd1, homologues respectivement des protéines bactériennes DnaK et DnaJ interagissent pour faciliter l'importation des précurseurs mitochondriaux. Certaines pré-protéines nécessitent un facteur cytosolique supplémentaire pour un adressage correct jusqu'à la mitochondrie (facteur MSF pour « Mitochondrial import stimulation factor »).

Des **récepteurs** spécifiques à la surface de la mitochondrie reconnaissent la **préséquence** N-terminale et permettent la liaison des précurseurs protéiques à la surface de la mitochondrie. Le passage intramembranaire s'effectue dans les zones où les membranes externes et internes sont côte à côte (**point de contact**, figure 4) et exige non seulement, une **conformation souple** de la protéine importée, mais également un **potentiel membranaire** mitochondrial.

Des **protéines de transport** forment des pores au niveau de ces points de contact et permettent l'importation des précurseurs dans la matrice. Ces complexes d'importation membranaires (complexes Tom dans la membrane externe et Tim dans la membrane interne pour « mitochondrial outer membrane » et « mitochondrial inner membrane ») sont bien caractérisés chez *S. cerevisiae* et *N. crassa* et leurs homologues commencent à être identifiés chez les mammifères (Mori and Terada, 1998).

Le peptide signal est alors clivé par des **protéases**. Au moins trois enzymes sont impliquées dans le clivage protéolytique des préséquences. La protéase mitochondriale (MPP pour « Mitochondrial Processing Protease » ou MAS2) associée à la protéine PEP (« Processing Enhancing Protein » ou MAS1) forment une métallo-protéase active dans la matrice de la mitochondrie. La protéase intermédiaire (MIP pour « Mitochondrial Intermediate Peptidase ») est également située dans la matrice. Enfin, la protéase de la membrane interne (IMP-I pour

« Inner Membrane Protease I ») est nécessaire au clivage des préséquences des protéines localisées dans l'espace intermembranaire.

Les **chaperons** situés dans la matrice (Hsp70 et ses cofacteurs, Hsp60 et Hsp10) sont nécessaires à la translocation des protéines dans la matrice, à leur localisation dans les sous-compartiments mitochondriaux, à l'acquisition de la conformation native et à l'assemblage des complexes multiprotéiques.

III. 1. 2. L'importation dans les différents sous-compartiments

Le mécanisme général d'importation décrit ci-dessus mène les protéines dans la matrice. En fonction de la localisation des protéines matures dans les quatre sous-compartiments de la mitochondrie, le mécanisme d'importation varie.

Les protéines de la **membrane mitochondriale externe** sont elles aussi synthétisées au niveau des ribosomes du cytosol et sont directement insérées dans la membrane externe. Leur importation ne nécessite pas de potentiel électrochimique dans la membrane interne et les protéines ne subissent pas de clivage protéolytique. Par exemple, la protéine P70 (responsable des pores au niveau de la membrane externe) possède du côté N-terminal une courte séquence peptidique d'acheminement à la matrice, suivie d'une longue suite d'acides aminés hydrophobes. Le court peptide amphiphile permet l'insertion de la protéine P70 dans la membrane externe et la séquence hydrophobe agit comme une séquence d'arrêt de transfert, empêchant la protéine d'atteindre la matrice mitochondriale. La protéine est alors insérée dans la membrane externe sous forme de protéine intrinsèque et conserve intégralement son extrémité N-terminale (Schatz, 1987).

Trois mécanismes d'acheminement dans **l'espace intermembranaire** peuvent être décrit en fonction du polypeptide considéré. La protéine Fe-S du complexe *b-c1* de *N. crassa* et de *S. cerevisiae*, possède une hélice α amphiphile N-terminale la dirigeant jusque dans la matrice. La préséquence est alors clivée par les protéases de la matrice (MPP et PEP) et la protéine est réacheminée dans la membrane interne. Pendant ce transfert, on observe un second clivage de huit à neuf acides aminés du côté N-terminal par la protéase intermédiaire (MIP) de la matrice.

Le cytochrome c est importé directement du cytosol à l'espace intermembranaire, *via* un système d'importation particulier, distinct des autres systèmes. Sa forme cytosolique,

l'apocytochrome c, a une séquence d'acides aminés identique à celle de la protéine mature, sans préséquence d'importation. L'apocytochrome c diffuse librement au travers de la membrane mitochondriale externe, vraisemblablement par l'intermédiaire des pores formés par la protéine P70. La cytochrome c synthétase ou cytochrome c: hème lyase attache le groupe hème à l'apocytochrome c. L'incorporation de l'hème change la conformation de la protéine de sorte que le cytochrome c ne peut plus diffuser à travers la membrane externe, et reste prisonnier dans l'espace intermembranaire.

Les cytochromes c1 et b2 portent une double séquence peptidique d'importation et de ciblage dans l'espace intermembranaire. La séquence située à l'extrémité N-terminale les amènent dans la matrice avant d'être clivée par une protéase. Deux mécanismes contradictoires sont proposés pour la localisation intermembranaire finale. Dans l'hypothèse de la « ré-exportation », la protéine passe dans la matrice, et sa deuxième séquence d'importation l'entraîne à travers la membrane interne vers l'espace inter-membranaire. Dans une seconde hypothèse, la deuxième séquence d'importation agit comme une séquence d'arrêt de transfert en empêchant le fragment C-terminal du précurseur de franchir la membrane interne. Le précurseur inséré dans la membrane interne y diffuse alors en s'éloignant du site de translocation, puis sa deuxième séquence d'importation est clivée par une protéase de l'espace intermembranaire. Les données actuelles ne permettent pas de trancher entre ces deux hypothèses. Ces mécanismes d'importation ne nécessitent ni ATP ni la chaperonine Hsp60 de la matrice.

Pour les protéines de la **membrane interne**, différents mécanismes d'importation sont possibles. L'échangeur d'ADP/ATP ne possède pas de préséquence clivable mais contient des signaux internes d'importation. Le précurseur ne transite vraisemblablement pas par la matrice car le chaperon Hsp60 n'est pas nécessaire à son importation. D'autres protéines, comme la sous-unité 9 de la partie F₀ de l'ATP synthétase de *N. crassa* est complètement importée dans la matrice avant d'acquérir sa conformation mature dans la membrane interne.

III. 1. 3. Des protéines mitochondriales essentielles pour la cellule

Parmi les gènes nucléaires qui codent pour des protéines mitochondriales chez la levure, cinq seulement sont essentielles, car la délétion de l'un quelconque de ces gènes est létale pour la cellule. Il s'agit des sous-unités d'une protéase de la matrice, MPP et PEP, des

chaperons de la matrice Hsp70 et Hsp60, et de la protéine ISP42 (« Import Site Protein 42 ») de la membrane externe permettant le passage des protéines importées (Baker and Schatz, 1991).

Ces protéines sont nécessaires à l'entrée dans la matrice d'enzymes codées par des gènes nucléaires, comme ceux qui catalysent la biosynthèse d'acides aminés et de nucléosides. En milieu anaérobie, les mitochondries de levure sont dépourvues des enzymes de la phosphorylation oxydative mais possèdent ces enzymes liées aux autres métabolismes mitochondriaux indispensables à la croissance de *S. cerevisiae*.

III. 2. Les chaperonines

Les protéines **Hsp60** sont homologues à la protéine GroEL d'*E. coli*. Elles sont présentes dans toutes les mitochondries et tous les chloroplastes étudiés, où elles participent, en collaboration avec l'Hsp10, à l'assemblage post-traductionnel des structures oligomériques. Ces Hsp60 et Hsp10 forment avec leurs homologues procaryotiques GroEL et GroES la classe des **chaperonines**. La localisation des chaperonines, couplée à des séquences fortement conservées concorde avec une origine ancienne de ce groupe de protéines acquis par endosymbiose chez les eucaryotes (Ellis and van der Vies, 1991). Les chaperonines sont essentielles et bien conservées. Leur expression est constitutive et peut être induite par des stress environnementaux ou en fonction du développement des organismes (Heikkila, 1993a ;Heikkila, 1993b).

III. 2. 1. La protéine GroEL

La protéine GroEL d'*E. coli* est normalement présente dans la bactérie et sa quantité augmente fortement en réponse à un choc thermique (Hendrick and Hartl, 1993). Elle est constituée de 14 sous-unités identiques de 57 kDa, disposées en deux anneaux de 7 oligomères. GroEL est une protéine indispensable à la viabilité cellulaire car des mutants nuls ne sont pas viables, quelque soit la température. GroEL participe en effet à de nombreux processus cellulaires dans les bactéries comme la réplication de l'ADN, la division cellulaire et la sécrétion de protéines. Le gène groEL est associé en opéron avec le gène groES, dont la protéine GroES de 10 kDa interagit avec GroEL.

III. 2. 2. Les homologues eucaryotes

Dans les **chloroplastes**, l'étude de la biosynthèse de la ribulose biphosphate carboxylase (Rubisco) montra une importante structure oligomérique associée de façon stable aux grandes sous-unités de la Rubisco. Ce complexe protéique capable de se fixer à la Rubisco, est composé de sous-unités de type α et β . Ces protéines de 60 kDa sont codées par deux gènes nucléaires homologues à 50%. Ces études sur la Rubisco démontrèrent pour la première fois l'implication directe des chaperons dans l'assemblage des complexes protéiques (Zeilstra-Ryalls, *et al.*, 1991).

L'Hsp60 **mitochondriale** fut identifiée chez *Tetrahymena thermophila* comme une protéine de 60 kDa induite par un choc thermique, et de structure proche de celle de GroEL. L'isolement de mutants thermosensibles de *S. cerevisiae* dans le gène *mif4* démontra le rôle essentiel de la protéine pour l'assemblage des complexes oligomériques dans la mitochondrie (Cheng, *et al.*, 1989). Depuis, des protéines Hsp60 furent identifiées dans les mitochondries de tous les eucaryotes, et une Hsp10, homologue de la protéine GroES fut identifiée chez les mammifères (Zeilstra- Ryalls, *et al.*, 1991).

IV. La mitochondrie chez les Apicomplexa

IV. 1 La mitochondrie chez *Plasmodium*

a) Structure de la mitochondrie

Plasmodium ne possède qu'une seule mitochondrie (Slomianny and Prensier, 1986) dont la morphologie est variable en fonction des espèces. Chez *P. falciparum*, la mitochondrie des stades intra-érythrocytaires ne présente pas de crêtes internes alors que dans les gamétocytes, une mitochondrie de structure classique est observée. Les espèces *Plasmodium* infestant les oiseaux et les rongeurs possèdent une mitochondrie dont la membrane interne est invaginée en nombreux replis, quelque soit le stade de développement (Divo, *et al.*, 1985).

b) L'ADN mitochondrial : structure, réplication et expression des gènes

La structure de l'ADNmt

Longtemps confondu avec l'ADN plastidial de 35 kb (Gardner, *et al.*, 1988 ;Kilejian, 1975 ;Williamson, *et al.*, 1985), l'ADNmt de *Plasmodium* fut décrit pour la première fois chez *P. yoelii* comme un élément répété en tandem de 6 kb (Vaidya and Arasu, 1987). Le séquençage complet de cette unité de 5 984 pb fut obtenu en 1989 par Vaidya *et al.* (Vaidya, *et al.*, 1989). La présence de gènes codant pour le cytochrome b (cyt b) et pour la sous-unité 1 du cytochrome c oxydase (cox 1), confirma sans ambiguïté l'origine mitochondriale de ce génome. C'est le plus petit ADNmt jamais décrit. Parallèlement, Joseph *et al.* démontrèrent l'existence d'un ADNmt répété en tandem d'environ 6 kb chez *P. gallinaceum* (Aldritt, *et al.*, 1989). Ce petit ADNmt se retrouve aussi chez *P. falciparum* et sa séquence fut également déterminée (Feagin, 1992 ;Suplick, *et al.*, 1988). Le nombre de copies de l'ADNmt varie entre 15 copies par mitochondrie chez *P. gallinaceum* (Joseph, *et al.*, 1989), 20 copies chez *P. falciparum* (Preiser, *et al.*, 1996) et jusqu'à 150 copies chez *P. yoelii* (Vaidya and Arasu, 1987). Enfin, Creasey *et al.* démontrèrent en 1994 (Creasey, *et al.*, 1994) que l'ADNmt de *P. gallinaceum* se transmettait à la descendance de façon uniparentale, par l'intermédiaire des macrogamètes femelles.

Alors que la majorité des ADNmt sont sous la forme de monomères (généralement circulaires et parfois linéaires), il est chez *Plasmodium*, sous la forme « d'unités linéaires répétées en tandem ». Cette structure particulière n'est cependant pas une exception puisque chez d'autres microorganismes tels que la levure, l'ADNmt se présente sous forme d'unités linéaires répétées (Wilson and Williamson, 1997). Il code pour les quatre gènes universellement retrouvés sur tous les ADNmt, à savoir, les gènes codant pour le cytochrome b, la sous-unité 1 du cytochrome c oxydase et les deux ARN ribosomiaux (figure 5-B). Le gène codant pour la sous-unité 3 du cytochrome c oxydase, peu conservé chez *P. yoelii* (Vaidya, *et al.*, 1989), est trouvé sur les ADNmt de *P. gallinaceum* et de *P. falciparum* (Feagin, 1992 ;McIntosh, *et al.*, 1998 ;Vaidya, *et al.*, 1993). Trois autres cadres ouverts de lecture de taille inférieure à 151 acides aminés sont également présents sur ces ADNmt mais aucun transcrit n'a pu être détecté (Vaidya, *et al.*, 1993). Enfin, l'ADNmt de *Plasmodium* ne code pour aucun ARN de transfert; ce qui, avec *Trypanosoma brucei*, représente une exception.

Les gènes codant pour les ARNr de la mitochondrie ont une organisation particulière. Ils sont morcelés en fragments sur les deux brins de l'ADNmt et contiennent les séquences essentielles aux ARNr. Leur organisation diffère totalement de celle d'*E. coli*; ils semblent mélangés au hasard, entre eux et entre les gènes codant pour les protéines (Feagin, 1994 ; Feagin, *et al.*, 1992). La fragmentation des gènes codant pour les ARNr, retrouvée pour les ARNr cytoplasmiques des Trypanosomatides serait un caractère primitif perdu au cours de l'évolution (Wilson and Williamson, 1997).

La réplication de l'ADNmt

La réplication de l'ADNmt débute en même temps que celle de l'ADN nucléaire. L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle, ne montre pas un mécanisme classique de réplication bidirectionnelle (ou réplication θ) mais des mécanismes communs aux phages et aux plasmides. La recombinaison entre les molécules linéaires associée à la réplication en cercle roulant des molécules circulaires permettraient en effet la réplication de l'ADNmt chez *Plasmodium* (Preiser, *et al.*, 1996).

L'expression des gènes mitochondriaux

De nombreux transcrits furent observés chez *Plasmodium* (Suplick, *et al.*, 1990 ; Vaidya and Arasu, 1987). Certains, correspondant aux tailles attendues pour les transcrits des gènes codant pour le *cox 1* et le *cyt b*, seraient fonctionnels (Suplick, *et al.*, 1990). La mise en évidence de transcrits de grand taille (Aldritt, *et al.*, 1989 ; Vaidya, *et al.*, 1993), suggère une transcription polycistronique de l'ADNmt (Ji, *et al.*, 1996).

Un ATG, présent près de l'extrémité 5' de l'ARNm du *cyt b* semble initier la traduction du *cyt b* alors que pour les protéines *cox1* et *cox3*, les codons ATT et ATA joueraient le rôle de codon initiateur alternatif de la traduction (Feagin, 1992).

c) La mitochondrie en relation étroite avec le génome nucléaire

La réplication (Preiser, *et al.*, 1996) et la transcription de l'ADNmt (Feagin, 1992 ; Ji, *et al.*, 1996 ; Vaidya, *et al.*, 1993) furent largement démontrés. L'inhibition de la croissance de *P. falciparum* par la tétracycline (Kiatfuengfoo, *et al.*, 1989 ; Prapunwattana, *et al.*, 1988) ainsi que la mise en évidence des complexes enzymatiques III et IV de la membrane interne (Krungkrai, *et al.*, 1997) démontrent la traduction de ces transcrits. Les enzymes nécessaires à

ces processus de réplication, transcription et traduction, implique des interactions entre les génomes mitochondriaux et nucléaires. Ces enzymes, codées par les gènes nucléaires, doivent être importées dans la mitochondrie. En plus de ces enzymes de « machinerie cellulaire », les autres sous-unités des complexes enzymatiques doivent également être importées dans la mitochondrie de *P. falciparum*. Le processus d'importation sous-entend une séquence signal d'importation, un potentiel de membrane et un système d'importation mitochondrial. La mitochondrie de *Plasmodium*, visualisée par la rhodamine 123, est effectivement capable de maintenir activement un potentiel de membrane (Divo, *et al.*, 1985). Une séquence signal d'importation fut démontrée par l'importation du transporteur de phosphate de *P. falciparum* dans un système hétérologue, la mitochondrie de rat (Bhaduri-McIntosh and Vaidya, 1998). L'importation efficace de la protéine dans ce système hétérologue souligne le caractère « courant » du peptide signal d'importation de cette protéine, certainement capable de former une hélice α . D'autres protéines, telles que la dihydroorotate déshydrogénase (LeBlanc and Wilson, 1993), le système d'échange d'ADP/ ATP (Dyer, *et al.*, 1994 ;Hatin and Jaureguiberry, 1995), et la δ -aminolevulinate synthase (Wilson, *et al.*, 1996a), codées par des gènes nucléaires sont également présentes dans la mitochondrie de *Plasmodium*. Le système d'importation dans la mitochondrie de *P. falciparum* n'est pas caractérisé. Seul, un chaperon moléculaire de 60 kDa (Hsp60), localisé dans la mitochondrie pourrait intervenir pour la conformation des protéines (Das, *et al.*, 1997 ;Syin and Goldman, 1996).

d) Les fonctions mitochondriales chez *Plasmodium falciparum*

Un rôle mineur de la mitochondrie dans la production d'ATP

Plasmodium ne nécessite que très peu d'oxygène pour son développement intra-érythrocytaire. Son énergie peut provenir de trois sources différentes. La glycolyse ou fermentation est la source majeure de l'ATP chez *P. falciparum*. Le pyruvate issu de la glycolyse est réduit en lactate, et celui-ci est alors éliminé par le parasite (Fry, 1991). La seconde source est exogène. Le parasite aurait également accès à l'ATP de l'hôte, grâce à un système d'échange membranaire ADP/ ATP (Dyer, *et al.*, 1994 ;Hatin and Jaureguiberry, 1995 ;Jambou, *et al.*, 1995). L'ATP de *P. falciparum* provient surtout de ces deux voies métaboliques. Enfin, le rôle joué par la mitochondrie de *P. falciparum* dans la production de l'ATP, s'il existe, est très minime. En effet, les enzymes du cycle de Krebs, excepté la malate déshydrogénase, sont absents (Fry, 1991). Ceci, associé à la structure peu développée de la

membrane interne mitochondriale, ne concorde pas avec une production massive d'ATP par la mitochondrie des parasites intra-érythrocytaires.

La production d'ATP par phosphorylation oxydative ne peut cependant être totalement exclue puisque la mitochondrie possède un potentiel membranaire, une chaîne de transport d'électrons et une ATP synthétase fonctionnels. En effet, la rétention de rhodamine 123 démontre l'existence d'un potentiel membranaire dans la mitochondrie de *P. falciparum* (Divo, *et al.*, 1985). Ce potentiel peut être diminué par des agents découplants, des inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons ou des inhibiteurs de l'ATP synthétase (Divo, *et al.*, 1985 ;Srivasta, *et al.*, 1997).

Les inhibiteurs du complexe I semblent avoir peu d'effet sur la croissance *in vitro* de *P. falciparum* (Fry, *et al.*, 1990 ;Ginsburg, *et al.*, 1986). La faible efficacité de la roténone, observée chez *P. falciparum* est également caractéristique d' *E. tenella*, de *B. divergens* et des Trypanosomatides (Fry, *et al.*, 1990 ;Srivasta, *et al.*, 1997). Les inhibiteurs du complexe III sont particulièrement efficaces sur la croissance de *P. falciparum* (Divo, *et al.*, 1985 ;Fry, *et al.*, 1990 ;Ginsburg, *et al.*, 1986 ;Hudson, *et al.*, 1985). Le développement de l'atovaquone, dont le site d'action est le cyt b (Fry and Pudney, 1992 ;Vaidya, *et al.*, 1993), accroît l'intérêt de ce complexe en tant que cible thérapeutique (Krungkrai, *et al.*, 1997). L'atovaquone, est actuellement utilisée contre les souches multi-résistantes de *P. falciparum* (Sabchareon, *et al.*, 1998). Le complexe IV, dont l'inhibition bloque la croissance *in vitro* de *P. falciparum* (Divo, *et al.*, 1985 ;Ginsburg, *et al.*, 1986) pourrait également servir de cible thérapeutique (Krungkrai, *et al.*, 1997). De plus, le quart de la consommation d'oxygène par *P. falciparum* serait attribué à une oxydase alternative dont l'inhibition arrête, *in vitro*, le développement de *P. falciparum* (Murphy, *et al.*, 1997). L'oxydase alternative est sensible à l'acide salicylhydroxamique et se branche à la voie de transport des électrons au niveau de l'ubiquinone. Elle transfère alors directement les électrons à l'oxygène, en une seule étape, et n'est pas couplée à la synthèse d'ATP. Les drogues bloquant l'ATP synthétase inhibent tout autant la croissance *in vitro* de *P. falciparum* (Ginsburg, *et al.*, 1986). L'utilisation *in vivo* de l'almitrine contre le paludisme fut même proposée par Basco *et al.* (Basco and Le Bras, 1994), bien que sa spécificité d'action contre l'ATP synthétase ne soit pas démontrée. Enfin, le CCCP ne provoque pas d'augmentation de la respiration. L'utilisation de cet agent découplant suggère que le transport d'électrons dans la mitochondrie de *P. falciparum* n'est pas contrôlé par le gradient de protons (Srivasta, *et al.*, 1997).

L'effet de ces inhibiteurs sur la croissance *in vitro* de *P. falciparum* démontre l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale et son rôle indispensable pour le développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum*. Toutefois, cette chaîne respiratoire ne participerait pas à la production d'ATP chez *P. falciparum*.

L'implication de la mitochondrie dans les autres voies métaboliques

La synthèse des noyaux porphyrines est une des voies métaboliques présentes dans les mitochondries (Weil, 1987). L'origine des noyaux porphyrines chez *P. falciparum* est incertaine. Ils peuvent provenir des hématies hôtes ou être issus de la biosynthèse *de novo*. La présence de la δ -aminolevulinate synthase (Wilson, *et al.*, 1996a) suggère une voie métabolique mitochondriale à quatre carbones. La dépendance de *P. falciparum* vis à vis de cette voie métabolique pour la biosynthèse *de novo* des molécules possédant cette structure porphyrine n'est cependant pas évidente (Wilson, *et al.*, 1996a).

La synthèse *de novo* de l'uridine 5'-monophosphate (UMP) fait intervenir six enzymes dont seule la dihydroorotate déshydrogénase (DHODase) est mitochondriale. L'ubiquinone à longue chaîne est nécessaire à l'activité de la DHODase chez *P. berghei* (Krungkrai, *et al.*, 1991) et chez *P. falciparum* (Krungkrai, 1995). L'hypothèse d'un couplage entre la biosynthèse *de novo* des pyrimidines et la chaîne de transport d'électrons au niveau de l'ubiquinone est largement supportée par l'utilisation d'inhibiteurs. La tétracycline entraîne ainsi une diminution de l'activité de la DHODase (Prapunwattana, *et al.*, 1988). Cette activité peut être rétablie par l'ajout d'accepteurs d'électrons, ce qui implique un effet indirect de l'antibiotique sur l'enzyme. La tétracycline, en interférant avec la biosynthèse des protéines mitochondriales (Kiatfuengfoo, *et al.*, 1989), agit sur la chaîne de transport d'électrons et inhibe la synthèse des pyrimidines. De même, les benzoquinones et les naphtoquinones (atovaquone), en interférant au niveau de l'ubiquinone, bloquent le transport d'électrons et inhibent l'activité de la DHODase (Krungkrai, 1995). La biosynthèse des pyrimidines est donc liée à la chaîne de transport des électrons et à la consommation d'oxygène par *Plasmodium*. Un transport d'électrons simplifié impliquant la DHODase, l'ubiquinone et les complexes III et IV, couplerait l'oxydation du dihydroorotate à la réduction de l'oxygène (Krungkrai, *et al.*, 1991).

La mitochondrie est essentielle au développement intra-érythrocytaire de P. falciparum

La seule voie métabolique où la mitochondrie des parasites intra-érythrocytaires intervient clairement est la biosynthèse *de novo* des pyrimidines. *P. falciparum* dépend entièrement de cette voie pour l'obtention des pyrimidines. La mitochondrie, de part ce couplage entre la chaîne de transport d'électrons et la biosynthèse des pyrimidines, est donc essentielle au développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum*. Tous les inhibiteurs agissant au niveau de la synthèse protéique mitochondriale ou au niveau de la chaîne respiratoire bloquent en effet la croissance de *P. falciparum*. L'efficacité, *in vivo*, de la tétracycline et de l'atovaquone contre *P. falciparum* attestent de l'importance de la mitochondrie pour le développement de nouveaux composés contre le paludisme. Enfin, les ADNmt de quatre espèces de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. gallinaceum*, *P. yoelii*, et *P. vivax*) sont peu divergents. L'ADNmt, dépourvu d'histones et soumis aux dérivés oxygénés produits par la chaîne respiratoire est normalement sujet à de nombreuses mutations. La conservation particulièrement élevée de la séquence de l'ADNmt entre ces quatre espèces attesterait donc de l'importance des fonctions mitochondriales dans la survie du parasite (McIntosh, *et al.*, 1998).

IV. 2 La mitochondrie chez *Theileria*

T. annulata possède une mitochondrie de structure sphéroïdale, sans invagination de sa membrane interne. Les activités enzymatiques d'une succinate déshydrogénase et d'une cytochrome c oxydase suggèrent par ailleurs, la présence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle (Weber, 1978). Hall *et al.* (Hall, *et al.*, 1990) rapportèrent la présence d'un élément extrachromosomal linéaire de 6,5 kb, présent en plusieurs exemplaires, et activement transcrit. Son origine mitochondriale fut démontrée en 1991, par la séquence du gène du *cyt b* (Megson, *et al.*, 1991). L'hybridation croisée de l'ADNmt de *P. falciparum* sur l'ADN génomique de *T. parva*, fut la première indication quant à l'existence d'un élément comparable et présent en plusieurs copies chez *T. parva* (Joseph, *et al.*, 1989). La séquence de cet ADNmt linéaire de 7,1 kb, fut obtenue par Kairo *et al.* (Kairo, *et al.*, 1994). Bien que l'ordre des gènes diverge par rapport à *P. falciparum*, on retrouve les gènes codant pour le *cyt b*, le *cox1* et le *cox3*, ainsi que les gènes fragmentés des ARNr. Toutefois, l'ADNmt de *T. parva* se caractérise par la présence, aux extrémités, d'éléments répétés inversés. Techniquement, ces éléments

répétés inversés ne peuvent être séquencés. On ne connaît donc que les 5 895 pb les plus internes, ce qui ne permet pas de confirmer la taille de 7,1 kb pour l'ADNmt de *T. parva* (Kairo, *et al.*, 1994). Toutefois, la taille de cet ADNmt est estimée à 6,6 kb (Shukla and Nene, 1998), ce qui la rapproche des $6,3 \pm 0.18$ kb estimée en microscopie électronique par Megson *et al.* (Megson, *et al.*, 1991).

L'implication de la mitochondrie dans les métabolismes énergétiques et cellulaires de *Theileria* n'est pas démontrée. La sensibilité de *Theileria* vis à vis de l'atovaquone, indiquerait à nouveau une chaîne de transport d'électrons active et essentielle au développement de ce parasite (Shukla and Nene, 1998).

*Contexte et Problématique
de nos travaux*

CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE DE NOS TRAVAUX

La mitochondrie de *T. gondii* et son implication dans les métabolismes parasitaires sont très mal connues. Les données sont fragmentaires et sont souvent basées sur les travaux réalisés avec d'autres Apicomplexa, et notamment *Plasmodium* (Fry, 1991). Toutefois, l'activité d'une diaphorase mitochondriale, spécifique du parasite, permet de visualiser la mitochondrie de *T. gondii* en microscopie photonique et électronique. Cette technique permet de confirmer, sans ambiguïté, la présence d'une seule mitochondrie par parasite, comme c'est le cas pour tous les Apicomplexa. Celle-ci occupe une large place du cytosol parasitaire et présente une structure tubulaire complexe (Seeber, *et al.*, 1998). Un potentiel membranaire dans la mitochondrie de tachyzoïtes extra-cellulaires fut mis en évidence par Tanabe *et al.* (Tanabe and Murakami, 1984). Cependant, ces auteurs ne purent observer l'accumulation mitochondriale de la rhodamine 123 par des tachyzoïtes intra-cellulaires, même lorsque le fluorochrome cationique est directement injecté dans la vacuole parasitophore. Jusqu'à présent, il était admis que le potentiel membranaire mitochondrial se réduisait lorsque le parasite envahissait une cellule hôte. L'utilisation récente du MitoTrackerTM par Sinai *et al.* (Sinai, *et al.*, 1997) infirma cette conclusion. La mitochondrie de *T. gondii*, au stade tachyzoïte, serait donc capable de maintenir activement un potentiel membranaire, que les parasites soient extra- ou intra-cellulaires.

L'ADNmt de *T. gondii* n'est pas encore identifié. Les problèmes techniques pour l'isolement de l'ADNmt sont tout d'abord liés à la présence dans le génome nucléaire de gènes caractéristiques de la mitochondrie (cytb et cox1) (Ossorio, *et al.*, 1991). Enfin, au-delà de la contamination par les génomes mitochondriaux et nucléaires des cellules hôtes, l'ADNmt de *T. gondii* peut être contaminé par ses propres génomes plastidial et nucléaire. Un gradient de chlorure de césium, permet de séparer une large bande d'ADN nucléaire d'une bande satellite de plus faible densité (Joseph, *et al.*, 1989). Bien que cette bande minoritaire soit reconnue par l'ADNmt de *P. gallinaceum*, l'origine mitochondriale n'est toujours pas confirmée. Contrairement à *Plasmodium* où la transmission de l'ADNmt se fait de façon uniparentale par les macrogamètes femelles, la mitochondrie de *T. gondii* est présente dans les microgamètes mâles; ce qui suggère une transmission biparentale de l'ADNmt du toxoplasme. Il en serait de même chez *Eimeria* (Wilson, *et al.*, 1993 ;Wilson and Williamson, 1997).

a) La mitochondrie chez les tachyzoïtes extra-cellulaires

La consommation d'oxygène mesurée par l'électrode de Clark indiquerait que les tachyzoïtes extra-cellulaires sont capables de respirer (Pfefferkorn, *et al.*, 1993 ;Vercesi, *et al.*, 1998). Ceci concorde avec l'accumulation de la rhodamine 123; témoin d'un potentiel membranaire (Tanabe and Murakami, 1984). Plus récemment Vercesi *et al.* (Vercesi, *et al.*, 1998) démontrèrent que la chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative sont fonctionnels chez des tachyzoïtes extra-cellulaires perméabilisés par la digitonine. Le potentiel membranaire, mesuré par la rétention de la safranine O, est en effet diminué lorsque les parasites sont incubés avec des inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons (antimycine A, cyanure), de l'ATP synthétase (oligomycine) ou d'agents découplants (CCCP, valinomycine). La roténone n'a pas d'effet sur la respiration de *T. gondii* ni sur le potentiel membranaire mitochondrial. Comme cela fut démontré pour d'autres Apicomplexa (Fry, *et al.*, 1990 ;Ginsburg, *et al.*, 1986 ;Srivasta, *et al.*, 1997), le complexe I serait absent ou incapable de fixer la roténone chez *T. gondii* (Vercesi, *et al.*, 1998).

b) La mitochondrie chez les tachyzoïtes intra-cellulaires

Les fonctions mitochondriales chez les tachyzoïtes intra-cellulaires sont beaucoup plus incertaines. En premier lieu, l'existence d'un potentiel membranaire mitochondrial est controversé selon que l'on utilise la rhodamine 123 (Tanabe and Murakami, 1984) ou le MitoTrackerTM (Sinai, *et al.*, 1997). De plus, *T. gondii* est auxotrophe pour les purines (Schwartzman and Pfefferkorn, 1982), c'est-à-dire qu'il est incapable d'effectuer la synthèse *de novo* des purines. De nombreux travaux suggèrent que l'ATP venant des cellules hôtes traverse la membrane de la vacuole parasitophore (Schwab, *et al.*, 1994), et est dégradé dans l'espace vacuolaire par des hydrolases de nucleosides triphosphates (Asai, *et al.*, 1983 ;Bermudes, *et al.*, 1994 ;Sibley, *et al.*, 1994). L'adénine ainsi obtenu passe dans les tachyzoïtes par un transporteur et serait incorporé dans les purines de *T. gondii* (Schwab, *et al.*, 1995).

T. gondii a d'ailleurs la capacité de recruter les mitochondries de la cellule hôte, qui s'accrochent alors autour de la vacuole parasitophore (deMelo, *et al.*, 1992). Des protéines parasitaires telles que ROP2 (Sinai and Joiner, 1999) interviendraient pour une association étroite entre l'organite cellulaire et la membrane de la vacuole parasitophore (figure 9-A). De plus, la morphologie des mitochondries cellulaires entourant la vacuole parasitophore est altérée. Les crêtes de la membrane interne sont modifiées et fusionnent parfois en un réseau réticulé (figure

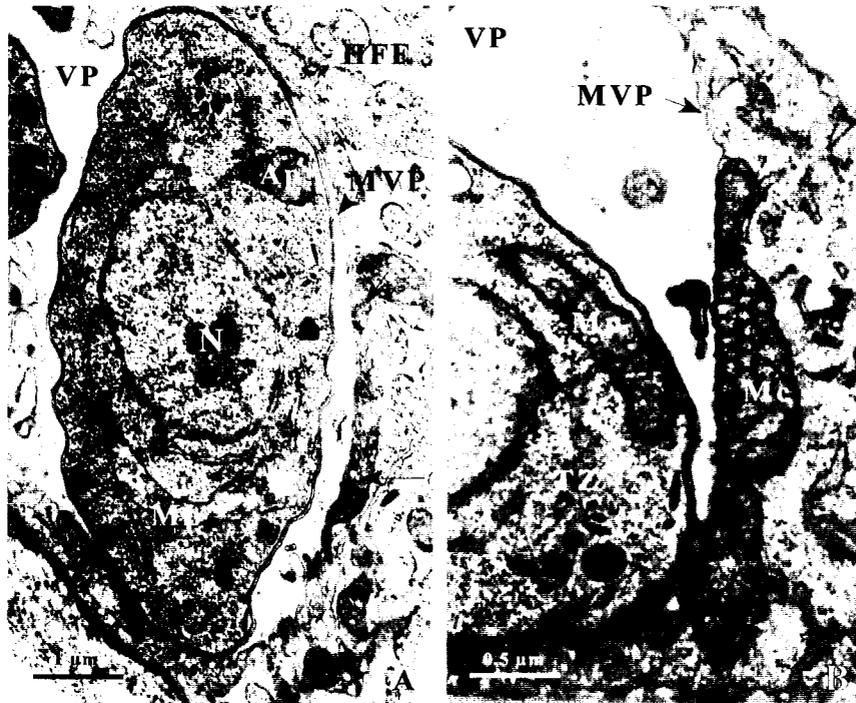


Figure 9: A: Morphologie ultrastructurale de tachyzoïtes intracellulaires. Les tachyzoïtes de la souche RH sont mis en culture sur des fibroblastes humains (cellules HFF). Le noyau (N), l'apicoplaste (Ap) et la mitochondrie (Mp) parasites sont indiqués. Les tachyzoïtes se multiplient dans la vacuole parasitophore (VP). Les mitochondries cellulaires (identifiées par les flèches) sont recrutées par les parasites et s'accolent contre la membrane de la vacuole parasitophore (MVP).

B: Mitochondrie cellulaire accolée à la membrane de la vacuole parasitophore. Les crêtes de la membrane interne de la mitochondrie de la cellule hôte sont modifiées en un réseau réticulé (d'après Dubremetz, 1995). Mp: mitochondrie parasitaire, Mc: mitochondrie de la cellule hôte, TZ: tachyzoïte, VP: vacuole parasitophore, MVP: membrane de la vacuole parasitophore.

9-B). Ceci suggère le détournement de certains métabolites cellulaires au profit du parasite (Sinai, *et al.*, 1997). Bien que les mitochondries cellulaires jouxtent la membrane de la vacuole parasitophore, l'ATP provenant de la phosphorylation oxydative de la cellule hôte n'est pas indispensable au développement parasitaire. *T. gondii* est en effet capable de se multiplier dans des cellules hôtes mutantes sans mitochondrie fonctionnelle (Tomavo and Boothroyd, 1995). Enfin, l'implication de la mitochondrie parasitaire pour la production d'ATP par phosphorylation oxydative n'est pas démontrée alors que la glycolyse liée à une forte production de lactate pourrait être à l'origine de l'ATP (Denton, *et al.*, 1996b).

c) *La mitochondrie et la différenciation*

Bien qu'il n'existe actuellement aucune preuve sur la capacité des tachyzoïtes intra-cellulaires à fabriquer de l'ATP par phosphorylation oxydative, l'organite apparaît essentiel pour la survie du parasite. La réplication des parasites intra-cellulaires est en effet arrêtée par les inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons (antimycine A, atovaquone), par l'inhibiteur de l'ATP synthétase (oligomycine) ou par l'agent découplant CCCP. L'inhibition de la chaîne respiratoire de *T. gondii* par ces drogues anti-mitochondriales ou par l'oxyde nitrique entraîne alors la différenciation *in vitro* des tachyzoïtes en bradyzoïtes (Bohne, *et al.*, 1994 ;Tomavo and Boothroyd, 1995). Ces drogues agissent directement sur la mitochondrie parasitaire puisqu'elles peuvent également induire la différenciation en bradyzoïtes lorsque les tachyzoïtes sont cultivés dans des cellules dépourvues de mitochondries fonctionnelles (Bohne, *et al.*, 1994 ;Tomavo and Boothroyd, 1995).

Les objectifs de la thèse

LES OBJECTIFS DE LA THESE

Les études antérieures discutées précédemment suggèrent, et ceci parfois de façon contradictoire, que la mitochondrie de *T. gondii* serait impliquée dans le développement intra-cellulaire des tachyzoïtes alors que les bradyzoïtes en seraient moins dépendants. En effet, les observations sur les tachyzoïtes extra-cellulaires ne peuvent être transposées aux parasites intra-cellulaires, qui de surcroît recrutent les mitochondries de la cellule hôte. La biochimie classique, à savoir le dosage des activités enzymatiques, la mesure de la respiration et l'utilisation d'inhibiteurs mitochondriaux est difficilement réalisable à cause du développement des toxoplasmes à l'intérieur d'une cellule hôte possédant 100 à 1000 fois plus de mitochondries que le parasite. Enfin, la faible quantité de bradyzoïtes exclue toute analyse enzymatique directe.

Dans ce contexte, il nous est apparu approprié d'associer la biologie moléculaire et la génétique pour approfondir les fonctions biologiques mitochondriales possibles ainsi que leur régulation chez *T. gondii*. Les outils moléculaires que nous avons produits pour ces études sont : - l'ADNc codant pour le **cytochrome b**

- le gène codant pour l'**Hsp60**

Nous avons choisi d'utiliser ces deux outils moléculaires car le *cyt b* est codé par un gène mitochondrial alors que l'Hsp60 est codé par un gène nucléaire avant d'être importé dans la mitochondrie, ce qui permet d'appréhender la transcription de l'ADNmt de *T. gondii* ainsi que l'importation de protéines cytoplasmiques dans la mitochondrie du toxoplasme. Enfin, le *cyt b* est essentiel au complexe *b-c1* de la chaîne de transport d'électrons et le chaperon Hsp60 est essentiel à l'assemblage des complexes enzymatiques mitochondriaux. L'expression du *cyt b* et de l'Hsp60 dans les formes tachyzoïte et bradyzoïte sera donc une indication sur la présence d'un transport d'électrons dans la mitochondrie parasitaire de chacun de ces deux stades.

Résultats

Chapitre I. Isolement et caractérisation du cytochrome b de *T. gondii*

I. Obtention et caractérisation de l'ADNc codant pour le cyt b de *T. gondii*

I. 1. Obtention d'un fragment de 420 pb par RT-PCR

Chez *T. gondii*, l'ADNmt n'est pas caractérisé. En revanche, de multiples pseudogènes nucléaires homologues aux gènes mitochondriaux dont le cyt b ont été décrits (Ossorio, *et al.*, 1991). Afin de limiter l'amplification de ces pseudogènes nucléaires, l'amplification de l'ARNm après transcription inverse en ADNc (RT-PCR) est préférée à l'amplification par PCR de l'ADN total. Les acides aminés VLPWGQM et VPEWYF sont choisis dans cette région du cyt b de *P. falciparum* (Vaidya, *et al.*, 1993) pour synthétiser les amorces dégénérées correspondantes (CYTA et CYTB, tab. 5). L'utilisation en RT-PCR de ces amorces dégénérées a permis d'amplifier un fragment de 420 pb à partir de l'ARNm de tachyzoïtes de la souche PLK. Ce fragment a été cloné et séquencé. Un peptide de 140 acides aminés est déduit de ce fragment. L'interrogation des banques de données (SwissProt et PIR) indique que ce peptide est homologue aux cyt b des autres organismes. A partir de cette séquence, des amorces spécifiques (CYT 2 à 5, tab. 5 et fig. 10) du cyt b de *T. gondii* ont été déterminées et l'amplification de l'ADNc entier par la méthode du « RACE » a été réalisée.

I. 2. Les extrémités 5' et 3' de l'ADNc codant pour le cyt b

Des PCR emboîtées utilisant successivement les couples d'amorces AP1-CYT4 et AP2-CYT5 (tab. 5, fig. 10) ont permis d'amplifier un fragment de 705 pb. Le séquençage de trois clones a confirmé que ce fragment correspond à l'extrémité 5' de l'ADNc codant pour le cyt b de *T. gondii*. Au delà de la séquence déjà connue, 131 acides aminés supplémentaires ont été déduits du côté N-terminal de la protéine. La séquence nucléotidique est complète puisqu'un codon d'initiation de la traduction (ATG) est présent. En amont de ce codon 91 pb sont également obtenues et correspondraient probablement à l'extrémité 5' non traduite.

```

ctttttctggggagtatatactacgagttggactactggtttagatcttgaaggtctttg 60
tttaccggatccaagttctattgtgtagcATGGTTTCGAGAACTCAGTCTATCTATG 120
                                     CYT6
1      M V S R T L S L S M
AGTCTATTCGGGCACACCTTGTCTTTTATCGGTGTGCTCTAAATCTAAATTCATCTTAT 180
11     S L F R A H L V F Y R C A L N L N S S Y
AATTTTGGTTTCTTAGTTGCAATGACCTTTGTACTCAAATAATTACAGGTATCACTCTA 240
31     N F G F L V A M T F V L Q I I T G I T L
GCGTTTAGATATACTTCTGAAGCATCTTGTGCATTGCTAGCGTTCAACATCTAGTTAGA 300
51     A F R Y T S E A S C A F A S V Q H L V R
GAAGTAGCAGCAGGATGGGAATTTAGGATGTTGCATGCTACAACAGCCTCTTTTGTATT 360
71     E V A A G W E F R M L H A T T A S F V F
TTGTGTATTTAATTCACATGACTCGAGGATTGTATAACTGGAGTTATAGTTATTTAACT 420
91     L C I L I H M T R G L Y N W S Y S Y L T
ACCGCTTGGATGTCTGGTTTAGTTTTATATTTACTTACTATAGCCACTGCCTTCCTCGGA 480
111    T A W M S G L V L Y L L T I A T A F L G
TATGTACTACCATGGGGACAATGAGTTTCTGGGGTGTACAGTCATTACAAACCTCCTT 540
                                     CYTA
131    Y V L P W G Q M S F W G A T V I T N L L
TCTCCAATACCATATTTGGTACCTTGGCTACTTGGAGGTTACTACGTATCTGATGTAACA 600
                                     CYT3
151    S P I P Y L V P W L L G G Y Y V S D V T
TTAAAACGATTCTTTGTATTACATTTTATCTTGCCTTTTATTGGTTGATTATAATAGTT 660
                                     CYT2
171    L K R F F V L H F I L P F I G C I I I V
TTACATATCTTCTATTTACATTTAATGGTCTAGCAATCCTGCAGGATTGATACCGCG 720
                                     CYT5
191    L H I F Y L H L N G S S N P A G I D T A
CTTAAAGTTGCCTTTTATCCTCATATGTTAATGACAGATGCTAAATGTCTATCCTATTTA 780
201    L K V A F Y P H M L M T D A K C L S Y L
ATTGGATTAATCTTCTTACAACGGGCTTTTGGTTTGATGGAACTATCACATCCAGATAAC 840
                                     CYT4
221    I G L I F L Q A A F G L M E L S H P D N
TCAATACCAGTCAACCGGTTCGTAACCACTTCATATCGTACCTGAATGGTATTTTCTA 900
                                     CYTB
241    S I P V N R F V T P L H I V P E W Y F L
GCATATTATGCGGTGTTAAAGTAATTCCATCAAAAACCGGTGGTTGTTTAGTATTTATG 960
261    A Y Y A V L K V I P S K T G G L L V F M
TCATCTCTGATTAATTTAGGTTTACTTTCTGAGATTCGAGCTTTAAATACCCGAATGTTA 1020
281    S S L I N L G L L S E I R A L N T R M L
ATTCGTCAACAGTTCATGACTCGAAATGTAGTCAGTGGATGGGTGATTATTTGGGTATAT 1080
301    I R Q Q F M T R N V V S G W V I I W V Y
AGTATGATCTTCTTGATTATTATAGGTAGTGCATTCCACAAGCAACATACATCTTATAT 1140
321    S M I F L I I I G S A I P Q A T Y I L Y
GGTAGATTAGCTACTATCTTATACCTTACTACCGGATTGGTTCTATGCTTATACTAAaac 1200
                                     CYT7
341    G R L A T I L Y L T T G L V L C L Y *
aacattgtaatgactacagcttccaagcaaac 1234

```

Figure 10: Séquence de l'ADNc codant pour le cytochrome b de *T. gondii*. Les séquences non codantes sont indiquées en minuscules. Les codons d'initiation et d'arrêt de la traduction sont en caractères gras. Les acides aminés traduits selon le code génétique mitochondrial des protozoaires sont précisés. Les zones soulignées correspondent aux séquences des différentes amorces utilisées. La séquence est enregistrée dans la banque de données GenBank sous le numéro d'accèsion AF015627.

L'extrémité 3' de l'ADNc a également été amplifiée, en deux PCR successives. La première étape, effectuée directement sur l'ADNc avec les amorces CYT3-AP1 a servi de matrice pour une seconde PCR utilisant le couple d'amorces internes CYT2-AP2 (tab. 5, fig. 10). Un fragment d'environ 610 pb a été amplifié puis cloné. La séquence nucléotidique confirmée sur trois clones a pu être traduite en 183 acides aminés. En aval du codon d'arrêt de la traduction (TAA), une courte séquence oligonucléotidique de 36 pb pouvant correspondre à l'extrémité 3' non traduite est également présente.

I. 3. L'ADNc entier codant pour le *cyt b* de *T. gondii*

Le séquençage des extrémités 5' et 3' a permis la reconstruction d'un ADNc de 1234pb présentant un cadre ouvert de lecture de 1107 pb (nucléotides 91 à 1197, fig. 10) codant pour une protéine de 368 acides aminés (fig. 10). Les amorces CYT6 et CYT7, correspondant respectivement aux codons d'initiation et d'arrêt de la traduction sont utilisées pour l'amplification de l'ADNc entier par RT-PCR. Trois clones sont séquencés sur les deux brins et permettent de proposer une séquence de l'ADNc du gène codant pour le *cyt b* de *T. gondii*. Le séquençage de l'ADNc du *cyt b* dans les trois souches PLK, 76K et RH n'a révélé aucune divergence nucléotidique indiquant que cette protéine est remarquablement conservée entre les différentes souches de *T. gondii*.

Une identité de séquence de 98% à 100% est trouvée entre notre ADNc (nucléotides 769 à 965 et 91 à 1) et le pseudogène nucléaire Rep3 (Ossorio, *et al.*, 1991). Puisque ces pseudogènes seraient très nombreux dans le génome de *T. gondii*, on peut penser que notre ADNc ait été amplifié à partir d'un pseudogène transcrit et dont la séquence, plus longue que Rep3, n'ait pas été décrite par Ossorio *et al.* Cependant, l'origine mitochondriale de notre ADNc est supportée par un pourcentage en base AT relativement élevé (64 %). Une telle déviation au niveau nucléotidique est généralement observée pour les gènes mitochondriaux (Gray, *et al.*, 1998) alors que les gènes nucléaires évoluent différemment. De plus, une protéine de 368 acides aminés peut être déduite de notre ADNc. Cette taille correspond à celle des *cyt b* caractérisés dans d'autres organismes, alors que les pseudogènes sont souvent tronqués et que des mutations empêchent généralement leur expression protéique. Il paraît donc fort probable que notre ADNc soit issu de l'ADNmt du toxoplasme.

Cette approche par RT-PCR a donc permis d'amplifier, pour la première fois, un bon candidat d'ARNm transcrit à partir d'un gène probablement situé sur le génome mitochondrial de *T. gondii*.

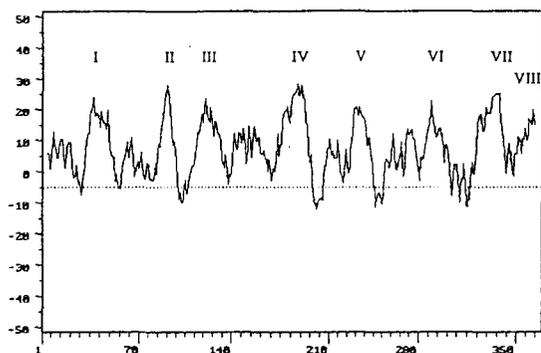
II. Caractérisation structurale de la protéine cyt b de *T. gondii*

II. 1. Analyse de la séquence primaire

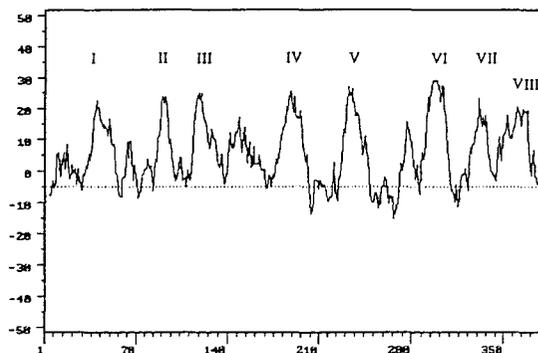
En utilisant le code génétique mitochondrial des protozoaires (PC/Gene[®]Release 18.0), la traduction en 368 acides aminés du cadre ouvert de lecture est obtenue (fig. 10). Ce code génétique associe le codon TGA au résidu tryptophane, au lieu de l'interpréter comme signal de fin de traduction (codon « stop »); ce qui est également le cas pour le code génétique mitochondrial utilisé chez les mammifères (Anderson, *et al.*, 1981). Le cytochrome b de *T. gondii* a une masse moléculaire théorique de 41 594 Da. La séquence protéique de 368 acides aminés est comparée aux séquences protéiques contenues dans les banques de données Swiss et PIR. Le cyt b de *T. gondii* présente la plus forte homologie avec le cyt b de *P. falciparum* (52,17% d'identité), contre seulement 36,96 % d'identité pour le cyt b de l'homme et 37,23% d'identité pour le cyt b de *S. cerevisiae*. L'alignement entre ces quatre séquences est proposé sur la figure 11. Parmi les acides aminés conservés entre les différentes espèces, quatre histidines (His-82, 96, 178 et 192) sont retrouvées. Ces histidines, localisées dans les domaines transmembranaires II et IV, sont séparées par 13 acides aminés et interviennent dans la liaison de l'hème. Les résidus Lys/Arg-99 et Arg-173 et les résidus Arg-79 et His/Arg-197 des différents cyt b sont également conservés et formeraient des ponts salins avec les chaînes propionates des protohèmes. Les résidus numérotés ci-dessus font référence à la séquence de *T. gondii*.

II. 2. Analyse du profil d'hydrophobicité

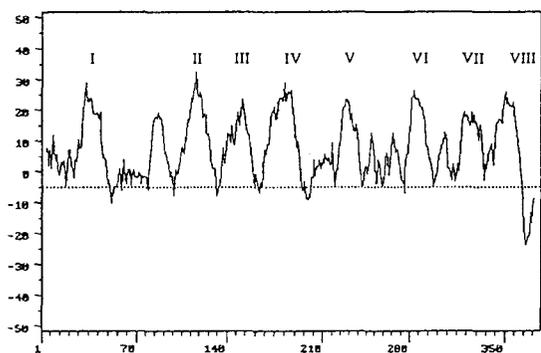
L'analyse des domaines transmembranaires selon les index d'hydrophobicité, calculés par la méthode de Klein, Kanehisa et DeLisi (programme SOAP, PC/Gene[®]Release 18.0), décrit 8 domaines transmembranaires pour le cyt b de *T. gondii* et le classe parmi les protéines



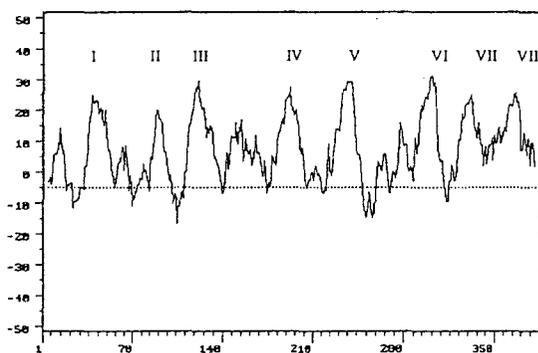
Toxoplasma gondii



Homo sapiens



Plasmodium falciparum



Saccharomyces cerevisiae

Figure 12 : Profils d'hydrophobicité des cytochromes b de *T. gondii*, *P. falciparum*, *H. sapiens* et *S. cerevisiae*. Les index d'hydrophobicité sont calculés à l'aide du programme SOAP (PC/GENE® Release 18.0) selon la méthode de Klein, Kanehisa et DeLisi. Pour chaque protéine, huit domaines transmembranaires sont définis (I à VIII).

intégrées dans les membranes. Les profils d'hydrophobicité réalisés avec les cyt b de *T. gondii*, *P. falciparum*, *H. sapiens*, et *S. cerevisiae* sont schématisés sur la figure 12. Les régions hydrophobes (partie supérieure du graphe) sont majoritaires dans les différents cyt b alors que les parties hydrophiles (partie inférieure du graphe) sont rares, confirmant une localisation membranaire de la protéine. En comparant les quatre profils d'hydrophobicité, on observe que les régions hydrophobes et hydrophiles sont situées dans les mêmes zones de la protéine. Ceci atteste d'une structure secondaire très conservée entre les cyt b de ces différentes espèces. Cependant, l'extrémité C-terminale du cyt b de *T. gondii* est tronquée en sa partie hydrophile et apparaît plus courte que les autres cyt b.

II. 3. Proposition de la structure 2D et des sites catalytiques du cytochrome b de *T. gondii*

La représentation de la structure bidimensionnelle du cyt b de *T. gondii*, en accord avec le modèle à 8 domaines transmembranaires, permet de visualiser les interactions des His-82 et His-178 avec l'hème b-566, et les interactions des His-96 et His-192 avec l'hème b-562 (fig. 13). Les acides aminés intervenant dans le site catalytique Q_o d'oxydation de l'ubiquinol (côté cytoplasmique) et intervenant dans le site Q_i de réduction de l'ubiquinone situé du côté de la matrice, sont indiqués.

L'alignement entre ces sites catalytiques Q_o et Q_i pour les cyt b de *T. gondii*, *P. falciparum*, *H. sapiens*, et *S. cerevisiae* sont indiqués sur la fig. 14. Les résultats obtenus confirment les observations de Vaidya *et al.* (Vaidya, *et al.*, 1993), à savoir des résidus moins conservés entre les différentes espèces pour le site Q_i comparativement au site Q_o . Les différences entre le site Q_i de *Plasmodium* et de l'Homme seraient à l'origine de la sensibilité naturelle de *Plasmodium* vis à vis des hydroxynaphtoquinones (Vaidya, *et al.*, 1993). De même, de nombreux acides aminés localisés dans ces deux sites sont impliqués dans la résistance aux inhibiteurs du complexe *b-c1* (di Rago and Colson, 1988 ; di Rago, *et al.*, 1986). Les acides aminés de ces deux sites attireront donc plus particulièrement notre attention dans l'analyse des mutants résistants à la 4-pyridone.

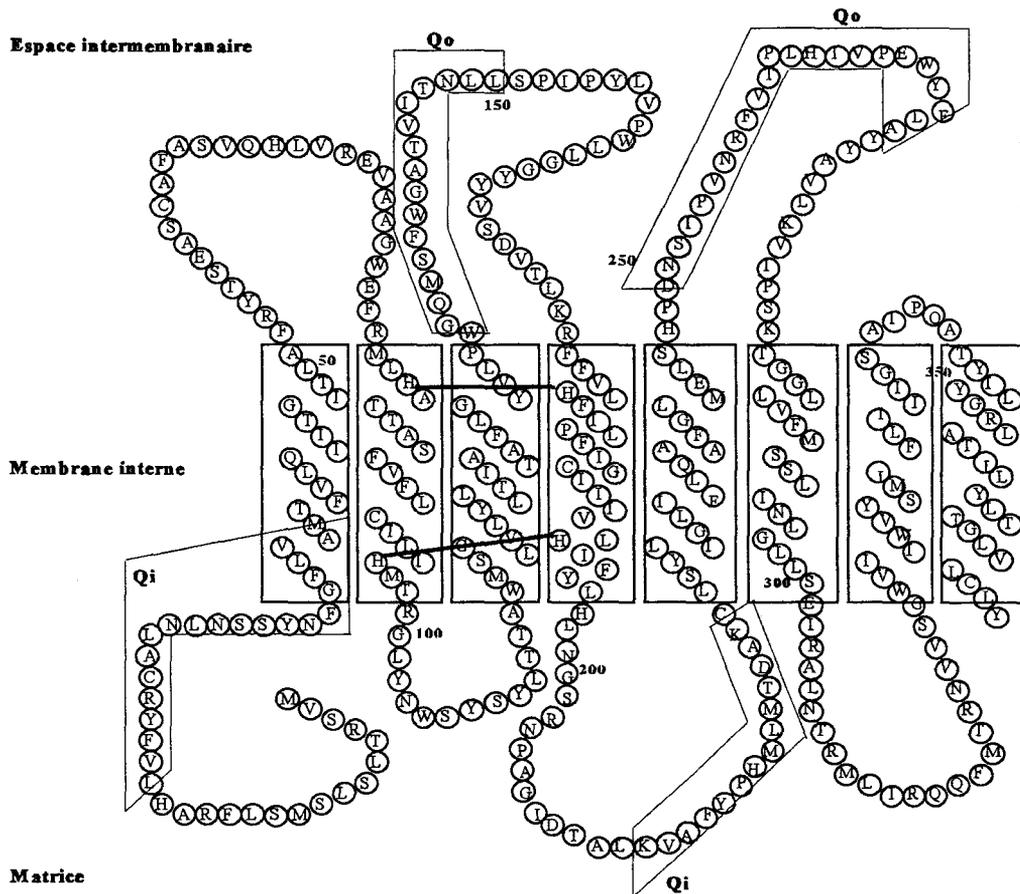


Figure 13: Structure bi-dimensionnelle du cytochrome b de *T. gondii*. Représentation schématique du cyt b de *T. gondii* selon le modèle à huit domaines transmembranaires. Les lignes joignent les résidus histidines intervenant dans la liaison des hèmes b-566 et b-562 et les acides aminés formant les sites catalytiques Qo et Qi sont précisés.

III. Etude de l'expression du *cyt b* chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes

III. 1. L'analyse transcriptionnelle du gène codant pour le *cyt b*

III. 1. 1. Analyse en Northern blot

L'expression de l'ARNm codant pour le *cyt b* est tout d'abord analysée par Northern blot (fig. 15-A). L'utilisation d'une sonde SCYTb de 258 pb (nucléotides 566-823) a ainsi mis en évidence la présence d'un seul ARNm d'environ 1 200 pb pour les tachyzoïtes des souches RH et PLK. La sonde utilisée est spécifique de *T. gondii*, puisque les ARNm des cellules hôtes HFF saines ne sont pas reconnus. La taille du transcrit observé par Northern blot (1,2 kb) correspond aux 1 234 pb séquencées et concorde avec des séquences 5' et 3' non traduites de taille réduite comme cela est généralement observé pour les gènes mitochondriaux.

III. 1. 2. Analyse par RT-PCR

La faible quantité de bradyzoïtes disponibles, empêche l'analyse des transcrits de ce stade parasitaire par Northern blot. L'expression de l'ARNm codant pour le *cyt b*, est donc comparée, chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes par RT-PCR.

Les tachyzoïtes de la souche 76K sont obtenus *in vitro* alors que les bradyzoïtes de cette souche sont issus de kystes *in vivo*. La spécificité des ARNm purifiés de tachyzoïtes et de bradyzoïtes a été vérifiée à l'aide des amorces SAG1S-SAG1AS et SAG4S-SAG4AS (tab. 5), spécifiques respectivement de la protéine SAG1 (P30) de tachyzoïtes et SAG4 (P18) de bradyzoïtes. La figure 15-B et C (piste 2 et 4) montre que les 975 pb du cadre ouvert de lecture de la protéine SAG1 ne sont amplifiées que chez les tachyzoïtes (fig. 15-B) alors que le fragment de 497 pb de l'ARNm de la protéine SAG4 n'est obtenu que chez les bradyzoïtes (fig. 15-C).

L'absence d'amplification avec les différents couples d'amorces, avant transcription inverse en ADNc confirme la digestion totale de l'ADN génomique contaminant (fig. 15-B, C, D, E, pistes 1 et 3). Ces amorces n'amplifient rien sur les ARNm de cellules HFF saines ou de cellules de cerveau de souris non infectées. Les fragments amplifiés (fig. 15-B, C, D, E, pistes 2 et 4) dans les deux stades du toxoplasme sont donc bien d'origine parasitaire.

A

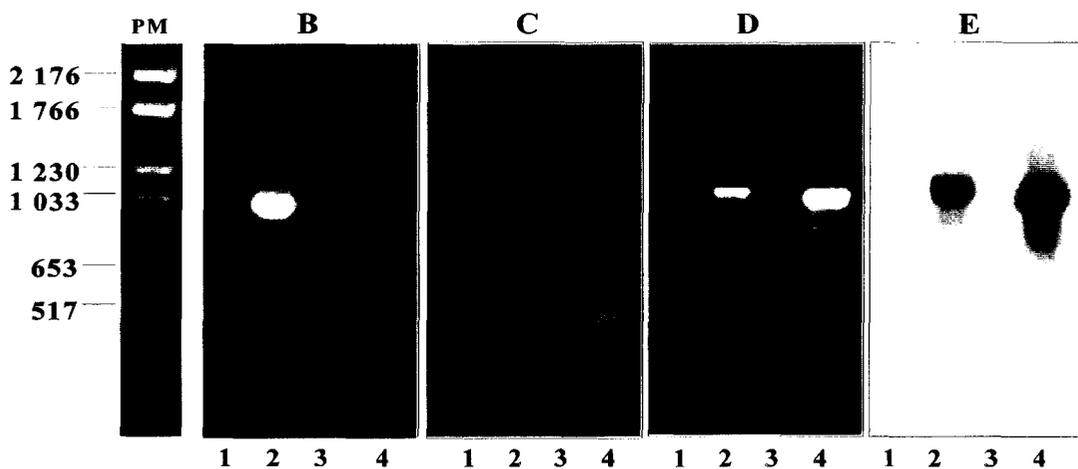
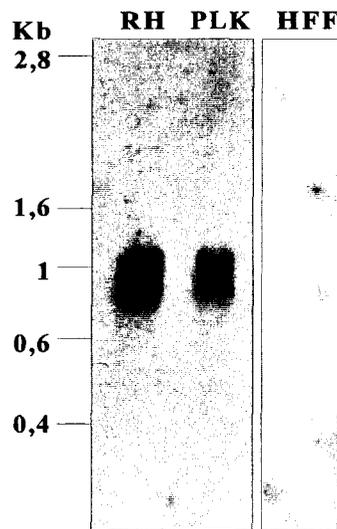


Figure 15: Etude de l'expression de l'ARNm codant pour le cytochrome b chez les tachyzoïtes et les bradyzoïtes.

A : Analyse en **Northern blot** des ARNm codant pour le cyt b de *T. gondii* chez les tachyzoïtes. La sonde SCYTb est hybridée sur les ARN totaux des tachyzoïtes des souches RH et PLK, et sur les ARN totaux des cellules HFF saines. La taille des transcrits est déterminée par rapport au marqueur de poids moléculaire.

B, C, D, E : Analyse par **RT-PCR** des ARNm codant pour le cyt b de *T. gondii* chez les tachyzoïtes et les bradyzoïtes. L'amplification de l'ARNm des protéines SAG1 (**B**) et SAG4 (**C**) permet de vérifier la spécificité des ARNm pour chacun des deux stades parasitaires. Les produits d'amplification du cyt b (**D**) sont confirmés en Southern blot (**E**). Les pistes 1 et 2 correspondent aux tachyzoïtes et les pistes 3 et 4 aux bradyzoïtes. Les PCR effectuées avant transcription inverse en ADNc sont présentées sur les pistes 1 et 3; les RT-PCR sont présentées sur les pistes 2 et 4. Les tailles sont comparées à celles du marqueur de poids moléculaire VI (PM, Boehringer Mannheim).

Les banques d'ADNc de tachyzoïtes et de bradyzoïtes, ainsi validées, ont servi de matrice pour l'amplification du cadre ouvert de lecture de 1107 pb du cyt b de *T. gondii* (amorces CYT6 et CYT7, tab. 5). Les produits d'amplification analysés en gel d'agarose (fig. 15-D) montrent l'existence d'un ARNm unique, amplifié par RT-PCR, dans ces deux stades parasitaires. Le transfert de ce gel sur une membrane de Nylon et son hybridation avec la sonde SCYTb (tab. 9) confirme que les produits d'amplification obtenus correspondent effectivement à l'ARNm codant pour le cyt b (fig. 15-E). Bien que de taille apparemment inférieure à celle observée chez les tachyzoïtes (piste 2), l'amplicon obtenu chez les bradyzoïtes est lui aussi reconnu par la sonde SCYTb (fig. 15-E, piste 4). Afin de vérifier que ce produit d'amplification est effectivement le cyt b et pour déterminer si des différences de séquences existent entre les deux stades parasitaires, le fragment d'environ 1000 pb, amplifié chez les bradyzoïtes a été cloné et séquencé. La séquence nucléotidique obtenue de 1107 pb est exactement identique à celle des tachyzoïtes.

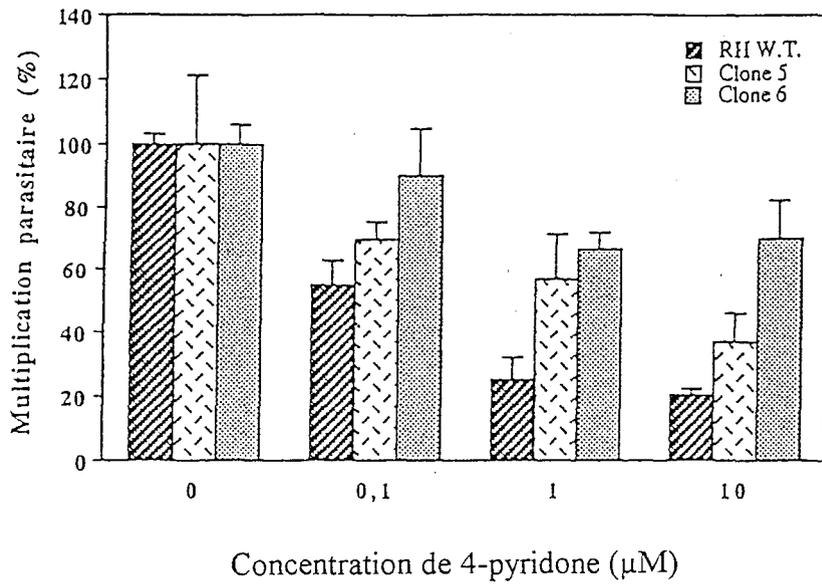
Ainsi, le gène mitochondrial codant pour le cyt b est transcrit à la fois dans les tachyzoïtes et les bradyzoïtes ; ce qui suggère que cette protéine essentielle à la formation du complexe *b-c1* de la mitochondrie de *T. gondii* existe dans les deux formes parasitaires.

III. 2. Expression au niveau protéique

L'expression au niveau protéique n'a pu être vérifiée. Le cyt b est une protéine très hydrophobe et différentes constructions pour la synthèse d'une protéine recombinante entière ou partielle ont échoué. L'absence d'outils immunologiques, y compris chez les systèmes hétérologues, ne permet pas d'établir si l'expression du cyt b de *T. gondii* est régulée au niveau post-transcriptionnel dans les différentes formes parasitaires.

Une approche indirecte a donc été utilisée, pour déterminer si la protéine cyt b est présente chez les tachyzoïtes. Des mutants résistants à la 4-pyridone ont été générés et l'implication du cyt b dans le mécanisme de résistance a été analysée. La 4-pyridone (laboratoire Wellcome, GB) dérive d'une drogue anticoccidique le clopidol et potentialise l'atovaquone dans les traitements contre les protozoaires *P. carinii*, *P. falciparum*, et *T. gondii*. Elle agirait, tout comme l'atovaquone *via* l'inhibition de la chaîne de transport des électrons (Pfefferkorn, *et al.*, 1993 ; Pudney, *et al.*, 1994). Ces deux drogues sont

A



B

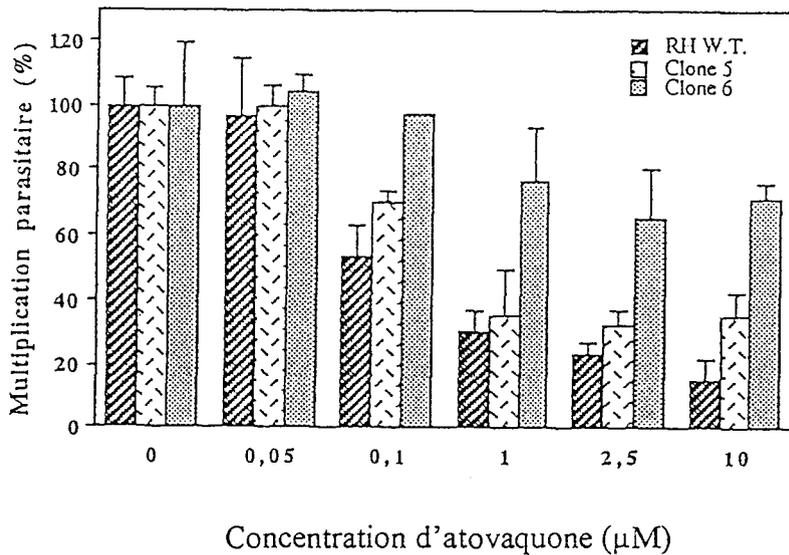


Figure 16: Etude de la sensibilité des clones 5 et 6 résistants à la 4-pyridone et de la souche sauvage RH vis à vis de la 4-pyridone (A) et de l'atovaquone (B). La multiplication parasitaire est mesurée par l'incorporation d'uracile tritiée. La valeur de référence (100%) correspond à la quantité de parasites obtenus en absence de drogue. Chaque concentration est testée dans trois puits indépendants.

particulièrement intéressantes puisque ce sont les seules substances, à la fois efficaces contre les tachyzoïtes et les bradyzoïtes (Araujo, *et al.*, 1991a ; Araujo, *et al.*, 1992a ; Pudney, *et al.*, 1994) et dont la cible potentielle serait la mitochondrie. Si des mutations au niveau de la séquence codante du cyt b sont corrélées au mécanisme de résistance à la 4-pyridone, alors la protéine cyt b est effectivement présente et constitue la cible protéique de la 4-pyridone.

Des mutants résistants à la 4-pyridone (mutants 4-pyridone^R) ont été générés par mutagenèse chimique aléatoire, à l'aide d'éthyl nitroso urée (200 µg/ml). Une sélection en présence de concentrations croissantes de 4-pyridone (0,5 µM; 1 µM; 5 µM), a permis d'obtenir deux mutants, respectivement 10 fois (clone 5) et 100 fois (clone 6) plus résistants à la 4-pyridone, comparativement à la souche sauvage RH (fig. 16-A). Ces deux clones sont spécifiquement résistants à la 4-pyridone et leur résistance n'implique pas un mécanisme de type Mdr (« Multi Drug resistance ») puisqu'ils restent sensibles à la puromycine.

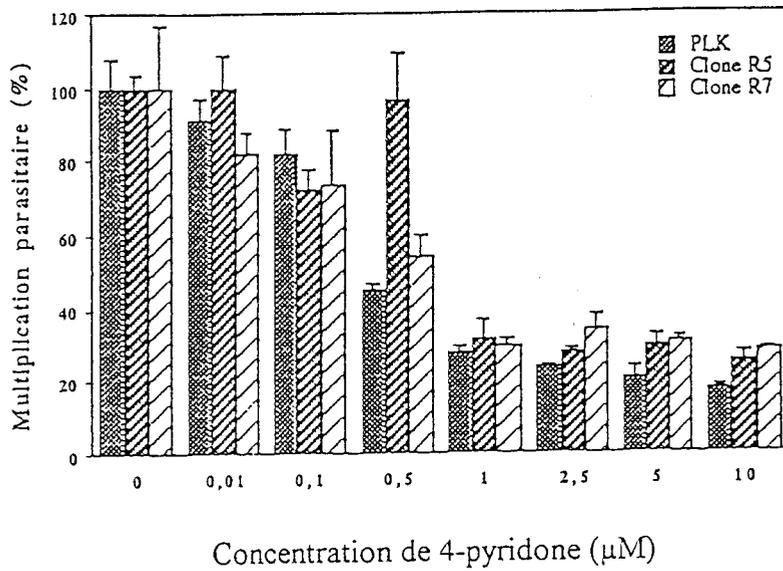
III. 2. 1. Etude de la sensibilité des mutants 4-pyridone^R vis à vis de l'atovaquone

Puisque la 4-pyridone et l'atovaquone agiraient *via* la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, nos mutants 4-pyridone^R sont également testés vis à vis de l'atovaquone. L'analyse, *in vitro*, s'effectue par incorporation d'uracile tritiée en présence de différentes concentrations d'atovaquone.

La figure 16-B montre que le clone 5 a une sensibilité identique à la souche RH pour l'atovaquone, alors que le clone 6, est résistant à l'atovaquone. En effet, à la concentration de 10 µM, le clone 6 présente une multiplication parasitaire d'environ 70%, contre 30% et 20% pour le clone 5 et la souche RH.

Ces résultats suggèrent tout d'abord que les clones 5 et 6 possèdent un mécanisme de résistance différent. De plus, le fait qu'un de nos mutants soit résistant à la fois à la 4-pyridone et à l'atovaquone suggère une cible protéique identique ou proche pour ces deux drogues. Or il a été démontré chez *P. falciparum* que l'atovaquone agirait au niveau du complexe *b-c1* (Fry and Pudney, 1992) et que la structure même du cyt b expliquerait la sensibilité du parasite pour l'atovaquone (Vaidya, *et al.*, 1993). L'analyse des mutants 4-pyridone^R semble donc

A



B

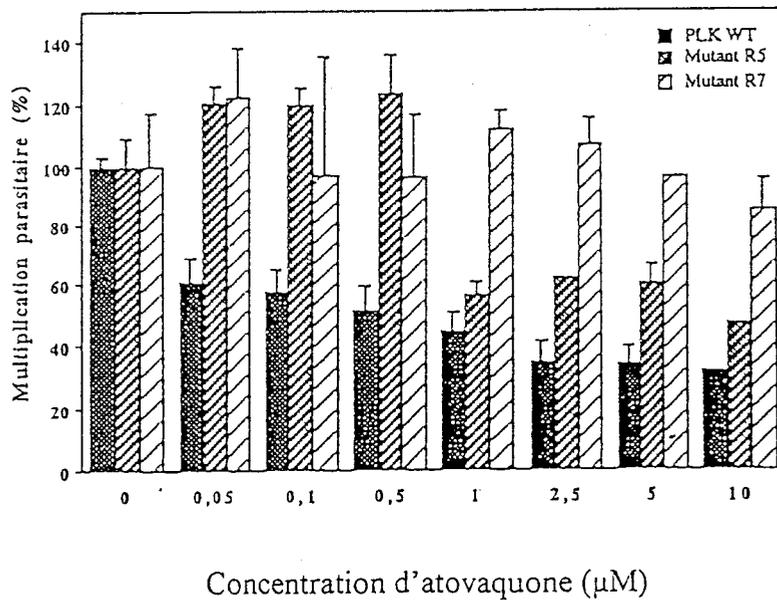


Figure 17: Etude de la sensibilité des clones R5 et R7 résistants à l'atovaquone et de la souche sauvage PLK vis à vis de la 4-pyridone (A) et de l'atovaquone (B). La multiplication parasitaire est mesurée par l'incorporation d'uracile tritiée. La valeur de référence (100%) correspond à la quantité de parasites obtenus en absence de drogue. Chaque concentration est testée dans trois puits indépendants.

représenter un outil qui permettrait de corréler la fonction protéique du *cyt b* de *T. gondii* et la résistance à cet inhibiteur.

III. 2. 2. Etude de la sensibilité de mutants atovaquone^R vis à vis de la 4-pyridone

Des mutants résistants à l'atovaquone (clones R5 et R7, atovaquone^R) générés, par Tomavo S. *et al.* (Tomavo and Boothroyd, 1995), par mutagenèse chimique à partir de la souche avirulente PLK ont été utilisés comme contrôle afin de vérifier s'ils sont résistants à la 4-pyridone. Les mutants R5 et R7 sont testés dans les mêmes conditions pour leur sensibilité vis à vis de la 4-pyridone (fig. 17-A) et vis à vis de l'atovaquone (fig. 17-B).

A la concentration maximale de 10 μ M d'atovaquone, le mutant R7 montre une multiplication parasitaire de 90% contre 50% pour le mutant R5 et seulement 35% pour la souche sauvage PLK (fig. 17-B). Lorsque les deux mutants sont testés contre la 4-pyridone (fig. 17-A), un ralentissement similaire de la multiplication parasitaire est observée pour les clones atovaquone^R et pour la souche PLK. En effet, dès 1 μ M de 4-pyridone, la multiplication parasitaire n'est plus que de 20% à 30% comparativement aux essais réalisés en absence de drogue (100%).

Il semblerait donc que la résistance des clones R5 et R7 atovaquone^R n'implique pas une cible protéique identique à celle de la 4-pyridone. Ceci rejoint les résultats observés avec le clone 5 résistant à la 4-pyridone et sensible à l'atovaquone. Selon les clones, les mutations peuvent affecter la cible protéique de la 4-pyridone ou de l'atovaquone et conduire à une résistance spécifique du parasite pour l'une de ces drogues.

III. 2. 3. La 4-pyridone et le cytochrome b

Puisque l'atovaquone agirait, chez *P. falciparum*, au niveau du *cyt b* et que notre mutant clone 6 est doublement résistant à la 4-pyridone et à l'atovaquone, nous avons vérifié, dans un premier temps, si le *cyt b* était impliqué dans la résistance à la 4-pyridone.

La séquence codante nucléotidique du *cyt b* (1107 pb) a été amplifiée par RT-PCR à l'aide des amorces CYT6 et CYT7, sur l'ARNm des mutants 5 et 6 résistants à la 4-pyridone. Pour chaque mutant, trois clones ont été séquencés sur les deux brins. Ces séquences,

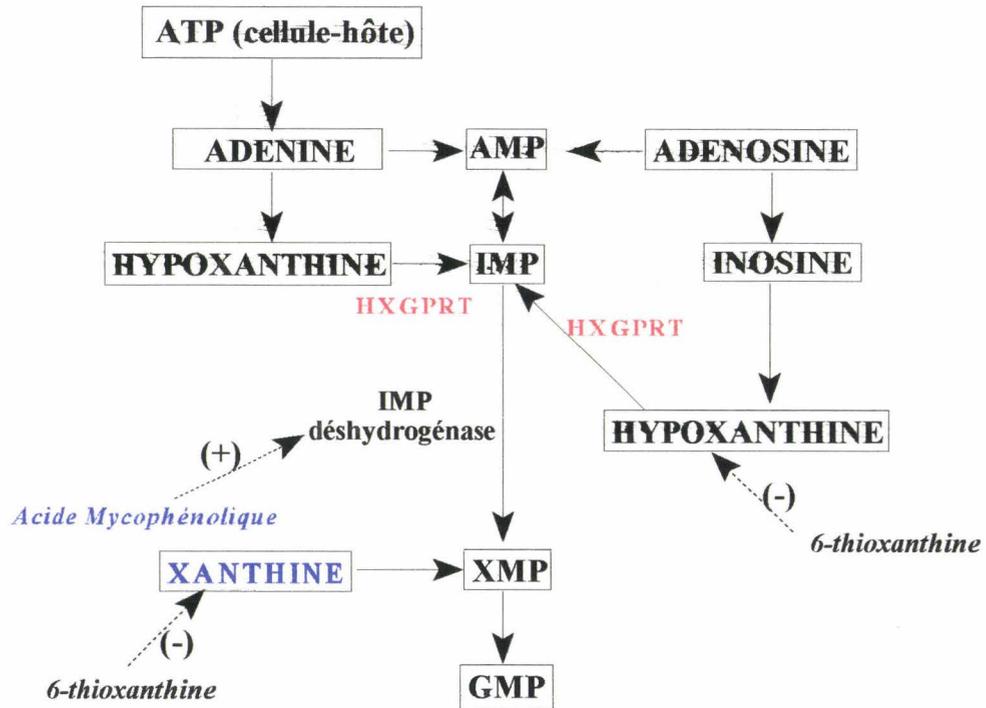


Figure 18: Voie métabolique des purines chez *T. gondii* (d'après Krug *et al.*, 1989). L'existence d'une souche de toxoplasmes déficients en HXGPRT (HXGPRT⁻) permet l'utilisation d'un double système de sélection. La 6-thioxanthine permet de sélectionner négativement les parasites ayant intégrés un plasmide contenant une cassette d'expression de la protéine HXGPRT (Roos *et al.*, 1994). La sélection positive s'effectue par l'acide mycophénolique en présence de xanthine.

AMP: Adénosine Monophosphate; IMP: Inosine Monophosphate; GMP: Guanosine Monophosphate; HXGPRT: Hypoxanthine Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase; ATP: Adénosine Triphosphate; XMP: Xanthine Monophosphate

comparées à celle du *cyt b* de *T. gondii* ne montrent aucune modification nucléotidique. A l'évidence, le *cyt b* n'est pas impliqué dans la résistance à la 4-pyridone. L'analyse de nos deux mutants ne nous permet donc pas de corrélérer des mutations sur la protéine *cyt b* à la résistance des tachyzoïtes de *T. gondii* pour la 4-pyridone.

L'absence de mutation sur la région codante du *cyt b* pour notre mutant doublement résistant à la 4-pyridone et à l'atovaquone démontre également que le *cyt b* ne peut expliquer à lui seul la sensibilité ou la résistance à l'atovaquone. Ceci n'est pas surprenant puisque l'atovaquone, homologue de l'ubiquinone, agit au niveau du complexe *b-c1*, et que ce complexe, en plus du *cyt b* comporte de nombreuses protéines. Des mutations sur d'autres protéines de ce complexe pourraient expliquer facilement pourquoi une résistance spécifique à la 4-pyridone ou à l'atovaquone est observée chez certains mutants (mutant 4-pyridone^R clone 5 et mutants atovaquone^R), alors que pour d'autres mutants, une double résistance est obtenue (mutant 4-pyridone^R clone 6).

Afin de déterminer le(s) gène(s) impliqués dans la double résistance de notre clone 6, la complémentation de la souche RH HXGPRT⁻ sensible à la 4-pyridone, par l'ADN génomique de ce clone 6 a été réalisée.

III. 2. 4. Complémentation de la souche RH HXGPRT⁻

L'ADN génomique du clone 6, présentant la double résistance à la 4-pyridone et à l'atovaquone a été partiellement digéré par l'enzyme de restriction *Sau* 3A. Les différents fragments, de 2 à 4 kb, ont été clonés dans le vecteur pHPT 0,5 au site *Bam* HI et la construction plasmidique a été électroporée dans la souche RH HXGPRT⁻.

La souche RH HXGPRT⁻ est un mutant nul de la souche RH, pour le gène codant l'enzyme HXGPRT. Cette enzyme non essentielle intervient dans la synthèse des purines (fig. 18). Lorsque l'IMP déshydrogénase est inhibée par l'acide mycophénolique, l'activité HXGPRT devient indispensable et les parasites survivent en synthétisant leurs purines à partir de la xanthine (Roos, *et al.*, 1994). Le vecteur pHPT 0,5 contient le gène de sélection HXGPRT.

Une première sélection, en présence d'acide mycophénolique et de xanthine a permis la sélection des parasites ayant reçu la construction plasmidique. Le plasmide, grâce à sa séquence EMS de réplication autonome est capable de se maintenir sous forme épisomale.

La 4-pyridone ou l'atovaquone ont ensuite été rajoutés et devraient permettre la sélection des parasites dont la construction plasmidique contient le gène responsable des résistances observées.

Alors qu'aucune population résistante n'a pu être sélectionnée en présence de 10 μM de 4-pyridone, des parasites résistants ont été obtenus en présence de 5 μM d'atovaquone. Ces toxoplasmes ont alors été prélevés et purifiés. Un microgramme de plasmide possédant le gène de résistance à la kanamycine a été rajouté au culot parasitaire avant extraction de l'ADN (Black and Boothroyd, 1998). L'ensemble est alors électroporé dans les bactéries *E. coli*. Un tapis bactérien est obtenu lorsque les bactéries sont étalées sur un milieu contenant de la kanamycine. Ce contrôle démontre une récupération efficace de l'ADN plasmidique au cours des étapes précédentes. En revanche, aucune colonie n'est obtenue en présence d'ampicilline alors que le gène codant pour la β -lactamase était présent sur le vecteur pHPT 0,5.

Ce travail n'a donc pas permis d'établir que la résistance à la 4-pyridone serait liée à une mutation sur le *cyt b*, ni de définir la protéine impliquée dans la double résistance à la 4-pyridone et à l'atovaquone. L'ensemble de ces résultats sera discuté et confronté à l'analyse des mutants résistants à l'atovaquone réalisée de façon concomitante par McFadden *et al.* (McFadden, *et al.*, 1999).

Chapitre II. Identification de la molécule chaperon Hsp60 de *T. gondii*

L'Hsp60 est une protéine codée par un gène nucléaire. Ce gène a été mis en évidence dans tous les organismes étudiés, y compris chez les eucaryotes dépourvus de mitochondrie (Roger, *et al.*, 1996) ou de compartiment énergétique (Roger, *et al.*, 1998). Ce chaperon est synthétisé dans le cytoplasme avant d'être importé, grâce à une préséquence N-terminale, dans la matrice mitochondriale. Cette protéine est essentielle à l'assemblage des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cheng, *et al.*, 1989).

T. gondii possède en plus de la mitochondrie, un second organite endosymbiotique : l'apicoplaste, résidu non photosynthétique d'un plaste (Köhler, *et al.*, 1997). Chez les plantes, il a été démontré qu'un chaperon moléculaire (Cpn60), également de 60 kDa, intervient dans les plastes pour l'assemblage des complexes protéiques (Vierling, 1991). La localisation de notre Hsp60 sera donc soigneusement vérifiée.

I. Obtention et caractérisation de l'ADNc codant pour l'Hsp60 de *T. gondii*

I. 1. Le clone 57 issu de la banque soustractive

La mise au point dans notre laboratoire, d'une technique efficace d'induction *in vitro* des bradyzoïtes a permis la construction d'une banque soustractive comprenant les ADNc des gènes majoritairement exprimés chez les bradyzoïtes (Yahiaoui, *et al.*, 1999). Le clone 57, issu de cette banque, possède un insert codant pour un peptide de 130 acides aminés. Ce peptide, comparé aux banques de données, est fortement homologue avec les Hsp60 mitochondriales des eucaryotes et des protéines GroEL procaryotes (Yahiaoui, *et al.*, 1999). Les amorces HSP1, 2, 3, 5 et 6 (tab. 5) sont choisies sur cet insert afin d'amplifier par la technique de RACE, les extrémités 5' et 3' de l'ADNc codant pour l'Hsp60 mitochondriale de *T. gondii* (fig. 19). La présence de l'ADNc codant pour l'Hsp60 dans la banque Marathon réalisée à partir de l'ARNm de tachyzoïtes est vérifiée, au préalable, par l'amplification d'un fragment de 213 pb à l'aide des amorces HSP6 et HSP3.

I. 2. Les extrémités 5' et 3' de l'ADNc codant pour l'Hsp60 de *T. gondii*

La technique des PCR emboîtées, utilisant successivement les couples d'amorces AP1-HSP1 et AP2-HSP3 a été nécessaire pour amplifier un fragment d'environ 600 pb. Cet amplicon a été sous-cloné et 5 clones ont été séquencés. Parmi ces 5 clones, 4 présentaient la même séquence de 587 pb alors que le 5^{ème} clone présentait une séquence de 599 pb. L'alignement des deux types de clones à l'aide du programme CLUSTAL a démontré que les deux séquences ne divergent que par leurs extrémités 5' de 174 et 186 pb, respectivement (fig. 19). La séquence 5', représentée par les 4 clones, présente un codon ATG (nucléotides 57 à 59, fig. 19) pouvant initier la traduction en une protéine, homologue à l'Hsp 60 de *P. falciparum*. En amont de ce codon, 56 nucléotides pourraient constituer l'extrémité 5' non traduite de l'ARNm.

L'obtention d'un seul amplicon correspondant à l'extrémité 3' de l'ADNc de l'Hsp60 de *T. gondii* a nécessité trois PCR emboîtées utilisant successivement les couples d'amorces AP1-HSP5, AP2-HSP6 et AP2-HSP2. Un fragment d'environ 2000 pb a ainsi été amplifié, purifié puis cloné. Cinq clones ont été séquencés. Ils présentent la même séquence de 1992 pb. Cette séquence correspond à l'extrémité 3' de l'ADNc codant pour l'Hsp60 de *T. gondii* puisque l'extrémité 5' de ce fragment est identique au clone 57 et que 381 acides aminés supplémentaires, homologues aux Hsp60 sont également observés. Au delà du codon stop (TAG) qui arrête la traduction, 646 nucléotides forment l'extrémité 3' non traduite.

Contrairement aux extrémités 5', une seule séquence 3' a été obtenue suggérant deux ADNc Hsp60 ne différant que sur une petite séquence (environ 180 pb) du côté 5'. Ces deux ADNc peuvent alors être reconstitués : un ADNc1 de 2430 pb et un ADNc2 de 2442 pb (fig. 19).

I. 3. Obtention de deux types d'ADNc

Afin de vérifier si les différents fragments d'ADNc (deux extrémités 5' pour une extrémité 3' parfaitement identique) correspondent effectivement à des ADNc entiers chez le parasite, les amorces HSP7, HSP8 et HSP9 (tab. 5) ont été utilisées pour l'amplification par

GGCGGCATGGGAGGCATGTAC	atgtttgccggttctaacaagcgatagagc	1815	GGGGGCATGGGAGGCATGGGAGGCATGTAC	atgtttgccggttctaaca	1815
HSP9			HSP9		
G G M G G M Y *		575	G G M G G G M G G M Y *		
caggtcaaaaacggagatgaaagggatctcagcgcttgagtaagagggcattttct	1870		aagcgatagagccaggtcaaaaacggagatgaaagggatctcagcgcttgagtaa	1870	
agcatgtgagagggacaggagcgctcaacaaaaattgtgggtgaaacgcgcagg	1925		gagggcatttctagcatgtgagagggacaggagcgctcaacaaaaattgtgggt	1925	
ttgtttttaaccgatgagctgttcgggtttcccttggatccctttgctccgg	1980		tgaacgcgcaggttgtttttaaccgatgagctgttcgggtttcccttggatcc	1980	
tggatctgctggcagggagcctcgatgagctttctcgggacgtcgtgcccgtgt	2035		tttgctccgggtggatctgctggcagggagcctcgatgagctttctcgggacgt	2035	
gtgttcttttgaacaagcaagagagctgttttggagaggggggagctgt	2090		cgtgcccgtgtgtgtttcttttgaacaagcaagagagctgttttggagag	2090	
ttcgcttagatgggaagtcaacgctgtgtagacacgcacacgacaaaattcatcg	2145		aggggggagctgttctgcttttagatgggaagtcaacgctgtgtagacacgcacacg	2145	
ttgtaagaaaagctaacacagacaccggaaatgccagcgaggaggatggacacaa	2200		acaaattcatcgttgaagaaaagctaacacagacaccggaaatgccagcgagga	2200	
ccgcccgtcagtgaaacgcatactacgtgttggagggtttgggcccacaatct	2255		ggatggacacaaaccgcccgtcagtgaaacgcatactacgtgttggagggtttg	2255	
gttatgttggtggggttcgctgcatggagtgctggatattctacggaatcta	2310		ggccccaatctgttatgttggtggggttcgctgcatggagtgctggatatt	2310	
gaggggggtgcctccgtgctgtgccagggcaggaaccctgcagacgggtgcacg	2365		ctacggaatctagaggggggtgcctccgtgctgtgccagggcaggaaccctgc	2365	
cgaaactcttccgcccatcgagccgtgaaaaagaccgaattttctgctaa	2420		agacgggtgcacgcgaacatcttccgcccatcgagccgtgaaaaagaccgaat	2420	
tccgatggt	2430		ttttctgctaatccgatggt	2444	

Figure 19: Séquences des deux ADNc de l'Hsp60 de *T. gondii* et traduction en acides aminés. Les séquences non codantes sont indiquées en minuscules. Les séquences divergentes entre les deux ADNc sont en caractères gras. Les zones soulignées correspondent aux séquences des différentes amorces utilisées. Pour les deux ADNc, les méthionines initiatrices de la traduction et les codons stop sont encadrés par un rectangle grisé. Les étoiles (*) symbolisent l'arrêt de la traduction. Seul l'ADNc1 présente un cadre ouvert de lecture et peut être traduit en une protéine de 575 acides aminés. Les différents motifs favorisant l'initiation de la traduction dès le premier codon ATG sont encadrés. Les acides aminés N-terminaux basiques sont dans une ellipse grisée et le motif C-terminal GGM, caractéristique des Hsp60 mitochondriales est encadré. Les séquences sont enregistrées dans la banque de données GenBank sous les numéros d'accèsion AF065609 (ADNc1) et AF065610 (ADNc2).

PCR à partir d'une banque d'ADNc de tachyzoïtes. Les amorces HSP7-HSP9 amplifient un fragment de 1784 pb, alors que le couple HSP8-HSP9 amplifie un fragment de 1698 pb. Les deux ADNc présentent une identité de séquence de 96,05% (fig. 19). L'ADNc1 possède un cadre ouvert de lecture de 1728 pb (nucléotides 57 à 1784, fig. 19). En revanche, pour l'ADNc2, un codon ATG, précédé d'un codon stop (TAG) et en phase avec la séquence codante identique à l'ADNc1, est immédiatement suivi d'un nouveau codon d'arrêt de la traduction (TAA, nucléotides 135-137, fig. 19). Deux hypothèses peuvent être envisagées : ou l'ADNc2 ne code pas de protéine, ou il code pour une protéine tronquée, initiée par un codon différent du codon ATG et donc sans méthionine N-terminale.

L 4. Caractérisation de l'ADNc1 codant pour l'Hsp60 de *T. gondii*

Le pourcentage en base AT de l'ADNc1 est de 42% ; ce qui concorde avec les pourcentages habituellement trouvés pour les gènes nucléaires de *T. gondii*. Les 1728 pb du cadre ouvert de lecture de l'ADNc1 peuvent être traduites en une protéine de 575 acides aminés selon le code génétique universel (fig. 19). Deux méthionines (acides aminés 1 et 38, fig. 19) sont présentes du côté N-terminal et pourraient initier la traduction de l'Hsp60 de *T. gondii*. Chacune de ces deux méthionines peut d'ailleurs, selon les critères définis par von Heijne (programme TRANSPEP, PC/Gene[®]Release 18.0), initier un peptide signal d'importation dans la mitochondrie de 25 acides aminés. Cependant, seule la première méthionine bénéficie d'un contexte d'initiation plus favorable car son codon ATG est précédé de 3 adénines, en position -1, -2, -3 et d'une guanine en position -6 (Kozak, 1989 ; Seeber, 1997). De plus, une région riche en bases thymine, présente dans les régions 5' non traduites de gènes de *T. gondii* tels que l' α -tubuline (Nagel and Boothroyd, 1988), la β -tubuline (Nagel and Boothroyd, 1988), *gra5* (Lecordier, *et al.*, 1993), *gra6* (Lecordier, *et al.*, 1995) et *sag1* (Burg, *et al.*, 1988) est retrouvée en amont de la première méthionine (fig. 19). En revanche, aucune de ces caractéristiques ne précède la seconde méthionine. La traduction débiterait donc dès la première méthionine pour donner une protéine de 575 acides aminés.

Le site de polyadénylation serait à environ 646 pb du codon d'arrêt de la traduction. Ce site est déduit de l'analyse du fragment 3'RACE dont l'extrémité 3' est hybridée avec une amorce oligo dT modifiée (« Marathon cDNA synthesis primer »). Le signal de polyadénylation des eucaryotes AAUAAA, normalement présent à 30 pb en amont de la queue

```

T. gondii      ML  ARASRV      AKCNPGVVFVRHASS -KEIRFGCDARNQMLAGCNRLADAVGVTLGPKGRNVVIEQP YGSPKIKTDGVTVAKSI EELGNRMMNL 91
P. falciparum MI  STLRGKIFNNGSNRNCVSI LSNIQKRNIS -KDIRFGSDARTAMLTGCNKLADAVSVTLGPKGRNVVIEQSFSGPKIKTDGVTVAKSI EFNKLANL 98
Z. mays       MYRAAASLASKARQAGSSSAARQVGSRLAWSRYAA -KDIKFGVEARALMLRGVBE LADAVKVTMGPKGRNVVIEQSFSGAPKVTGDKGVTVAKSI EFKDRVKNV 102
S. cerevisiae MLR  SSVVRSRATLRPLLRAYSSHKELKFGVEGRASLLKGVETLABAVAATLGPKGRNVVIEQFPFPKIKTDGVTVAKSI VLKDKFENM 90
H. sapiens    MLRLPTVF  ROMRPVSKVLAPHLT  RAYA -KDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRVTVIEQSWGSPKVTGDKGVTVAKSI DLKDKYKNI 93
E. coli       M  AAKDVKFGDARAVKMLRGVNVLADAVKVTLGPKGRNVVLDKSFQAPTITKDGVSVAIRELEBDFKFNEM 69
*
GAQLVQVASTTNDIAGDGTTTATLLARAI FREGCKAVDAGMNPMDLLRGINLAVEKVLHLNSVTKNVTTSEEI FNVATISANGDKVIGKLIADAMEKVGRDGTITVSEKGLTHE 208
GAQMVKQVAANTNGKAGDGTTTATILARSIFQQGCKAVDSGMNPMDLLRGINKGVKLVLELYNSIKKDVTTTSEEI FNVASIS NGDKNIGQLIADTMKVKGKGGTITVTEGKTLQHE 214
GASLVQVANATNDTAGDGTTCATVLTKAIFTEBGKSVAAAGMNMDLRRGISMAVDVAVTNLKGMAIMSTSEB EIAQVGTISANGEREI GBLIAKAMEKVKGKGGVITADGNTLYNE 219
GAKLLQEVASKTNEAAGDGTTSATVLRGAI FTESVKNVAAGCNMMDLRRGSQVAVEKVI EFLSANKKEIITTSEE IAVQVATISANGDHSVHVKLLASAMEKVKGKGGVITIREGRTLEDE 207
GAKLVQDVANNTNEAAGDGTTTATVLRARSIAKEGFEKISKGANPVEIRRGVMLADAVIAELKKQSKPVTTP EEBIAQVATISANGDKEIGNIISDAMKVKVGRKGVITVKDKKTLNDE 210
GAQMVKEVASKANDAAGDGTTTATVLAQAI ITEGLKAVAAGMNPMDLKRGRIDKAVTAAVEBELKALSVP CSDSKAIAQVGTISANSDET VGLKIAEAMKVKGKGGVITVEDGTGLQDE 186
*
LELV EGLKFD RGYISPYFITNSKEQKVELEKPFVLLYDKRISSVKSI LVPVLEFIVQNGSLLI I AEDVDSEALATMVVNKLRGLKICAVKAPGFGDHRKAMLHDI AVMTGGQVVT 325
LEIFVEGLKFD RGYISPYFINNS--QKVELDKPYLIIHEKKISTVKSL LPELVLEHVLQNSLLVIAEDVDSDALATLIVNKLRLGLKICAVKAPGFGHEHRKALHDI AVMTGAKVITE 329
LEVVEGMKLD RGYISPYFITNSKAQKCELEDPLI LHDKVYTNMHAVVVKVLEMAKLRQRP LLI VAEVDSEALGTLII NKLRAKIKVCAVKAPGFGFNKRANQLDLA I LTGGEVITE 336
LEVTEGMRFD RGFISPYFITTPKSSVVEFBKPLLLLSEKKISSIQDILPALEISNQSRRL LLI I AEDVDGEALAACILNKLKRGQVVKCAVKAPGFGDNRKNTIGDI AVLTGGTVFTE 324
LEIIEGMKFD RGYISPYFITNTSKGQKCEFDQAVYLLSEKKISSIQSIVPALEITANARHPKLV I I AEDVDGEALSTLVNLRKVLQVAVKAPGFGDNRKNTLQDMATATGGAVFGE 327
LDVVEGMQFD RGYLSPYFINKPETGAVBLESPFILLADKKSINI REMLVLEAVAKAGKPLLI I AEDVEGEALATAVVNTIRGIVKVAAVKAPGFGDRKAMLQDIATLTGGTVISE 303
*
ETGGSLEDAHQMPQLGRAKSVTVTKDITLIVIEGGRKATIDERCDQIRVSMEQTHSD_YEKEKLERLARMTGGVAVIKVGGASEVEVEGAEKDRIQDALCATKAAVEEGIVPGGGT 441
ETGLKLLDDP_QVVSYLKAKSINVTKDSITLIMEGEGKKEEINERCE SIRNAIKMNTSD_YEKEKLERLAKITGGVALIKVGGISEVEVNEIKDRIQDALCATKAAVEEGIVPGGGS 444
E_LGMNLENVEPHMLGSCCKVTVSKDDTVILDGAGDKKSI ERADQIRSAVENSTSD_YDKEKLERLAKLSGGVAVLKIGGASEAEVGEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVPGGGV 450
E_LDLKPEQCTIENLGS CDSITVTKEDTVILNGSGPK EAIQERIEQIKGSIDIITTTNSYEKELQERLAKLSGGVAVIRVGGASEVEVEGKDRYDDALNATRAAVEEGIVPGGGT 439
E_GLTNLNLEDVQPHDLGKVGVEVITKDDAMLLKGGKQAIEKRIQEIIEQLDVTTSE_YEKEKLNERLAKLSGDAVAVLKVGGTSDVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLGGGC 442
EIGMEL_EKATLEDLQAKRVINKDTTITIDGVGEEAAIQGRVAQIRQIEBATS_DYREKLERVAKLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKDRVEDALHATRAAVEEGIVPAGGGV 417
*
ALLYASSETLKIETTYDQKVGIVRNACKQPKCTIADNAGHEGAVVGNLLREADPT_KGFNAQTGEYVDMMAAGIIDPTKVVKTALS DAASVASIMTTEAAVVEAKEEKPDE 556
ALLFASKELDSVQTDNYDQRVGVNIKDACKAPIKQIAENAGHEG SVVAGNLIKDKNSN_IGFNAQEGKYVDMIESG IIDPTKVVKTALSDAASIASIMTTEVAIVDFKDSKNEE 559
ALLYASKELDKLQ TANFDQKIGVQIIQNALKTPVHTIASNAGVEGAVVVGKLEQQGNTDL_-GYDAAKDEYVDMVKAGIIDPLKVRTALVDAASVSSLMTTTESIIVEIPKEEAPA 565
ALVKASRVLDSLVNDFDQKLGVDIIRKAITRPAKQIIE NAGBEGSVIIGKLI DEYGDFAKGYDASKSEYTDMLATG IIDPFKVVRSGLVDAASGVSLLATTEVAIVDAP EPPAAA 556
ALLRCIPALDSLTPANEDQKIGIEIKRITLKIIPAMTIAKNAGVEGSLIVEIKIMQSSSEV_YDAMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALDAGVASLLTTEAVVVEIIPKEEKDP 556
ALIRVASKLADLRQNEQNVGIKVALRAMEAPLRQIVLNGCEP SVVANVT_KGGDGNV_-GYNAATEEYGNMIDMGIIDPTKVRTALQYAA SVAGLMTTECVMTDLPKNDAAD 531
*
PMGGGMEMGGMGGGGMGY 575
SSQHMSVNSMGMG MGY 577 (67.65%)
PA_MGGMGGND_Y 576 (60.00%)
GAGGM_PGGMFGMPG_MM 572 (57.34%)
GMGAM_GGMGGMGGGMF 573 (54.97%)
_LGAAGMGGMGM_GGMM 548 (55.11%)

```

Figure 20: Aligment des séquences protéiques des Hsp60 de *T. gondii*, *P. falciparum*, *Z. mays*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens* et de l'homologue bactérien GroEL d'*E. coli*. L'aligment est réalisé à l'aide du programme CLUSTAL (PC/Gene). Les pourcentages d'identités, comparativement à la séquence de *T. gondii* sont précisés entre parenthèse. Les acides aminés identiques aux 6 séquences sont représentés par une étoile (*). Les points (.) correspondent aux acides aminés homologues. Pour les séquences eucaryotes, les peptides signaux d'importation dans la mitochondrie sont indiqués en caractères gras. La séquence consensus à activité ATPasique est encadrée.

polyA n'est pas trouvé sur notre séquence. Ce site, consensus chez les eucaryotes n'a jamais été identifié chez *T. gondii* et les gènes α -tubuline (Nagel and Boothroyd, 1988), sag1 (Burg, *et al.*, 1988), et sag4 (Ödberg- Ferragut, *et al.*, 1996) en sont par exemple dépourvus.

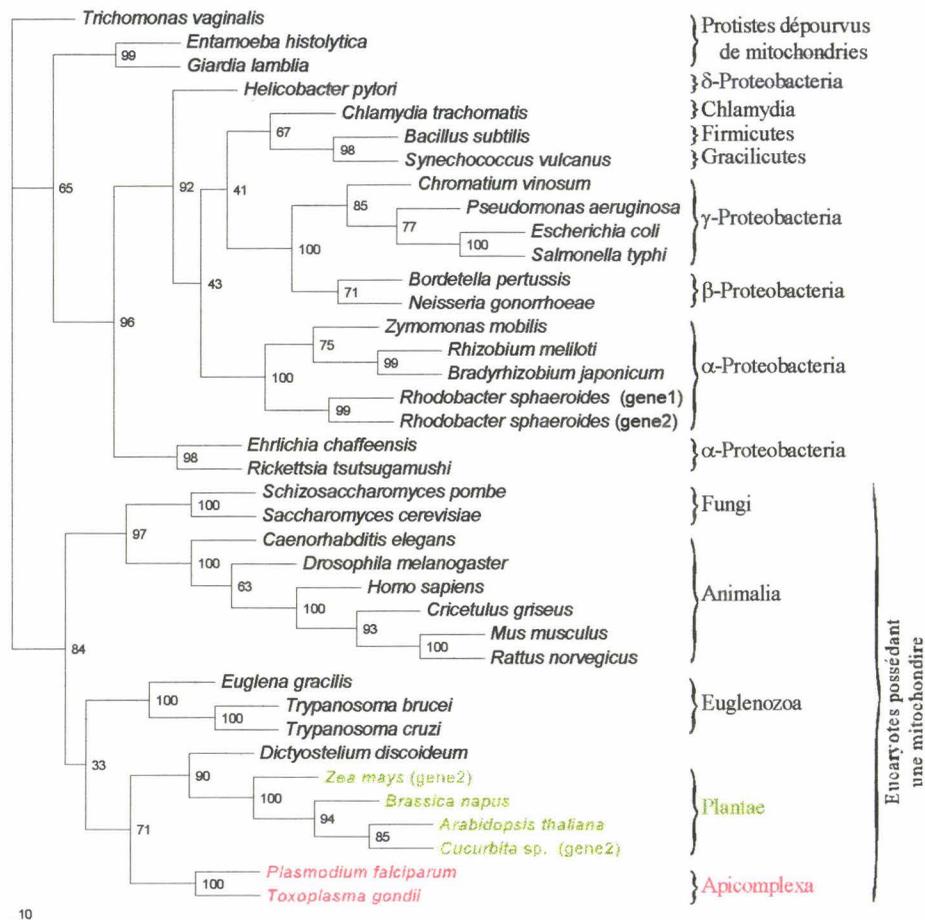
II. La protéine Hsp60 de *T. gondii*

II. 1. Caractérisation de la protéine Hsp60

La protéine de 575 acides aminés traduite de l'ADNc1 a une masse moléculaire théorique de 60 013 Da, et un point isoélectrique calculé pI de 7,48. La taille de l'Hsp60 de *T. gondii* correspond à la taille des Hsp60 des autres eucaryotes (fig. 20). Elle contient, à son extrémité C-terminale, le motif GGM répété sous la forme GGMxxGGMxGGMGGM (fig. 19). Ce motif GGM est spécifique des protéines Hsp60 mitochondriales et de leur homologue bactérien GroEL. Les seules exceptions observées concernent l'Hsp60 du protozoaire *Leishmania* (n° d'accèsion Q94596), et les Hsp60 des protistes dépourvus de mitochondrie *Giardia lamblia* et *Entamoeba histolytica* (n° d'accèsion AF029695 et AF029366). L'extrémité N-terminale, contient de nombreux résidus basiques Arg, Lys et His (fig. 19) capables de former une hélice α amphiphile. Ces acides aminés sont spécifiquement retrouvés, en position N-terminale chez toutes les protéines Hsp60 d'eucaryotes et forment un signal d'importation dans la mitochondrie.

Les chaperons Hsp60 ou GroEL, assistent la maturation des protéines et des complexes protéiques grâce à l'hydrolyse d'ATP. Un site consensus présent chez de nombreuses protéines à activité ATPasique est [K/R]-x₄-G-x₄-G-K-[T/G/S]-x₆-[I/V] (la barre indique les différents acides aminés possibles et le x, n'importe quel acide aminé). Une séquence similaire à ce consensus existe chez l'Hsp60 de *T. gondii* bien que l'espacement ne soit pas strictement identique : K-x₄-G-x₆-G-K-T-x₇-V (acides aminés 190 à 212). Les autres protéines présentées sur la figure 20, contiennent également une séquence peptidique proche de ce motif.

Les régions homologues entre la séquence de l'Hsp60 de *T. gondii* et celle des autres organismes sont distribuées sur toute la longueur du polypeptide, excepté dans la région N-terminale où les 26 premiers acides aminés ne présentent pas d'homologie avec les séquences des autres eucaryotes. Cette région, absente de la séquence procaryote d'*E. coli* concorderait



10

Figure 21: Arbre phylogénique représentant les protéines Hsp60. L'analyse phylogénique est obtenue selon la méthode de "Neighbor Joining", à partir de l'alignement de 38 séquences issues des banques de données GenBank (GB) et Swiss-Prot (SP).

Eucaryotes possédant une mitochondrie: *P. falciparum*, GB: U38963; *Cucurbita* sp, SP: Q05046; *A.thaliana*, SP: P29197; *B. napus*, SP: P35480; *Z. mays*, SP: Q43298; *D. discoideum*, GB: U72247; *T. cruzi*, SP: Q95046; *T. brucei*, SP: Q37683; *E. gracilis*, SP: Q39727; *R. norvegicus*, SP: P19227; *M. musculus*, SP: P19226; *C. griseus*, SP: P18687; *H. sapiens*, SP: P10809; *D. melanogaster*, SP: O02649 ; *C. elegans*, SP: P50140; *S. cerevisiae*, SP: P19882; *S. pombe*, SP: Q09864; **α-Proteobacteries:** *R. tsutsugamushi*, GB: M31887; *E. chaffeensis*, GB: L10917; *R. sphaeroides* (gene 1), SP: P20110; *R. sphaeroides* (gene 2), SP: P95647; *B. japonicum*, SP: P77829; *R. meliloti*, SP: P35471; *Z. mobilis*, SP: P48220; **β-Proteobacteries:** *N. gonorrhoeae*, SP: P29842; *B. pertussis*, SP: P48210; **γ-Proteobacteries:** *S. typhi*, SP: P48217; *E. coli*, SP: P06139; *P. aeruginosa*, SP: P30718; *C. vinosum*, SP: P31293; **Gracilicutes:** *S. vulcanus*, GB: M58751; **Firmicutes:** *B. subtilis*, GB: M81132; **Chlamydies:** *C. trachomatis*, GB: M31739; **δ-Proteobacteries:** *H. pylori*, SP: P42383; **Protistes dépourvus de mitochondries:** *G. lamblia*, GB: AF029695; *E. histolytica*, GB: AF029366; *T. vaginalis*, GB: U57000.

avec le peptide signal d'importation prédit par le programme TRANSPEP. L'extrémité C-terminale semble également plus divergente puisqu'on y observe moins d'acides aminés identiques ou similaires. L'Hsp60 de *T. gondii* présente un fort pourcentage d'identité avec les séquences de *P. falciparum* (67,60%), *Z. mays* (60%) et *H. sapiens* (54,97%). Cette protéine mitochondriale est également très proche de son homologue bactérien GroEL puisque 55,1% d'identité sont trouvés entre les séquences de *T. gondii* et *E. coli*. Après *P. falciparum*, l'Hsp60 de *T. gondii* est plus proche des Hsp60 mitochondriales des plantes supérieures par rapport aux autres eucaryotes. Les pourcentages d'identité sont effectivement de 60% avec *Z. mays*, 60,87% avec *Cucma* sp. et 59,65% avec *A. thaliana* contre 54,97% avec *H. sapiens* et 57,34% avec *S. cerevisiae*. Aucune protéine plastidiale Cpn60 n'a montré une homologie suffisamment élevée avec notre protéine Hsp60. La protéine Cpn60 de *P. falciparum* (Holloway, *et al.*, 1994) ne présente par exemple que 32,52% d'identité avec l'Hsp60 de *T. gondii*.

La protéine Hsp60 est universelle parmi les procaryotes et les eucaryotes et présente une séquence particulièrement bien conservée entre les différents phyla (fig. 21). L'Hsp60 de *T. gondii* a donc été utilisée pour analyser la position phylogénique du toxoplasme. L'alignement de 38 séquences correspondant aux protéines Hsp60 ou GroEL a montré que les régions N-terminales des séquences eucaryotes associées aux peptides signaux d'importation dans la mitochondrie ne présentent aucune homologie entre elles. Seuls les polypeptides matures, dépourvus de leur préséquence (20 à 30 acides aminés) seront donc pris en compte pour l'étude phylogénique. De même, l'extrémité C-terminale (environ 20 acides aminés) est peu homologue entre les différents organismes et nécessite de nombreux espacements pour optimiser l'alignement. Cette région est également exclue de l'analyse phylogénique. L'analyse phylogénique réalisée selon la méthode des matrices de distance « Neighbor Joining » permet d'obtenir l'arbre présenté sur la figure 21. Cet arbre présente deux grands groupes : les eucaryotes possédant une mitochondrie et les procaryotes. L'origine monophylétique de la mitochondrie est retrouvée et les α -Protéobactéries du type Ehrlichia/Rickettsia dont l'organite dériverait (Andersson, *et al.*, 1998 ; Gray, 1992) forme un groupe séparé des autres procaryotes et plus proche des eucaryotes. L'Hsp60 de *T. gondii* est clairement associée à l'Hsp60 de *P. falciparum* et ces deux Apicomplexa forment avec les plantes supérieures un clade monophylétique. Des résultats phylogéniques similaires sont obtenus avec les deux autres méthodes « Maximum likelihood » et « Maximum parsimony ». Cette analyse phylogénique

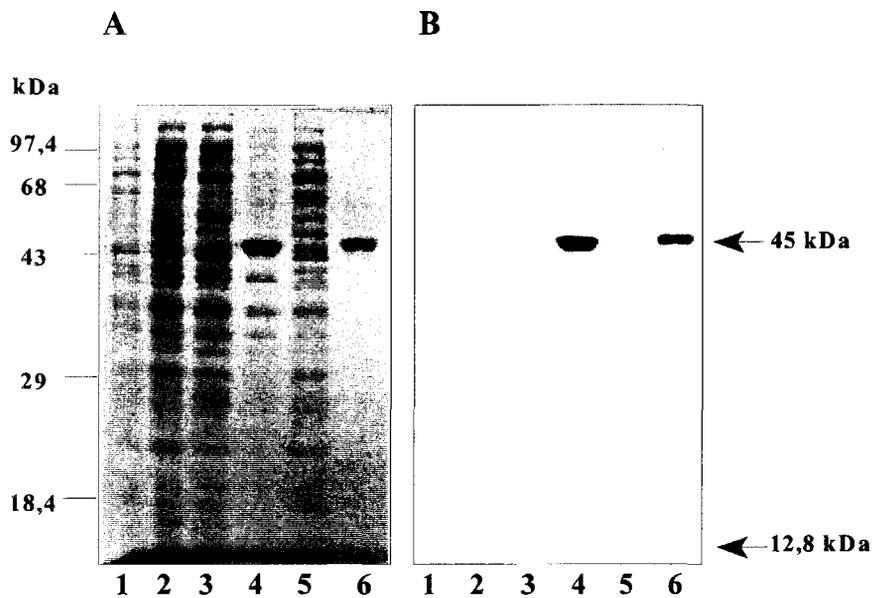


Figure 22: Expression d'une protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60. Electrophorèse en gel SDS-PAGE 10% en conditions non réductrices (A) et immunoempreinte révélée par l'anticorps anti-thioredoxine (B).

- (1) bactéries non induites ayant reçu le plasmide natif HP-thioredoxine
- (2) bactéries induites ayant reçu le plasmide natif
- (3) bactéries non induites ayant reçu le plasmide HP-thioredoxine/Hsp60
- (4) fraction insoluble (culot) des bactéries induites ayant reçu le plasmide HP-thioredoxine/Hsp60
- (5) fraction soluble des bactéries induites ayant reçu le plasmide HP-thioredoxine/Hsp60
- (6) protéine recombinante après électroélution

démontre ainsi l'origine endosymbiotique de la chaperonine Hsp60 de *T. gondii*, et supporte une origine monophylétique avec l'Hsp60 des plantes supérieures.

II. 2. Obtention d'un sérum polyclonal anti-Hsp60

Production et purification de la protéine recombinante

L'extrémité C-terminale (285 AA) de l'Hsp60 de *T. gondii*, fusionnée à l'HP-thioredoxine (12,8 kDa), a été produite dans *E. coli*. La thioredoxine, permet la purification de la protéine recombinante, par chromatographie d'affinité sur colonne de Nickel. Des bactéries ayant reçu le plasmide natif HP-thioredoxine sont utilisées comme témoin. Après induction, les protéines totales sont analysées en gel SDS-PAGE et par immunoempreinte. Les résultats, présentés sur la figure 22, montrent qu'une protéine d'environ 12,8 kDa, reconnue par l'anticorps anti-thioredoxine, est exprimée dans les bactéries induites (fig. 22-A et B, piste 2) comparativement aux bactéries non induites (fig. 22-A et B, piste 1).

Les fractions solubles et insolubles du clone ayant reçu la construction plasmidique HP-thioredoxine/Hsp60 sont également analysées en gel SDS-PAGE et par immunoempreinte. La figure 22-A montre, sur la piste 4, qu'une protéine recombinante d'environ 45 kDa est effectivement induite, comparativement aux bactéries non induites déposées comme témoin sur la piste 3 et qu'elle contient l'HP-thioredoxine (fig. 22-B). Cette protéine n'est pas exprimée chez les bactéries ayant reçu le plasmide natif codant pour l'HP-thioredoxine (fig. 22-A et B, pistes 1 et 2). La protéine de 45 kDa, induite par l'IPTG correspond effectivement à la fusion de l'HP-thioredoxine de 12,8 kDa avec un peptide exogène d'environ 32 kDa de l'extrémité C-terminale de l'Hsp60 de *T. gondii*. Cette protéine recombinante est insoluble et se retrouve dans le culot (fig. 22-A et B, piste 4). Une induction à 17°C permet d'éviter la précipitation de la protéine recombinante et de la récupérer, après lyse des bactéries, dans le surnageant soluble. La purification de la protéine recombinante sur colonne de Nickel a alors été entreprise selon le protocole proposé par Invitrogen. Cependant, en dépit de nombreuses modifications, aucune purification satisfaisante n'a pu être réalisée et la protéine recombinante a toujours été obtenue en présence de nombreuses protéines bactériennes contaminantes. C'est pourquoi, la production massive de la protéine recombinante à 37°C, suivie d'une migration électrophorétique en conditions dénaturantes puis d'une purification par électroélution de la

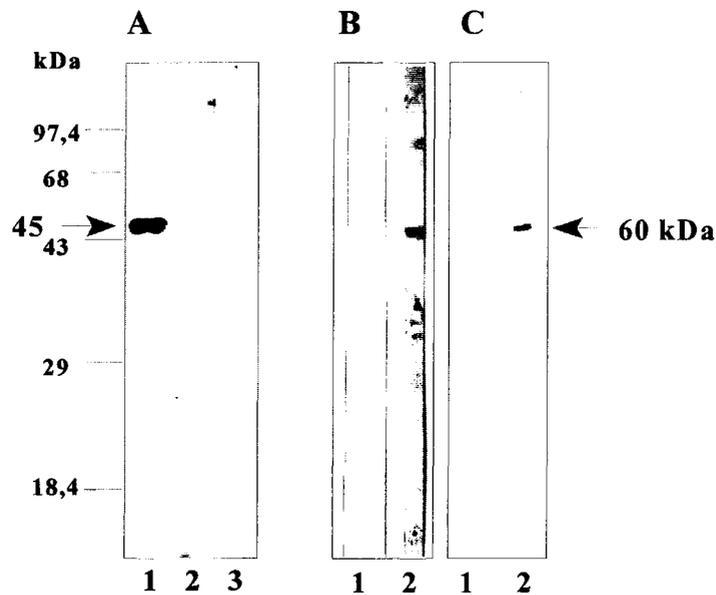


Figure 23 : Analyse du sérum anti-Hsp60 de *T. gondii* par immunoempreinte. Les protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE 13% en conditions réductrices. La membrane de nitrocellulose est ensuite hybridée par le sérum pré-immun (pistes 1, B et C) ou par le sérum anti-Hsp60 de *T. gondii* dilués au 1/5000è.

A Hybridation avec le sérum anti-Hsp60

- (1) protéine électroéluée
- (2) cellules HFF
- (3) cellules de cerveau de souris saines

B Hybridation sur les protéines totales de *T. gondii* (tachyzoïtes 76K)

- (1) sérum pré-immun
- (2) sérum anti-Hsp60

C Hybridation sur les protéines totales d'hématies parasitées par *P. falciparum*

- (1) sérum pré-immun
- (2) sérum anti-Hsp60

protéine de 45 kDa a été préférée. Les figures 22-A et B, piste 6, montrent la protéine recombinante pure après l'électroélution.

Obtention d'anticorps polyclonaux anti-Hsp60 chez la souris

Des souris ont été immunisées avec la protéine recombinante électroéluée et les sérums polyclonaux ont été testés par immunoempreinte. La figure 23-A montre que le sérum polyclonal reconnaît la protéine recombinante de 45 kDa (piste 1). Ce sérum ne reconnaît ni les cellules HFF saines (fig. 23-A, piste 2), ni les cellules de cerveau de souris non infectées (fig. 23-A, piste 3). Une bande d'environ 63 kDa est reconnue par le sérum anti-Hsp60 sur un profil de protéines totales provenant de tachyzoïtes purifiés (fig. 23-B, piste 2). Le signal est spécifique puisqu'aucune bande n'est obtenue avec le sérum pré-immun (fig. 23-B, piste 1). Enfin, le sérum reconnaît une bande d'environ 58,4 kDa sur un profil de protéines totales d'hématies parasitées par *P. falciparum* (fig. 23-C, piste 2). A nouveau, le signal est spécifique puisque le sérum pré-immun ne reconnaît aucune protéine sur les hématies parasitées par *P. falciparum* (fig. 23-C, piste 1). Cette réaction croisée entre le sérum anti-Hsp60 de *T. gondii* et la protéine de *P. falciparum* concorde avec la forte identité de séquence protéique trouvée entre les Hsp60 de ces deux Apicomplexa. Les tailles de ces deux protéines, observées en gel SDS-PAGE, concordent avec la masse moléculaire apparente comprise entre 58 et 64 kDa des molécules homologues à la protéine GroEL (McMullin and Hallberg, 1987).

II. 3. Le peptide signal d'importation

L'ADNc1 codant pour la protéine Hsp60 possède à son extrémité N-terminale, deux codons ATG, séparés par 108 pb. Seul le premier ATG présente un environnement favorable à l'initiation de la traduction et servirait de codon d'initiation de la traduction. Cependant, chacune des deux méthionines est suivie d'acides aminés basiques (Arg, His, Lys), pouvant former, d'après le programme TRANSPEP (PC/GENE[®] Release 18.0), une préséquence d'importation dans la mitochondrie (fig. 24). Afin de déterminer la séquence minimale effectivement requise pour l'importation de la protéine Hsp60 dans la mitochondrie de *T. gondii*, des délétions en 5' et en 3' des 62 premiers acides aminés sont effectuées. Les préséquences (PS1 à PS5), sont obtenues par PCR, sur l'ADNc1 codant pour l'Hsp60 de *T. gondii*. Elles sont clonées dans le vecteur d'expression pT/70, entre le promoteur du gène

A

WT MLARASARVAKCNP⁺GNVFQ⁺VRHASSKEIRFGCDARNQMLAGCNRLADAVGVT⁺LGPKGRNVVI⁺

PS1 -MLAGCNRLADAVGVT⁺LGPKGRNVVI⁺-

PS2 -MLARASARVAKCNP⁺GNVFQ⁺VRHASS-

PS3 -MLARASARVAKCNP⁺GNVFQ⁺VRHASSKEIRFGCDARNQ-

PS4 -MLARASARVAKCNP⁺GNVFQ⁺VRHASSKEIRFGCDARNQMLAGCNRLADAVGVT⁺LG-

PS5 -MLARASARVAKCNP⁺GNVFQ⁺VRHASSKEIRFGCDARNQMLAGCNRLADAVGVT⁺LGPKGRNVVI⁺-

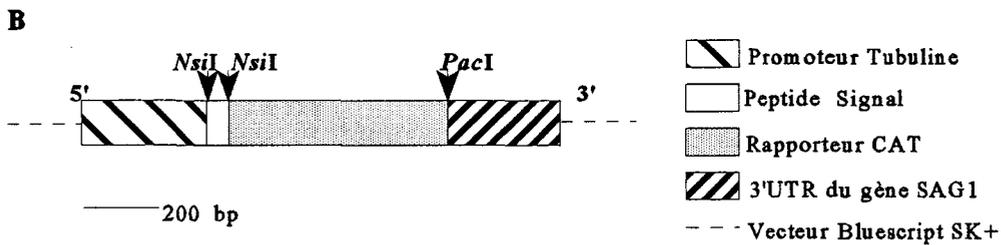


Figure 24: Constructions plasmidiques pour le ciblage de l'enzyme CAT. A: Les acides aminés basiques de l'extrémité N-terminale de l'Hsp60 de *T. gondii* (séquence WT) sont indiqués par un signe plus (+). Des délétions en 5' et en 3' permettent d'obtenir par PCR les peptides signaux PS1 à PS5. Ces peptides signaux sont ensuite clonés en phase, dans le plasmide pT/70 (schématisé en B), au site *Nsi* I, en amont du gène codant pour l'enzyme rapporteur CAT et sous le contrôle du promoteur du gène codant pour l' α -tubuline.

de l' α -tubuline et la protéine rapporteur CAT (fig. 24). Les constructions plasmidiques sont ensuite électroporées dans les tachyzoïtes.

L'activité enzymatique du rapporteur CAT est tout d'abord détectée par chromatographie sur couche mince des produits acétylés. Des produits monoacétylés sont observés, à la fois pour le plasmide contrôle pT/70 et pour les cinq constructions plasmidiques utilisées (fig. 25). Ceci démontre d'une part que nos constructions plasmidiques permettent l'expression de la protéine CAT, et d'autre part que cette enzyme est fonctionnelle, en dépit des préséquences de 25 à 62 acides aminés, ajoutées à son extrémité N-terminale. De plus, nous avons pu montrer que la protéine est dans une conformation mature, ce qui permet sa détection en immunofluorescence indirecte.

La localisation de l'enzyme CAT est alors analysée par immunofluorescence indirecte chez les tachyzoïtes ayant été transfectés de façon transitoire par les différentes constructions plasmidiques (fig. 26, photos 2 et 4). Les images correspondantes, visualisées en contraste de phase sont présentées sur les photos 1 et 3. Une immunofluorescence localisée, dans un organite tubulaire complexe, est observée pour les constructions plasmidiques PS4-CAT et PS5-CAT (photo 2). En revanche, les parasites transfectés de façon transitoire par les constructions PS1-CAT, PS2-CAT, et PS3-CAT montrent la même immunofluorescence diffuse (photo 4). Ce signal diffus dans tout le toxoplasme est retrouvé avec le plasmide natif pT/70, utilisé comme témoin de l'expression cytoplasmique de la protéine CAT. Tous ces résultats sont résumés dans le tableau ci-après.

Constructions plasmidiques	Localisation cytosolique	Localisation dans un organite
pT/70 natif	+	-
PS1	+	-
PS2	+	-
PS3	+	-
PS4	-	+
PS5	-	+

Tableau 2: Localisation de la protéine rapporteur CAT. Les parasites transfectés de façon transitoire par le plasmide natif pT/70 et les constructions plasmidiques PS1-CAT à PS5-CAT

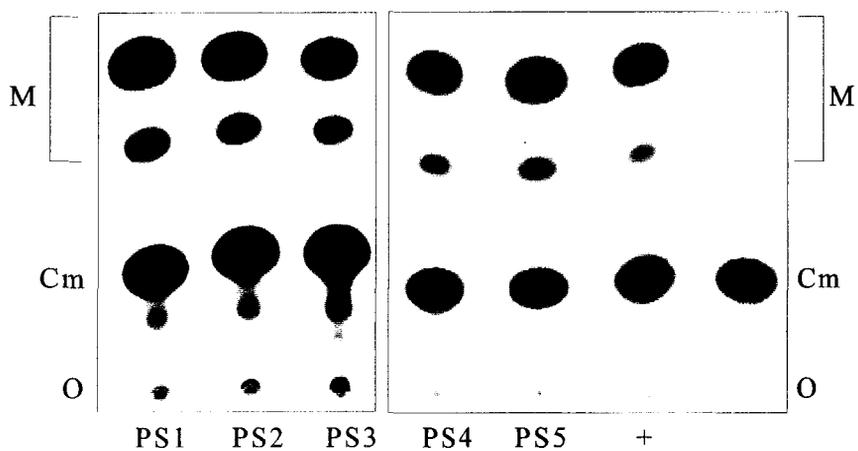


Figure 25: Activité de l'enzyme CAT par chromatographie sur couche mince. L'activité CAT de lysats de tachyzoïtes transfectés avec les constructions PS1 à PS5 est analysée en comparaison avec le plasmide natif pT/70 (+). Le contrôle négatif (-) correspond aux tachyzoïtes électroporés en absence de plasmide et analysés dans les mêmes conditions. La migration du chloramphénicol non acétylé (Cm) et de ses deux formes monoacétylées (M) est représentée par rapport au dépôt (O).

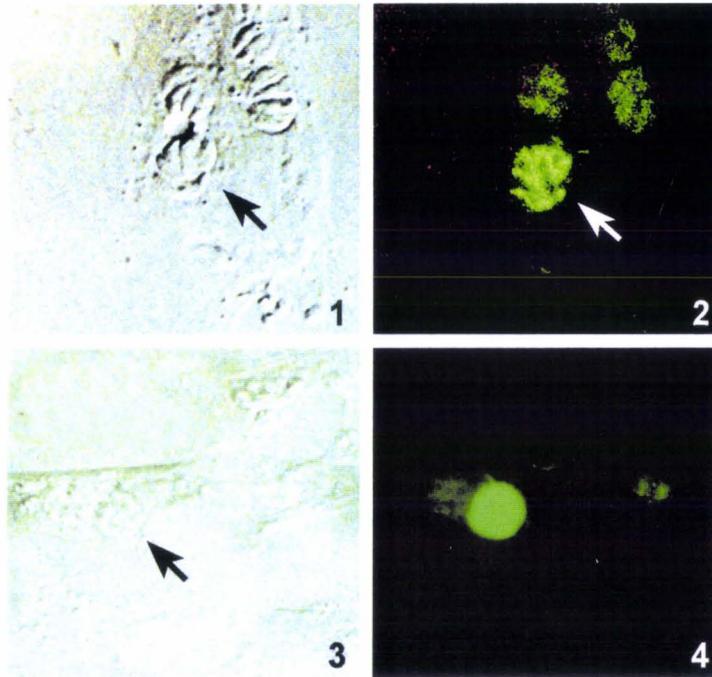


Figure 26: Localisation de l'enzyme CAT par immunofluorescence indirecte chez les tachyzoïtes transfectés de façon transitoire par les constructions plasmidiques PS1-CAT à PS5-CAT. La protéine CAT est détectée par l'anticorps anti-CAT et par un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine.

1 : Tachyzoïtes intracellulaires transfectés par les constructions plasmidiques PS4-CAT et PS5-CAT. L'image en contraste de phase correspond à la photo 2.

2 : Le rapporteur CAT est localisé dans un organe tubulaire complexe chez les tachyzoïtes transfectés par les constructions plasmidiques PS4-CAT et PS5-CAT.

3 : Tachyzoïtes intracellulaires transfectés par les constructions plasmidiques PS1-CAT à PS3-CAT ou par le plasmide natif pT/70. L'image en contraste de phase correspond à la photo 4.

4 : La protéine CAT montre une localisation diffuse dans tout le cytoplasme des tachyzoïtes transfectés par les constructions plasmidiques PS1-CAT à PS3-CAT ou par le plasmide natif pT/70.

sont analysés en immunofluorescence indirecte. La localisation cytoplasmique ou dans un organe tubulaire complexe est symbolisée par le signe plus (+) et l'absence de localisation par le signe moins (-).

Ainsi, les 62 premiers acides aminés (PS5) sont capables de cibler l'enzyme CAT dans un organe tubulaire et ramifié, qui est la mitochondrie de *T. gondii* (Seeber, *et al.*, 1998 ;Sinai, *et al.*, 1997). La première méthionine initie effectivement la traduction, puisque les acides aminés 38 à 62 (PS1) ne forment pas de préséquence d'importation dans la mitochondrie. Enfin, les délétions effectuées en 3' des 62 premiers acides aminés, démontrent que les 25 (PS2) et 37 (PS3) premiers acides aminés sont insuffisants pour l'importation de la protéine CAT dans la mitochondrie. Il apparaît que les 54 premiers acides aminés (PS4) représentent le peptide signal pour l'importation *in vivo* de l'Hsp60 dans la mitochondrie de *T. gondii*.

II. 4. Co-localisation de la protéine endogène Hsp60 avec le rapporteur CAT

Pour confirmer la localisation de la protéine CAT *in vivo*, des tachyzoïtes transformés de manière stable par le vecteur PS4-CAT (nommés PS4-CAT) ont été produits. La localisation du rapporteur CAT et de la protéine endogène Hsp60 a été analysée par immunofluorescence indirecte et par fractionnement cellulaire sur gradient de saccharose.

La technique de double immunofluorescence est présentée sur la figure 27. La photo 1 est observée en contraste de phase. La photo 2 confirme la localisation de la protéine CAT dans la mitochondrie parasitaire comme décrit précédemment lors de la transfection transitoire (fig. 26). La même image est observée pour la protéine endogène Hsp60 (photo 3) lorsque les mêmes parasites sont incubés avec l'anticorps polyclonal spécifique de l'Hsp60 de *T. gondii* (cf le paragraphe II. 2. p. 71). L'observation simultanée des deux protéines permet une superposition strictement identique des signaux d'immunofluorescence (photo 4). Ce résultat démontre une localisation identique pour l'Hsp60 de *T. gondii* et la protéine exogène CAT fusionnée au 54 premiers acides aminés de l'Hsp60.

De plus, ces parasites PS4-CAT ont été soumis au fractionnement cellulaire en gradient de saccharose et les différentes fractions collectées, a, b, c, et d (fig. 28-A) ont été analysées en

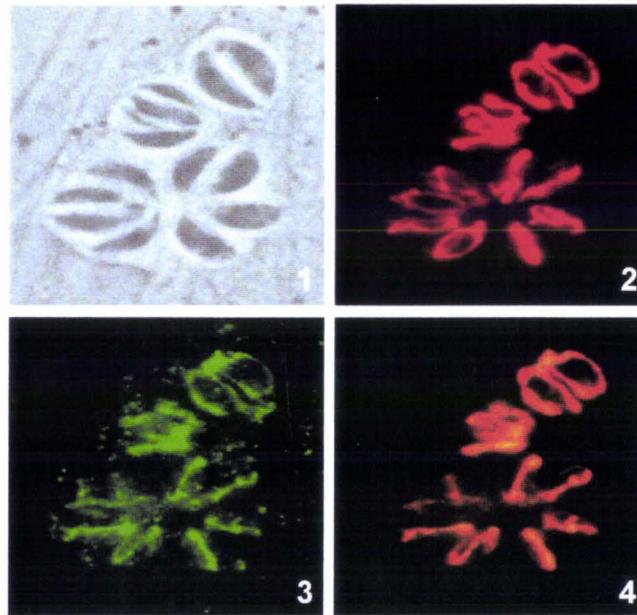


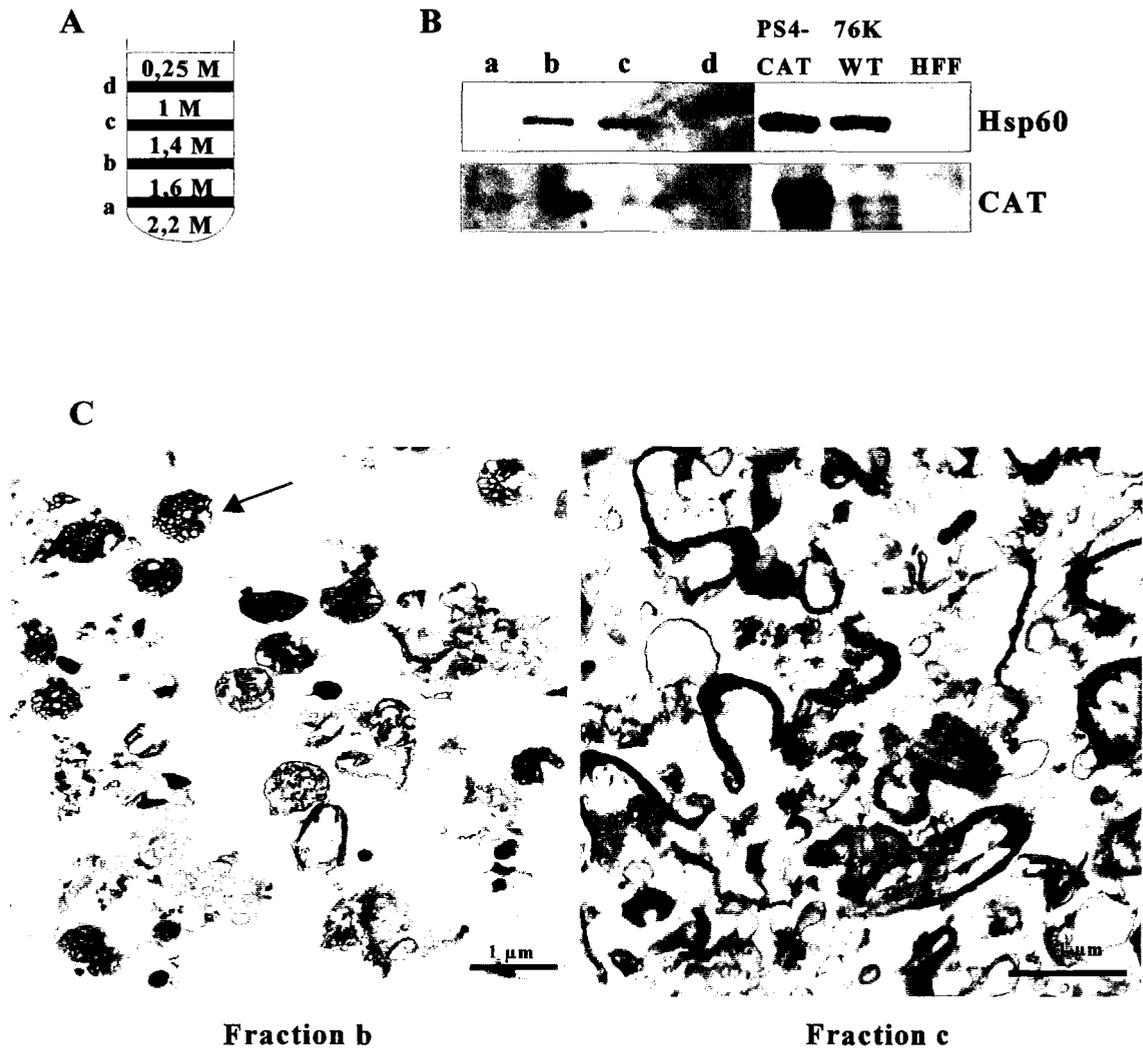
Figure 27: Co-localisation de la protéine endogène Hsp60 avec le rapporteur CAT.

1 : Les tachyzoïtes intracellulaires transfectés de façon stable par la construction PS4-CAT sont observés en contraste de phase.

2 : Le rapporteur CAT est mis en évidence dans un organe tubulaire complexe. Le sérum polyclonal de lapin anti-CAT est révélé par un conjugué anti-immunoglobines de lapin couplé au Texas Red.

3 : La protéine endogène Hsp60 est observée chez les mêmes parasites et présente également une localisation dans un organe tubulaire. Le sérum polyclonal de souris anti-Hsp60 est révélé par un conjugué anti-immunoglobines de souris couplé à la fluorescéine.

4 : La superposition des signaux fluorescents rouge (Texas Red, protéine CAT) et vert (fluorescéine, protéine Hsp60) donne un signal orange, attestant de la co-localisation des protéines CAT et Hsp60 dans un organe tubulaire complexe assimilé à la mitochondrie de *T. gondii*.



BU
LILLE I

Figure 28: Localisation de la protéine Hsp60 par fractionnement cellulaire en gradient de saccharose. Les organites des tachyzoïtes PS4-CAT sont purifiés par gradient discontinu de saccharose (A). Les fractions a, b, c, et d sont analysées en gel SDS-PAGE 10% en conditions réductrices et hybridées avec le sérum anti-Hsp60 de *T. gondii* (1/1000è) et le sérum anti-CAT. Les tachyzoïtes PS4-CAT, ceux de la souche sauvage 76K (76K WT) et les cellules HFF saines sont analysés parallèlement par immunoempreinte et servent de contrôles (B). Le contenu des fractions b et c est observé en microscopie électronique (C).

microscopie électronique. Les résultats obtenus avec les fractions b et c sont présentés sur la figure 28-C. Un enrichissement en mitochondries parasites est observé dans la fraction b, et quelques mitochondries contaminent la fraction c. Les quatre fractions ont également été analysées par immunoempreinte pour la présence des protéines Hsp60 et CAT. Les profils protéiques des tachyzoïtes sauvages 76K, des tachyzoïtes transformés PS4-CAT et des cellules HFF saines, sont également analysés par immunoempreinte, dans les mêmes conditions, et servent de contrôles. La figure 28-B montre les différents profils obtenus après révélation chimioluminescente des anticorps secondaires couplés à la peroxydase.

L'absence de signal avec les cellules HFF saines confirme à nouveau la spécificité des anticorps primaires utilisés. L'anticorps polyclonal anti-Hsp60 reconnaît bien une protéine d'environ 63 kDa chez les tachyzoïtes 76 K et PS4-CAT, correspondant à l'Hsp60 endogène de *T. gondii*. Le sérum polyclonal anti-CAT reconnaît une protéine d'environ 22 kDa, présente dans les parasites PS4-CAT et absente de la souche sauvage 76K. Cette bande correspond à la protéine rapporteur CAT, dont le gène, présent sur la construction plasmidique PS4-CAT, est intégré de façon stable dans le génome des toxoplasmes PS4-CAT.

La protéine Hsp60 de *T. gondii* est majoritairement retrouvée dans la fraction b et une légère contamination de la fraction c est observée. De même, la protéine rapporteur CAT est présente dans la fraction b et, dans une moindre mesure, dans la fraction c. Aucune des deux protéines, n'est mise en évidence dans les fractions a et d.

Ainsi, les protéines Hsp60 et CAT sont co-localisées dans la fraction b correspondant à une densité de 1,4 M-1,6 M de saccharose (fig. 28-A). Une légère contamination de la fraction c (densité 1,0 M-1,4 M de saccharose) par les deux protéines est également observée.

La co-localisation de ces deux protéines en immunofluorescence indirecte et sur gradient de saccharose concorde avec une localisation mitochondriale de l'Hsp60 de *T. gondii*. Ces résultats démontrent que nous avons identifié une protéine chaperon Hsp60, codée par un gène nucléaire et qui est importée dans la mitochondrie des tachyzoïtes de *T. gondii*.

III. Clonage du gène Hsp60 de *T. gondii*

III. 1. Analyse en Southern blot

Deux types d'ADNc, divergents pour leur extrémité 5' ont été obtenus par 5'RACE ou par RT-PCR. Afin de déterminer si les ARNm correspondants sont transcrits à partir du même gène ou si une famille multigénique est présente dans le génome de *T. gondii*, nous avons réalisé un Southern blot.

Lorsque l'ADN génomique de toxoplasmes de la souche 76K est hybridé avec la sonde SHSPcom1 (nucléotides 327-641 sur la séquence ADNc1), commune aux deux ADNc, un profil de restriction simple est obtenu. La figure 29-A montre en effet qu'un seul fragment d'ADN est reconnu par la sonde, sauf lorsque le site de restriction de l'endonucléase utilisée, est situé dans la séquence reconnue par la sonde. C'est le cas pour l'enzyme *Ava* II, dont le site de restriction est positionné au nucléotide 500. Ainsi, deux fragments sont révélés pour la double digestion *Bam* HI-*Ava* II. La spécificité des résultats est confirmée par l'absence d'hybridation de la sonde sur l'ADN génomique des cellules hôtes HFF non infectées.

Nous pouvons donc conclure que le gène codant pour l'Hsp60 est probablement présent en une seule copie dans le génome de *T. gondii*.

III. 2. Criblage d'une banque génomique

Une banque d'ADN génomique (souche PLK) est alors criblée par la sonde SHSPcom2, commune aux deux ADNc (tab. 9) et 4 clones positifs sont obtenus. Pour l'un des clones, un fragment d'environ 5 kb issu de la digestion de l'ADN phagique par l'enzyme *Eco* RV est sous-cloné dans le vecteur Bluescript SK⁺. L'insert correspondant au gène de l'Hsp60 est entièrement séquencé, sur les deux brins. La comparaison de la séquence génomique et des deux ADNc a permis d'identifier 5 introns, de 227 pb à 707 pb. La figure 29-B schématise ce résultat et le tableau ci-dessous précise la taille et la localisation sur l'ADNg de chacun des introns.

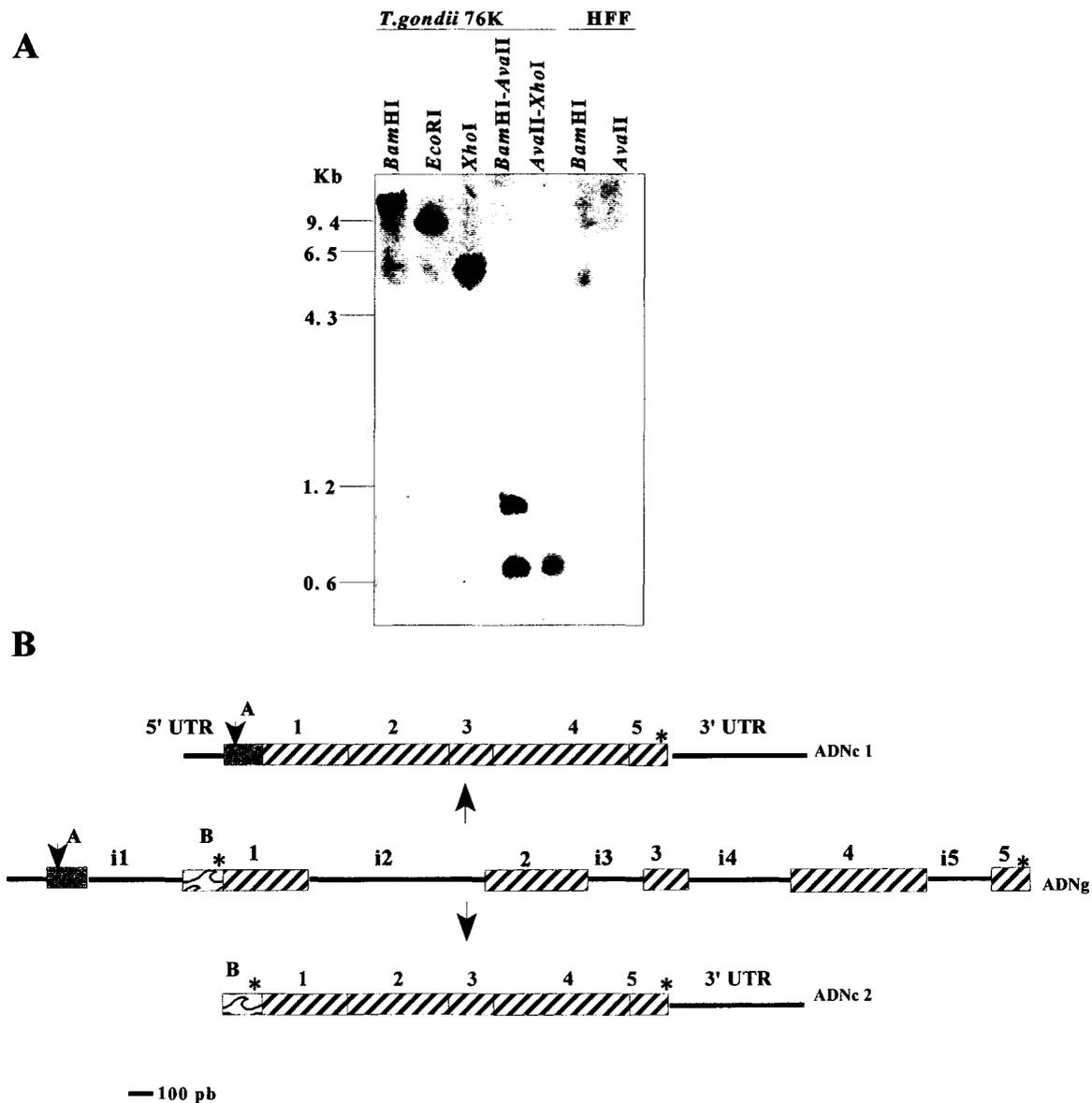


Figure 29: Analyse en Southern blot et schéma de l'organisation génomique du gène codant pour l'Hsp60 de *T. gondii*. (A) L'ADN génomique de tachyzoïtes 76K et des cellules HFF est digéré puis hybridé avec la sonde SHSPcom1. (B) La comparaison entre la séquence du gène codant pour l'Hsp60 et des deux ADNc a permis d'identifier cinq introns (i1 à i5) et cinq exons communs (1 à 5) aux deux ADNc. Les exons A et B, situés aux extrémités 5', sont spécifiques de chaque ADNc. L'ADN génomique (ADNg) peut être alternativement transcrit pour donner les messagers 1 et 2. La pointe de flèche symbolise le codon d'initiation de la traduction de la protéine Hsp60 et les étoiles illustrent les codons stop. Les séquences 5' et 3' non traduites (5'UTR et 3'UTR) sont précisées. La séquence génomique est enregistrée dans la banque de données GenBank sous le numéro d'accès AF116462.

Introns	Position sur l'ADNg	Taille (pb)
1	357-779	422
2	1275-1982	707
3	2394-2621	227
4	2817-3218	401
5	3738-3988	250

Tableau 3: Position et taille des introns sur le gène codant pour l'Hsp60 de *T. gondii*. Les introns sont définis par comparaison entre la séquence de l'ADNg et des deux ADNc. Leur position est indiquée sur le schéma illustrant l'organisation du gène Hsp60 de *T. gondii* (fig. 29-B).

Les sites d'épissage accepteur (5'-GT-) et donneur (-AG-3') connus dans d'autres organismes sont retrouvés pour chacun des cinq introns, ce qui est en accord avec d'autres gènes de *T. gondii*, déjà décrits (Mercier, *et al.*, 1993 ; Nagel and Boothroyd, 1988 ; Roos, 1993).

La séquence nucléotidique du gène Hsp60 démontre sans aucune ambiguïté que les deux ADNc, amplifiés par PCR, reflètent la transcription d'un seul gène, en deux ARNm. En effet, pour obtenir l'ARNm1, l'exon A peut être joint à l'exon 1. L'épissage excluant l'intron i1 et l'exon B, peut s'effectuer entre le site accepteur GT, situé à l'extrémité 5' de l'intron i1, et le site donneur AG, situé à l'extrémité 3' de l'exon B. Les autres introns (i2 à i5), sont classiquement épissés par les sites consensus GT/AG. Alternativement, l'ARNm2 peut être transcrit lorsque le site donneur AG, situé entre les exons B et 1 n'est pas utilisé.

Les extrémités 5' de nos ADNc sont déduites des produits d'amplification 5'RACE. Nous ne pouvons affirmer avoir l'intégralité de l'ADNc puisque l'expérience d'extension d'amorce (détermination du point de départ de la transcription par une transcription inverse de l'ARNm hybridé à une amorce correspondant à l'extrémité 5') n'a pas été réalisée. En revanche, la taille approximative des ARNm, déterminée par Northern blot (fig. 31-A) est

cohérente avec la longueur des séquences obtenues par RACE, ce qui indiquerait que nos extrémités 5' ne sont pas très éloignées des sites de départ de la transcription.

La comparaison de nos ADNc et de l'ADN génomique révèle que notre séquence d'ADN génomique comporte environ 180 pb en amont de l'extrémité 5' de l'ADNc1. Ces 180 pb seraient proches du site de départ de la transcription et pourraient constituer une partie de la région promotrice du gène codant pour l'Hsp60 de *T. gondii*. Les séquences consensus des promoteurs eucaryotes TATA ou CCAAT ne sont pas présentes parmi ces 180 pb. De même, la séquence A/TGAGACG retrouvée à moins de 160 pb du début de la transcription de gènes constitutifs (Mercier, *et al.*, 1996 ; Nagel and Boothroyd, 1988), ou répétée en amont du gène *sag1* (Soldati and Boothroyd, 1995) spécifiquement exprimé chez les tachyzoïtes, n'est pas retrouvée dans ces 180 pb. Il se peut que le promoteur du gène Hsp60 ne soit pas contenu dans notre séquence génomique ou que d'autres éléments de régulation interviennent pour la transcription des ADNc1 et ADNc2. En effet, ce motif A/TGAGACG n'est retrouvé qu'en amont de certains gènes et ne constitue pas un consensus pour la transcription des gènes de *T. gondii*.

Bien que deux ARNm soient transcrits à partir du gène codant pour l'Hsp60, seul l'ARNm1 contient un cadre ouvert de lecture codant pour la protéine Hsp60. La comparaison de l'ADN génomique et de l'ADNc2 confirme à nouveau la présence du codon stop en aval du codon ATG (nucléotides 129-131, fig. 19). Nous n'avons, pour le moment, aucune explication quant à la présence de l'ARNm2, puisqu'aucun codon ATG de ce messenger ARNm2 ne peut initier la traduction d'une protéine Hsp60.

IV. Etude de l'expression de la protéine Hsp60 au cours d'un choc thermique

Les protéines GroEL sont induites par un choc thermique et évitent l'agrégation des protéines intracellulaires en complexes insolubles (Hendrick and Hartl, 1993). La synthèse des protéines de choc thermique est tout d'abord augmentée en relation avec l'importance du choc thermique, puis progressivement régulée jusqu'à leur niveau initial lorsque les cellules retrouvent leur environnement habituel. De la même façon, l'Hsp60 mitochondriale est surexprimée dans les mitochondries de *S. cerevisiae* (Johnson, *et al.*, 1989) et d'*A. thaliana*

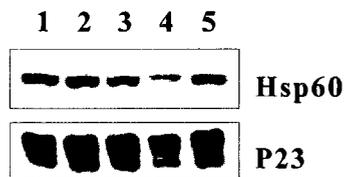


Figure 30: Analyse par immunoempreinte de l'expression de la protéine Hsp60 sous l'effet d'un choc thermique. Les tachyzoïtes 76K sont soumis à une induction de 30 min à 42°C (2) puis remis en conditions normales de culture pendant 1h (3), 2h (4) et 4h (5). Les protéines totales sont séparées en gel SDS-PAGE 13% en conditions non réductrices, et les résultats de l'hybridation avec le sérum anti-Hsp60 et l'anticorps anti-P23 sont présentés. Des tachyzoïtes non traités servent de contrôle (1).

(Prasad and Stewart, 1992) et préviendrait l'inactivation thermique des protéines mitochondriales. L'effet d'un choc thermique sur l'Hsp60 de *T. gondii* est analysé directement au niveau protéique puisqu'une élévation de l'ARNm n'est pas forcément corrélée à une sur-expression de la protéine. L'expression des protéines Hsp60 et P23 de tachyzoïtes induits à 42 °C est étudiée par immunoempreinte, à différents temps après l'induction. La protéine P23, est une protéine de surface de 23 kDa, présente chez les tachyzoïtes et les bradyzoïtes et dont une régulation de l'expression n'a pas été rapportée jusqu'à présent. Sur la figure 30, on observe de légères variations dans l'intensité des bandes correspondant à la protéine Hsp60 pour les différents temps analysés. Des variations identiques sont observées pour l'expression de la protéine constitutive P23. Les différences observées sont retrouvées à la fois pour la protéine Hsp60 et pour notre contrôle P23, et témoignent plutôt de variations dans la quantité de parasites déposés.

Dans nos conditions, l'expression de la protéine mitochondriale Hsp60 de *T. gondii* ne semble donc pas être induite par un choc thermique. De plus, un résultat similaire avait été démontré pour l'Hsp60 mitochondriale du parasite Apicomplexa *P. falciparum* (Das, *et al.*, 1997).

V. Etude de l'expression différentielle de l'Hsp60 chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes

V. 1. Etude de l'expression de l'Hsp60 au niveau transcriptionnel

Une analyse en Northern blot est tout d'abord utilisée pour vérifier, chez les tachyzoïtes, la taille des transcrits obtenus par RACE et par RT-PCR. L'expression des transcrits du gène codant pour l'Hsp60 de *T. gondii* sera ensuite comparée entre les tachyzoïtes et les bradyzoïtes par RT-PCR.

V. 1. 1. Analyse en Northern blot

Les ARN totaux de tachyzoïtes (souche 76K) et des cellules HFF, sont hybridés avec la sonde SHSPcom2 (1458 pb) commune aux deux ADNc (fig. 31-A). La spécificité de la sonde est confirmée par l'absence de signal avec les ARNm des cellules HFF saines.

La sonde SHSPcom2 met en évidence un seul type de transcrite d'environ 2,4 kb. Ceci concorde avec la présence des deux messagers ADNc1 et ADNc2 obtenu en RACE. Les tailles de 2430 pb (ADNc1) et 2444 pb (ADNc2) sont en effet trop proches pour que les deux messagers soient séparés sur le gel d'agarose.

V. 1. 2. Analyse par RT-PCR

Afin de vérifier si les deux ARNm de la chaperonine Hsp60 sont transcrits dans les deux formes parasitaires, l'amplification par RT-PCR des ARNm1 et ARNm2 a été effectuée. Les amorces HSP7-HSP9 et HSP8-HSP9 (tab. 5) et les ARNm correspondant à environ 10^4 tachyzoïtes et 10^4 bradyzoïtes sont utilisés. L'amplification de l'ARNm codant pour l'actine (tab. 5) sert de contrôle et les différentes amorces sont testées sur les ADNc de cellules HFF saines et de cerveaux de souris non infectées.

La figure 31-B montre l'analyse en gel d'agarose des différents produits d'amplification. Les amorces sont spécifiques de *T. gondii* puisqu'aucun produit n'est amplifié avec les cellules HFF saines et les cerveaux de souris non infectées. L'ARNm du gène constitutif de *T. gondii* codant pour l'actine est amplifié dans les tachyzoïtes et les bradyzoïtes; ce qui témoigne de la présence d'ARNm intacts dans les deux stades analysés. Une bande d'environ 1784 pb correspondant à l'ARNm1 est observée chez les tachyzoïtes et les bradyzoïtes. De même, l'ARNm2 (1698 pb) est amplifié dans les deux stades parasitaires.

Ainsi, les ARNm1 et ARNm2, issus du gène codant pour l'Hsp60 mitochondriale de *T. gondii*, sont transcrits chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes.

V. 1. 3. Analyse par RT-PCR semi-quantitative

La technique de RT-PCR semi-quantitative nous permet d'analyser l'abondance des transcrits du gène Hsp60 entre les formes tachyzoïtes et bradyzoïtes du toxoplasme.

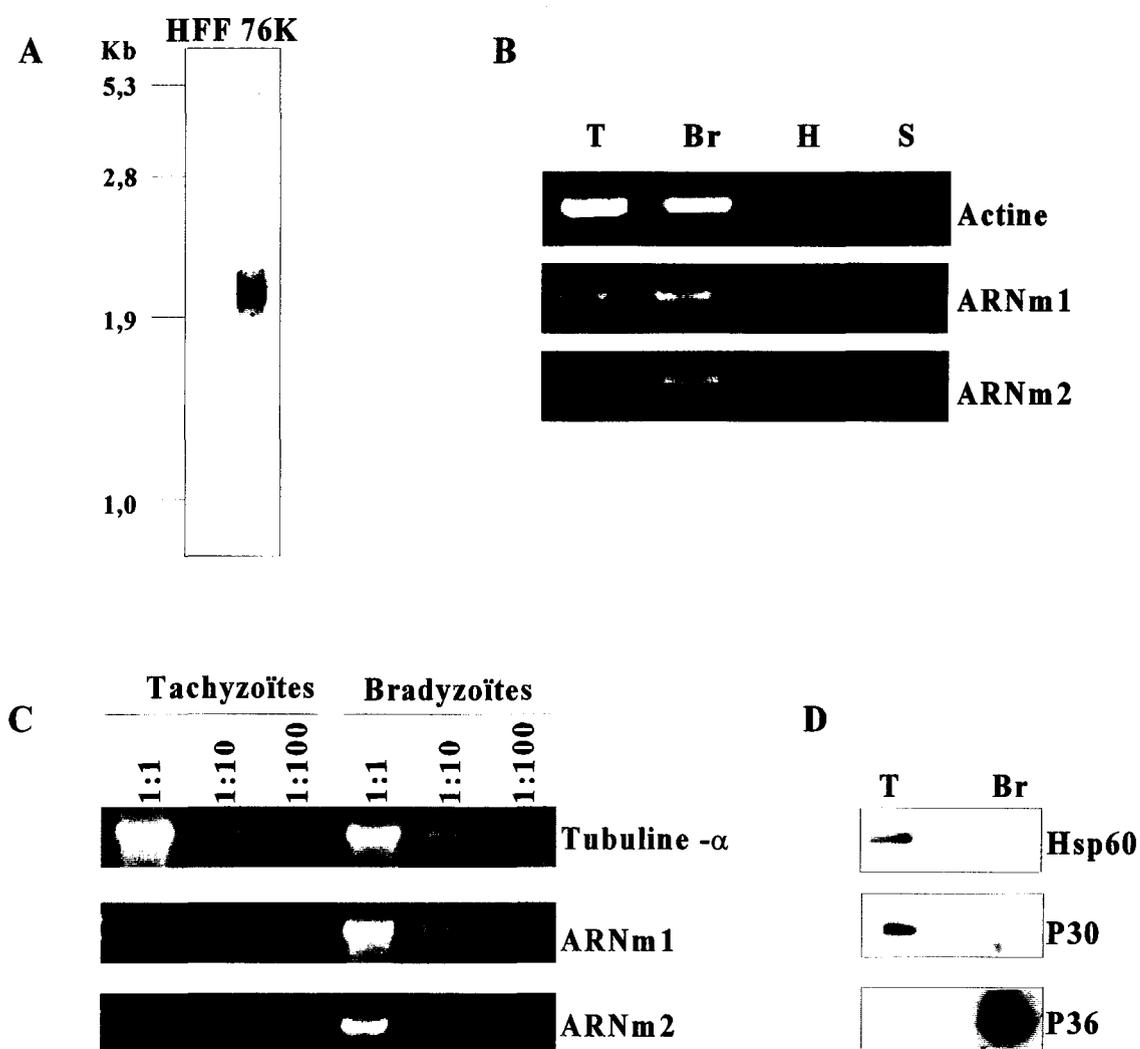


Figure 31: Etude de l'expression du gène Hsp60 aux stades tachyzoïte et bradyzoïte.

A : Analyse en **Northern blot** des ARNm codant pour l'Hsp60 de *T. gondii*. La sonde SHSPcom2 est hybridée sur les ARN totaux des tachyzoïtes de la souche 76K et des cellules HFF saines. La taille des transcrits est déterminée par rapport au marqueur de poids moléculaire.

B : La transcription des ARNm1 et ARNm2 est analysée par **RT-PCR** sur 10^4 tachyzoïtes (T) et 10^4 bradyzoïtes (Br). Les amorces sont également testées sur les cellules HFF saines (H) et sur les cellules de cerveau de souris non infectées (S). L'amplification de l'actine sert de contrôle.

C : Une **RT-PCR semi-quantitative** sur l'ARN de tachyzoïtes et de bradyzoïtes non dilués (1:1), dilués au 1/10 (1:10) et au 1/100 (1:100) permet d'étudier la transcription des ARNm1 et ARNm2 de l'Hsp60 de *T. gondii*. La tubuline- α sert de contrôle.

D : L'expression de la protéine Hsp60 est analysée par **immunoempreinte** sur des tachyzoïtes (T) et des bradyzoïtes (Br). La spécificité des stades est vérifiée par la révélation des protéines de surface P30 et P36.

L'amplification de l'ARNm du gène constitutif codant pour l' α -tubuline permet d'ajuster les quantités initiales d'ADNc et de vérifier les dilutions au 1/10 et 1/100 (fig. 31-C). Les produits d'amplification sont analysés en gel d'agarose. On observe d'une part, que les deux transcrits sont prépondérants au stade bradyzoïte, comparativement au stade tachyzoïte et d'autre part, que l'ARNm1 est plus abondant que l'ARNm2 dans ces deux stades parasitaires.

Le gène codant pour l'Hsp60 serait donc sur-exprimé, au niveau transcriptionnel, chez les formes enkystées (bradyzoïtes) comparativement aux formes de multiplication active (tachyzoïtes). Et l'ARNm1 codant pour la protéine Hsp60 serait plus abondant que l'ARNm2.

V. 2. Expression de l'Hsp60 au niveau protéique

Il arrive très souvent que les gènes soient régulés au niveau post-transcriptionnel et la mise en évidence des ARNm doit être corrélée à la présence de la protéine. Grâce au sérum polyclonal anti-Hsp60, la présence de la protéine Hsp60 de *T. gondii* a été vérifiée chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes.

V. 2. 1. Analyse par immunoempreinte

Comme le montre la figure 31-D, aucun signal n'est obtenu avec les bradyzoïtes, alors que la protéine est mise en évidence avec la même quantité de tachyzoïtes. La présence respective des protéines de surface P30 et P36 dans les tachyzoïtes et dans les bradyzoïtes confirme que les échantillons protéiques n'ont pas été dégradés au cours de leur préparation et atteste du stade de développement des parasites purifiés.

La sur-expression du gène codant pour l'Hsp60 au niveau transcriptionnel (fig. 31-B et C) n'est donc pas corrélée à une sur-expression de la protéine, au stade bradyzoïte. Au contraire, la protéine n'est pas détectée, ce qui suggère une régulation du gène au niveau post-transcriptionnel.

V. 2. 2. Cinétique d'apparition de la protéine Hsp60 au cours de la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes

La différenciation des bradyzoïtes issus de kystes *in vivo*, en tachyzoïtes, est simplement réalisée par la mise en culture des bradyzoïtes sur les cellules HFF. L'apparition de la protéine Hsp60 est suivie en immunofluorescence indirecte et les résultats sont présentés sur la figure 32.

Trois heures après l'infestation des cellules HFF, aucun signal n'est détecté dans les parasites (photo 3h); ce qui confirme les résultats obtenus par immunoempreinte au stade bradyzoïte. Après 18h, la protéine mitochondriale Hsp60 est à nouveau présente (photo 18h) et le signal persiste au bout de 42h, lorsque les toxoplasmes se multiplient activement (photo 42h). La cinétique d'apparition de la protéine Hsp60 coïncide avec l'apparition de la protéine P30, spécifique du stade tachyzoïte (Soète, *et al.*, 1993).

Ces résultats démontrent que l'expression de la protéine Hsp60 est très fortement réduite lorsque le parasite est enkysté et qu'elle est ré-exprimée *de novo* lors de la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes.

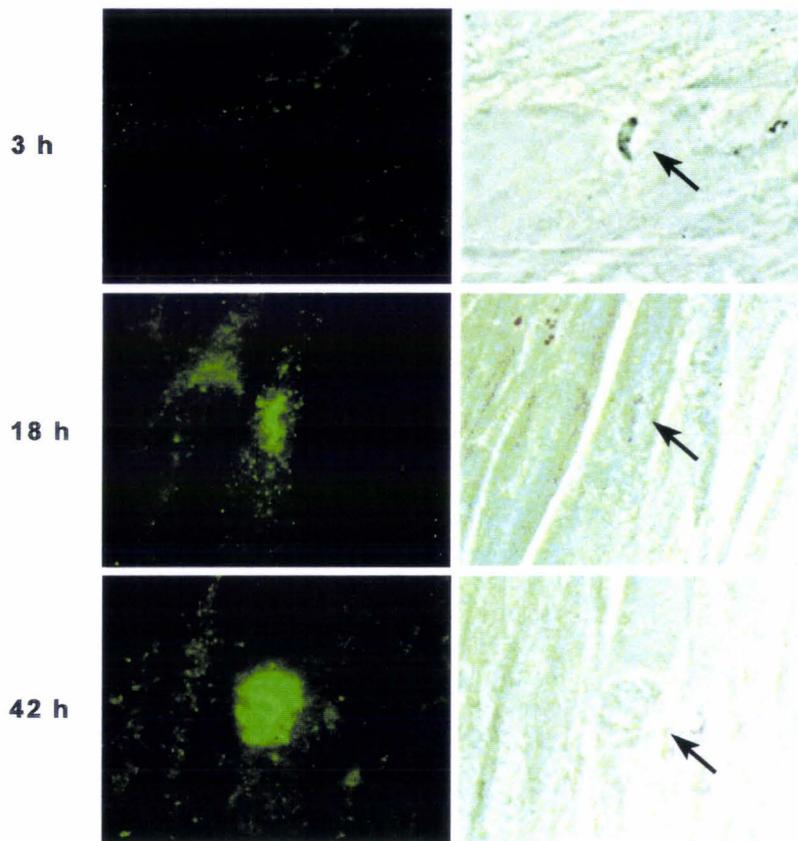


Figure 32: Cinétique d'apparition de la protéine Hsp60 au cours de la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes. La protéine Hsp60 est détectée par le sérum de souris anti-Hsp60 et révélée par un conjugué anti-immunoglobines de souris couplé à la fluorescéine.

3h : Trois heures après l'infestation des cellules HFF par les bradyzoïtes, aucun signal n'est détecté dans les toxoplasmes.

18h : Après 18 heures d'infestation, l'Hsp60 est observée dans la mitochondrie de *T. gondii*. La multiplication parasitaire n'a pas commencé alors que la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes est achevée.

42h : La protéine Hsp60 reste présente après 42 heures d'infestation lorsque les tachyzoïtes se multiplient activement.

Discussion

Chapitre I. Caractérisation du cytochrome b de *T. gondii*

Le cytochrome b est une protéine mitochondriale très conservée intervenant dans la chaîne de transport des électrons. Son gène est présent de façon universelle dans le génome mitochondrial. Chez *T. gondii*, de nombreux pseudogènes sont également présents dans le génome nucléaire (Ossorio, *et al.*, 1991). Le séquençage de l'ADNc codant pour le cyt b de *T. gondii* a servi d'une part à étudier son implication dans la résistance à la 4-pyridone et d'autre part à étudier son expression au cours du développement intracellulaire de *T. gondii*.

I. L'ADNmt de *T. gondii* contient le gène du cyt b et ce dernier est activement transcrit

Des amorces dégénérées correspondant à des domaines conservés de la protéine ont permis d'amplifier par RT-PCR un fragment de l'ARNm codant pour le cyt b de *T. gondii*. L'ADNc entier a été obtenu par la technique du RACE. Pour la première fois, la séquence d'un ADNc issu d'un gène mitochondrial est obtenue pour *T. gondii*. Bien que son ADNmt ne soit pas du tout caractérisé, la mise en évidence de cet ADNc confirme qu'il contient, comme tout les ADNmt déjà caractérisés, le gène du cyt b. L'amplification par RT-PCR et la mise en évidence d'un transcrit par Northern blot attestent de la transcription du gène codant pour le cyt b. La présence d'un seul signal en Northern blot confirme que les pseudo-gènes nucléaires ne sont pas transcrits et que l'ADNc obtenu par RT-PCR est bien issu d'un gène mitochondrial. Enfin, le pourcentage en bases AT (64%), relativement élevé concorde avec l'origine mitochondriale de la séquence obtenue.

II. Le gène codant pour le cyt b de *T. gondii* est conservé parmi différentes souches de toxoplasme

Le séquençage de l'ADNc du cyt b des souches virulentes (RH) et avirulentes (PLK, 76K) n'a démontré aucune différence nucléotidique.

Parallèlement à ces travaux, McFadden *et al.* (McFadden, *et al.*, 1999) ont isolé par RACE et séquencé l'ADNc de la souche PDS (dérivée de la souche avirulente ME49). Notre séquence est identique à 99,64% avec celle décrite par McFadden *et al.* (numéro d'accèsion Genbank AF023246). Les deux séquences ne diffèrent que par 3 acides nucléiques et au niveau protéique, une seule modification est observée : notre phénylalanine-174 devient une sérine. Cette modification n'affecte aucun des sites catalytiques du cyt b.

Il est étonnant que d'aussi faibles variations soient observées entre les différentes souches de toxoplasmes. En général, l'ADNmt est très susceptible aux mutations puisqu'il n'est pas protégé par des histones et que le transport d'électrons génère des radicaux libres (Turrens, 1997). Deux hypothèses peuvent être avancées. Soit la chaîne de transport des électrons fonctionne très peu et ne serait pas impliquée dans la production d'ATP par phosphorylation oxydative. C'est-à-dire que peu de dérivés oxygénés seraient produits et auraient donc un faible effet mutagène. Soit la réplication de l'ADNmt est très fidèle, ce qui souligne d'autant plus le rôle essentiel de la mitochondrie parasitaire. Le séquençage complet de l'ADNmt déterminerait si cette faible évolution est spécifique au gène du cyt b ou si cette caractéristique s'étend au génome mitochondrial de *T. gondii*.

III. La protéine cyt b chez *T. gondii*

Une protéine conservée, possédant les huit domaines transmembranaires et les acides aminés caractéristiques des cyt b est déduite de l'ADNc en utilisant le code génétique mitochondrial des protozoaires. Le cyt b de *T. gondii* est cependant plus court que les cyt b des autres organismes. Un codon UAA arrête effectivement la traduction avant la séquence hydrophile C-terminale habituellement trouvée. Ce codon n'est pas lié à une erreur de séquençage puisqu'il est présent dans la séquence proposée par McFadden *et al.* et dans 6 EST issues d'une banque d'ADNc de la souche RH (numéros d'accèsion dans la banque de données GenBank : N59913, N60338, N81627, N82333, W00036). Le codon UAA code très rarement pour un acide aminé mais il peut être traduit en un résidu tyrosine, dans le gène du cytochrome c oxydase 1 de *Dugesia japonica* (Bessho, *et al.*, 1992). Il n'est donc pas impossible que la protéine cyt b de *T. gondii* continue au-delà de ce codon UAA. L'acide aminé ne peut cependant être déduit puisque cette partie C-terminale est peu conservée entre les différentes espèces.

IV. Les résistances à la 4-pyridone et à l'atovaquone ne sont pas liées à des mutations sur le cytochrome b de *T. gondii*

Par mutagenèse chimique, des mutants résistants à une nouvelle drogue anti-toxoplasmique, la 4-pyridone dont la cible serait le complexe *b-c1*, ont été obtenus. Le cyt b est une protéine essentielle à l'activité enzymatique du complexe *b-c1*. Dans d'autres organismes, il est impliqué dans la résistance à de nombreuses drogues dirigées contre le complexe *b-c1* (di Rago and Colson, 1988 ; di Rago, *et al.*, 1986) et notamment dans la résistance à l'atovaquone chez *P. yoelii* (WoodsHole, 1998). L'un de nos mutants présente d'ailleurs la double résistance à la 4-pyridone et à l'atovaquone. C'est pourquoi la séquence codante pour le cyt b a été séquencée chez nos mutants.

La comparaison de séquence entre les ADNc de nos deux mutants résistants à la 4-pyridone et celui de la souche sauvage RH n'a pas mis en évidence de mutation sur la séquence codante du cyt b de *T. gondii*. Par ailleurs, contrairement aux résultats obtenus récemment chez *P. yoelii* (Vaidya, WoodsHole98) et chez *T. gondii* (McFadden, *et al.*, 1999), l'analyse de notre clone 6 démontre que le cytochrome b n'est pas obligatoirement impliqué dans la résistance à l'atovaquone. Plusieurs mécanismes de résistance peuvent être envisagés pour expliquer ces résultats.

Implication du complexe *b-c1* et modification de la cible enzymatique

Tout d'abord une mutation ponctuelle peut affecter une autre protéine que le cyt b. En raison de l'obtention du clone résistant à la 4-pyridone et à l'atovaquone, l'hypothèse d'une cible protéique commune ou proche pour ces deux drogues a été émise. En plus du cyt b, le complexe *b-c1* contient le cytochrome c1 et la protéine Fe-S. En fonction des organismes étudiés, d'autres protéines sont également présentes, et chez les mammifères, onze protéines forment ce complexe. On peut donc penser que certaines mutations sur les protéines du complexe *b-c1* peuvent modifier la structure du cyt b et/ou ses interactions avec la 4-pyridone, et que d'autres mutations peuvent affecter la sensibilité du complexe *b-c1* pour l'atovaquone. De tels mutants seraient alors spécifiquement résistants pour l'une ou l'autre de ces drogues. De la même façon, certaines mutations pourraient affecter l'affinité du complexe *b-c1* pour les deux drogues, et un phénotype de double résistance serait observé.

Le mutant doublement résistant suggère en effet un mécanisme d'action proche pour les deux drogues et le mutant 4-pyridone^R-atovaquone^S (clone 5, souche RH) ainsi que les mutants atovaquone^R-4-pyridone^S (clones R5 et R7, souche PLK) suggèrent des cibles protéiques différentes. Le complexe enzymatique *b-c1* présenterait donc ces deux propriétés, à savoir plusieurs protéines du complexe impliquées dans un même mécanisme d'action.

Implication d'une pompe transmembranaire et exclusion des drogues hors de l'organite cible

Il a été démontré chez les eucaryotes et chez les procaryotes qu'une exportation active des composés toxiques était un mécanisme de résistance couramment employé.

Ainsi, chez les mammifères une glycoprotéine est impliquée dans les mécanismes Mdr de résistance multiple aux drogues. Cette protéine transmembranaire utilise l'hydrolyse de l'ATP pour pomper de façon non spécifique toutes les drogues à l'extérieur des cellules (Endicott and Ling, 1989). Un tel mécanisme de résistance a été démontré chez le protozoaire *Leishmania* (Ouelette and Papadopoulou, 1993). Chez *Plasmodium* deux gènes proches des gènes Mdr des mammifères ont été séquencés (Wilson, *et al.*, 1989) mais l'implication des protéines Mdr dans certaines souches résistantes à la chloroquine est controversée (Cremer, *et al.*, 1995 ;Karcz and Cowman, 1991). Nos mutants ont été testés vis à vis de la puromycine, drogue hydrophobe habituellement reconnue par ce type de transporteur. La sensibilité de nos mutants pour la puromycine démontre que les résistances à la 4-pyridone et/ou à l'atovaquone ne sont pas associées à un mécanisme de résistance du type Mdr.

La mitochondrie est un organite endosymbiotique dérivé d'un procaryote. Chez les procaryotes, des pompes membranaires excluant différents composés toxiques n'ayant aucune ressemblance structurale entre eux ont également été démontrées. Le transport des drogues contre leur gradient de concentration s'effectue grâce à l'hydrolyse de l'ATP ou en utilisant la force proton motrice (Paulsen and Skurray, 1993). Une concentration progressive de drogues induit souvent un tel mécanisme de résistance. Or la sélection de nos mutants a nécessité l'utilisation successive de trois concentrations de 4-pyridone (0,5 μ M, 1 μ M et 5 μ M). C'est pourquoi un tel mécanisme est envisageable pour le clone 6 résistant aux deux drogues. Si cette hypothèse s'avère vraie, le clone 6, mis en culture dans des cellules hôtes déficientes pour la chaîne respiratoire (King and Attardi, 1989), serait également résistant aux autres drogues anti-mitochondriales (antimycine A, oligomycine, CCCP, etc).

Les mécanismes de résistance aux drogues sont multiples et les procédés mis en jeu dans le clone 5 ou dans le clone 6 peuvent différer. La membrane interne mitochondriale est particulièrement imperméable, et l'entrée des drogues nécessite peut être un transporteur. Une mutation ponctuelle sur ce transporteur modifierait alors son affinité pour la drogue. De plus, si la cible protéique n'est pas essentielle, un arrêt de son expression peut entraîner la résistance à la drogue. Enfin, la cible protéique peut être sur-exprimée, pour qu'une concentration suffisante assure les fonctions métaboliques alors qu'une partie serait inhibée par la drogue (Taylor and Feyereisen, 1996).

V. Analyse du gène impliqué dans la double résistance à la 4-pyridone et à l'atovaquone par complémentation

Afin de déterminer quel gène est impliqué dans cette résistance, la complémentation de la souche RH HXGPRT^r par l'ADN génomique du mutant résistant à la 4-pyridone et à l'atovaquone a été réalisée.

Des parasites RH HXGPRT^r, ayant reçu la construction plasmidique pHPT 0,5 ont été sélectionnés en présence d'atovaquone. La sélection en présence d'atovaquone confirme le phénotype 4-pyridone^R-atovaquone^R du clone 6. Cependant, aucun plasmide pHPT 0,5 résistant à l'ampicilline n'a été isolé alors qu'un plasmide contrôle résistant à la kanamycine atteste d'une purification efficace de l'ADN plasmidique. En dépit de la séquence EMS, permettant normalement la répllication autonome du plasmide pHPT 0,5, il est possible que le plasmide se soit intégré dans le génome de *T. gondii*. Cette hypothèse devra être analysée en Southern blot ou par PCR, pour la mise en évidence du vecteur bactérien dans le génome de ces parasites. Par ailleurs, à la concentration de 5 µM d'atovaquone, environ 20% à 30% des parasites sauvages continuent de se multiplier (fig. 16). Il se peut que 20 jours de sélection soient insuffisants pour éliminer ces parasites sauvages.

Par ailleurs, au-delà des problèmes techniques, les limites même de la complémentation peuvent être à l'origine de l'absence de résultats. En effet, la complémentation ne permet d'identifier qu'un seul gène responsable du phénotype observé. D'après les conditions de mutagenèse chimique, il est probable que le phénotype 4-pyridone^R-atovaquone^R reflète plus d'une mutation dans le génome du clone 6. Dans ce cas, la complémentation ne pourrait permettre l'identification des gènes mutés.

De plus, les stades étudiés sont haploïdes et une mutation récessive engendre un phénotype visible lorsque le gène est exprimé. La complémentation rend le parasite pseudo-diploïde pour le gène d'intérêt. Dans l'hypothèse où le phénotype de sensibilité à la 4-pyridone reflète un gène sauvage dominant, la sélection pour une mutation récessive responsable des résistances devient alors impossible.

Enfin, la complémentation est réalisée à partir de l'ADN génomique. La majorité des protéines mitochondriales sont en effet codées par le génome nucléaire, mais certaines protéines, indispensables au fonctionnement de la mitochondrie sont codées par l'ADN mitochondrial. La technique utilisée ne permet pas de compléter les gènes mitochondriaux. D'une part l'ADNmt n'est pas sous-cloné dans le vecteur utilisé pour la complémentation. Et d'autre part, même si quelques fragments d'ADNmt contaminent l'ADN génomique, les protéines, à conditions d'être traduites par la machinerie cytoplasmique, ne possèderaient aucun signal d'importation et ne pourraient être fonctionnelles dans la mitochondrie. Les gènes mitochondriaux impliqués dans les résistances observées ne seraient donc pas identifiés par cette technique. L'absence de méthode de purification de l'ADNmt de *T. gondii* et l'incapacité à électroporer l'ADN dans la mitochondrie sont deux limites à l'identification de gènes mitochondriaux par complémentation. La seule méthode pour l'identification de cible moléculaire mitochondriale est le séquençage comparé entre des mutants et la souche sauvage lorsque le gène impliqué est suspecté. Cette méthode est celle utilisée avec le *cyt b*.

La cible moléculaire de la 4-pyridone reste donc indéterminée. L'obtention du clone doublement résistant à la 4-pyridone et à l'atovaquone suggère un mécanisme d'action proche pour ces deux drogues, à moins que ce mutant ne possède plusieurs mutations.

VI. L'ADNc codant pour le cytochrome b de *T. gondii* : une sonde pour caractériser son ADN mitochondrial

Le fractionnement cellulaire réalisé au cours de l'analyse de l'Hsp60 de *T. gondii* altère la structure des mitochondries parasitaires et des organites plus ou moins denses aux électrons sont observés (fig. 28). La mise en évidence de la protéine Hsp60 mitochondriale de *T. gondii* dans la fraction enrichie en mitochondries démontre que des organites sont suffisamment intacts pour analyser leur contenu protéique. Il paraît donc vraisemblable que l'ADNmt soit

également conservé dans les mitochondries lors de leur enrichissement dans la fraction ayant une densité de saccharose comprise entre 1,4 M et 1,6 M (fraction b).

En microscopie électronique, les mitochondries des cellules hôtes possèdent des crêtes transversales et présentent une structure très différente des mitochondries du toxoplasme. Aucune de ces structures n'est observée dans les fractions issues de l'isolement des organites parasites. La double purification des tachyzoïtes avant fractionnement permet d'éviter la contamination par les mitochondries des cellules hôtes.

En dehors, des contaminations de la cellule hôte, l'ADNmt de *T. gondii* peut être contaminé par son ADN génomique et son ADN plastidial. Les noyaux de *T. gondii* sont éliminés dès la première centrifugation et les plastes sont isolés dans la fraction de densité de saccharose 1 M-1,4 M (fraction c). Des essais pour purifier l'ADN des fractions b et c ont été réalisés. Les acides nucléiques ont alors été analysés par Southern blot avec des sondes correspondant au gène nucléaire α -tubuline, aux gènes plastidiaux codant pour les protéines ribosomiales de l'apicoplaste, ou au gène mitochondrial codant pour le cyt b. Ces résultats préliminaires indiquent que l'ADN génomique contamine légèrement les deux fractions et que l'ADN plastidial se trouve majoritairement dans la fraction c et contamine la fraction b. Ces résultats ont été reproduits à partir de matériel issu de plusieurs fractionnements indépendants. En revanche, les résultats obtenus avec la sonde du cyt b de *T. gondii* (SCYTb) sont plus difficiles à interpréter. Dans une première expérience, un profil de digestion a été observé avec l'ADN issu de la fraction b, ce qui était cohérent avec la mise en évidence des mitochondries dans cette fraction. Cependant, une seconde expérience n'a pu reproduire ces résultats et une bande sur toute la longueur de migration du gel a été obtenue. Un tel profil peut s'expliquer soit par une contamination plus importante par l'ADN génomique et donc refléter la détection des pseudogènes nucléaires, soit par une dégradation excessive de l'ADNmt. Cette seconde hypothèse est d'autant plus probable, si l'ADNmt de *T. gondii* est linéaire comme celui des Apicomplexa, *Plasmodium* et *Theileria* (Wilson, *et al.*, 1993). L'isolement de l'ADNmt de *T. gondii* après fractionnement cellulaire ne semble pas être la meilleure approche.

Par gradient de chlorure de césium, un ADN satellite avait été obtenu pour *P. falciparum* et *T. gondii* (Joseph, *et al.*, 1989). Cet élément a été identifié comme étant l'ADNmt de *P. falciparum*. Il serait intéressant d'utiliser comme sonde notre ADNc spécifique du cyt b de *T. gondii*, pour vérifier si cet ADN satellite, reconnu par l'ADNmt de *P. falciparum* est réellement l'ADNmt de *T. gondii*. L'ADN minoritaire observé chez

T. gondii peut en effet être le génome de l'apicoplaste. Les ADN mitochondriaux et plastidiaux codent tous deux pour des ARN ribosomiaux et les régions conservées entre ces séquences peuvent entraîner une reconnaissance non spécifique de l'ADN plastidial de *T. gondii* par les sondes préparées à partir de l'ADNmt entier de *P. falciparum* (Feagin, *et al.*, 1992). Cependant, les deux bandes d'ADN présentent des densités similaires (1,636 g/ml pour *P. falciparum* et 1,639 g/ml pour *T. gondii*) ce qui suggère une composition en bases AT similaire. Or l'ADNmt de *P. falciparum* présente 68% de bases AT et notre *cyt b* en présente 64%. De plus, l'ADN plastidial possède chez les deux parasites plus de 80% de bases AT (Egea and Lang- Unasch, 1995) et doit donc migrer à une densité différente de celle observée pour l'ADNmt de *P. falciparum*. Ainsi, l'approche par gradient de chlorure de césium pourrait être un moyen d'isoler et de caractériser l'ADNmt de *T. gondii*.

Enfin, l'électrophorèse en champ pulsé est un moyen de séparer les ADNmt linéaires des chromosomes nucléaires. Cette approche, utilisée récemment pour isoler l'ADNmt de *P. falciparum* (Weissig and Rowe, 1999) pourrait être utilisée avec l'ADN total de *T. gondii* suivie d'une hybridation avec notre sonde *cyt b*. Cette approche permettrait tout d'abord de définir la structure de l'ADNmt de *T. gondii* : s'il est circulaire, comme le génome plastidial, il n'entrera pas dans le gel, et s'il est linéaire, comme l'ADNmt des Apicomplexa *Plasmodium* et *Theileria*, il pourra être séparé des chromosomes. Dans ce cas, l'hybridation avec notre sonde spécifique de l'ADNmt de *T. gondii* permettrait d'identifier le génome mitochondrial afin de le purifier du gel d'agarose et de le séquencer.

VII. L'ARNm codant pour le cytochrome b est présent chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes

Par RT-PCR, l'ARNm codant pour le *cyt b* est mis en évidence chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes suggérant que le gène codant pour le *cyt b*, situé sur l'ADNmt de *T. gondii* est activement transcrit dans ces deux stades parasitaires. La mise en évidence de la transcription d'un gène mitochondrial, chez les tachyzoïtes et les bradyzoïtes, suggère que l'organe est capable d'importer du cytoplasme, les protéines impliquées dans la transcription de l'ADNmt.

VIII. La protéine cyt b serait présente chez les tachyzoïtes

La protéine cyt b de *T. gondii* est déduite de la séquence codante de son ARNm. En dépit d'un côté C-terminal légèrement plus court, le cyt b de *T. gondii* présente une structure primaire et secondaire très conservée par rapport aux cyt b des autres phyla. Une telle conservation de structure souligne l'importance de la protéine pour le fonctionnement du parasite. On peut donc déduire une fonction essentielle du cyt b de *T. gondii* et une fonction identique aux autres cyt b, c'est-à-dire, le transfert d'électrons entre une quinone et un cytochrome c.

La traduction de l'ARNm en sa protéine n'a pu être observée à cause de l'absence d'outil immunologique. Une approche indirecte a consisté à analyser des mutants résistants à la 4-pyridone et à l'atovaquone, dont la cible serait le complexe *b-c1*. Le séquençage de l'ADNc codant pour le cyt b chez nos mutants 4-pyridone^R-atovaquone^S et 4-pyridone^R-atovaquone^R n'a montré aucune relation entre des mutations sur le cyt b et les phénotypes de résistance. En revanche, McFadden *et al.* ont montré que des mutations dans le site catalytique Q_o du cyt b de *T. gondii* entraînaient une résistance à l'atovaquone (McFadden, *et al.*, 1999). La présence du cyt b chez les tachyzoïtes est ainsi démontrée.

Le cyt b est constitutif chez la plupart des eucaryotes mais son expression peut être réprimée, chez *S. cerevisiae* en fonction de l'environnement ou, chez les Trypanosomatidae, en fonction du stade parasitaire (Trumpower, 1990a). La présence du cyt b chez les bradyzoïtes reste donc à démontrer. L'antimycine A et l'atovaquone induisent la conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes (Bohne, *et al.*, 1994 ;Tomavo and Boothroyd, 1995). Il est possible que l'inhibition du cyt b parasite entraîne la différenciation en une forme où la fonction du cyt b est partiellement ou totalement diminuée. Bien que l'ARNm codant pour le cyt b soit mis en évidence chez les bradyzoïtes, la régulation de son expression peut se faire au niveau post-transcriptionnel. L'ajout ou le retrait d'uridine (processus « d'editing ») est un moyen de régulation post-transcriptionnel utilisé chez les Trypanosomatidae, pour une expression spécifique au stade procyclique des protéines codées par l'ADNmt (Priest and Hajduk, 1994). L'ADNc codant pour le cyt b de *T. gondii* est identique chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes, ce qui exclue un tel mécanisme de régulation.

Chapitre II. Caractérisation de l'Hsp60 de *T. gondii*

L'Hsp60 est une protéine mitochondriale très conservée et indispensable pour la formation des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire. Elle est codée par un gène nucléaire, synthétisée dans le cytoplasme et importée dans la matrice mitochondriale. Cette protéine nous a donc semblé être un bon marqueur de la fonctionnalité de la mitochondrie chez *T. gondii*. L'obtention, dans notre laboratoire, d'un clone homologue aux Hsp60 dans la banque soustractive comprenant les ADNc des gènes majoritairement exprimés chez les bradyzoïtes (Yahiaoui, *et al.*, 1999) fut le point de départ de notre travail et suggère une régulation de l'expression de l'Hsp60 au cours du développement intracellulaire de *T. gondii*.

I. Un gène nucléaire, deux ARNm

Le séquençage de ce clone issu de la banque soustractive, a permis l'amplification par RACE de deux ADNc. La présence de ces deux transcrits fut confirmée par RT-PCR. Les deux ADNc sont homologues à 96% et ne divergent que sur leur extrémité 5'. L'utilisation d'une sonde spécifique de l'Hsp60 de *T. gondii* et commune aux deux ADNc démontre, par Southern blot, la présence d'un gène unique dans le génome de *T. gondii*. Le criblage d'une banque génomique a permis de séquencer ce gène. Il contient cinq introns, et peut être transcrit en deux messagers par épissage alternatif. L'épissage alternatif a déjà été mis en évidence chez *T. gondii*. Les myosines TgM-B et TgM-C ne divergent que sur leur extrémité C-terminale et sont codées par un même gène (Heintzelman and Schwartzman, 1997). Deux isoformes codant pour la protéine HXGPRT sont également codées par un seul gène. L'isoforme 2 ne diffère que par la présence de 49 acides aminés supplémentaires codés par un exon absent de l'ARNm1 (Donald, *et al.*, 1996). Cependant, un seul de nos ARNm présente un cadre ouvert de lecture codant pour une protéine d'environ 60 kDa. La signification biologique du second transcrit, dont la présence d'un codon stop immédiatement en aval de la méthionine empêcherait la traduction en une protéine, n'est actuellement pas élucidée.

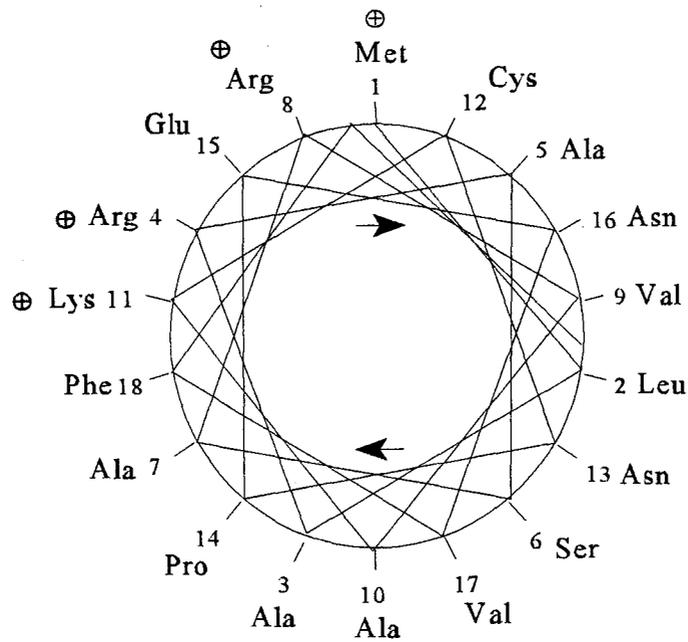


Figure 33: Agencement des acides aminés N-terminaux de la protéine hsp60 de *T. gondii* en une hélice α amphiphile. Les charges positives, portées par les acides aminés basiques sont regroupées sur un côté de l'hélice.

II. Une protéine Hsp60 localisée dans la mitochondrie

La protéine traduite de l'ADNc complet contient à son extrémité N-terminale, des résidus basiques capables de former un peptide signal d'importation et n'ayant pas d'homologue sur les protéines GroEL bactériennes. Il n'est pas étonnant que cette préséquence soit différente des peptides signaux des autres Hsp60 eucaryotes puisque les peptides signaux d'importation dans les organites endosymbiotiques ne dépendent pas d'une séquence consensus mais d'un équilibre entre les acides aminés basiques, hydrophobes et hydroxylés (Allison and Schatz, 1986). D'ailleurs, un tel agencement se retrouve de façon aléatoire dans le génome *d'E. coli* ou dans le gène codant pour la protéine DHFR de la souris, et ces séquences peuvent importer des protéines dans la mitochondrie de *S. cerevisiae* (Baker and Schatz, 1987). *T. gondii* possède deux organites endosymbiotiques (la mitochondrie et l'apicoplaste) pour lesquels l'importation de protéines cytoplasmiques nécessite une préséquence. Les peptides signaux d'importation dans la mitochondrie ou dans les plastes diffèrent par la longueur de la préséquence (19 à 68 acides aminés pour les mitochondries contre 25 à 125 acides aminés pour les plastes) mais surtout par la présence préférentielle d'acides aminés. Pour l'importation dans la mitochondrie, la préséquence contient surtout de l'arginine puis de la leucine, de l'alanine et de la sérine. Pour les plastes, on observe surtout de la sérine, de l'alanine et très peu d'arginine et de leucine (Von Heijne, *et al.*, 1989). Enfin, l'extrémité N-terminale de la préséquence d'importation dans la mitochondrie est capable de former une hélice α amphiphile alors que la répartition des charges est quelconque pour l'importation dans les plastes. L'extrémité N-terminale de l'Hsp60 de *T. gondii* est particulièrement riche en arginine et les premiers acides aminés forment une hélice α amphiphile (figure 33); elle servirait donc à l'importation de l'Hsp60 dans la mitochondrie du parasite. Waller *et al.* ont d'ailleurs démontré qu'un peptide signal très différent, de 57 à 107 acides aminés, riche en sérine et en thréonine, était impliqué dans l'importation de protéines dans l'apicoplaste de *T. gondii* (Waller, *et al.*, 1998).

De plus, à son extrémité C-terminale, le motif répété GGM caractéristique des Hsp60 et Hsp70 mitochondriales est retrouvé. Ces résultats, associés à l'analyse phylogénique, confirment une origine endosymbiotique et une localisation mitochondriale pour cette protéine codée par un gène nucléaire.

L'expression dans *E. coli* d'une protéine recombinante immunogène a permis l'obtention d'un sérum polyclonal de souris dirigé contre l'Hsp60 de *T. gondii*. Comme les plantes, les Apicomplexa possèdent une mitochondrie et un plaste. Chez les plantes, une protéine de 60 kDa est présente dans la mitochondrie (Hsp60) et deux sous-unités de 60 kDa (Cpn60, sous unités α et β) sont trouvées dans le plaste. Les Hsp60 et les Cpn60 sont des chaperons moléculaires qui assistent, dans la mitochondrie ou dans le plaste, l'assemblage des complexes protéiques grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Ces deux protéines présentent des caractéristiques communes avec la protéine GroEL (Ellis and van der Vies, 1991). Bien qu'aucune Cpn60 n'ait été identifiée chez *T. gondii*, son existence est suggérée par l'importation de protéines dans l'apicoplaste (Waller, *et al.*, 1998). D'ailleurs, chez *P. falciparum* les gènes codant pour l'Hsp60 et la Cpn60 ont été séquencés (Holloway, *et al.*, 1994 ; Syin and Goldman, 1996). Bien que l'anticorps dirigé contre l'Hsp60 de *Tetrahymena thermophila* reconnaisse l'Hsp60 et la Cpn60 de *Zea mays* (Prasad and Hallberg, 1989), une reconnaissance croisée de notre sérum anti-Hsp60 de *T. gondii* pour la Cpn60 du toxoplasme est peu probable. L'anticorps de *T. thermophila* ne reconnaît la Cpn60 de *Z. mays* qu'à une concentration de 10 à 20 fois celle normalement contenue dans le plaste. En condition normale, lorsqu'une quantité identique de protéine est analysée, les anticorps dirigés contre l'Hsp60 mitochondriale ne réagissent pas avec la Cpn60 plastidiale (Prasad and Hallberg, 1989). De même, l'anticorps polyclonal dirigé contre l'Hsp60 de *P. falciparum*, utilisé en immunodétection ultrastructurale, ne reconnaît que la mitochondrie du parasite (Das, *et al.*, 1997).

Notre sérum anti-Hsp60, utilisé en immunofluorescence indirecte, confirme une localisation de la protéine Hsp60 dans un organe à structure ramifiée. Cet organe, observé par d'autres techniques en immunofluorescence (Sinai, *et al.*, 1997) et en microscopie électronique (Seeber, *et al.*, 1998) correspond à la mitochondrie de *T. gondii*. Enfin, par immunoempreinte, l'Hsp60 de *T. gondii* a été identifiée dans la fraction cellulaire enrichie en mitochondries après fractionnement en gradient de saccharose.

Même si la localisation de cette Hsp60 de *T. gondii* n'a pu être démontrée en microscopie électronique, toutes ces données attestent, sans aucune ambiguïté de sa localisation mitochondriale. C'est la première fois qu'un gène nucléaire codant pour une protéine mitochondriale est caractérisé chez *T. gondii*.

III. Identification d'un peptide signal pour l'importation de protéines dans la mitochondrie de *T. gondii*

Afin de déterminer la séquence minimale capable d'importer, *in vivo*, l'Hsp60 dans la mitochondrie, des peptides signaux, amplifiés à partir de l'ADNc codant pour la protéine (ADNc1) sont clonés en amont du gène rapporteur CAT dans un vecteur d'expression. Les différentes constructions sont testées en transfection transitoire et les résultats sont observés par immunofluorescence indirecte. Un peptide signal de 25 acides aminés, correspondant aux acides aminés 38-62 (PS1) ne permet pas l'importation de l'enzyme CAT dans la mitochondrie. Les 25 et 37 premiers acides aminés (PS2 et PS3) sont insuffisants pour l'importation de la protéine rapporteur. Seules, les constructions PS4-CAT et PS5-CAT contenant les 54 et 62 premiers acides aminés permettent l'importation de la protéine CAT. Ainsi, le peptide signal pour l'importation de l'Hsp60 de *T. gondii* dans sa mitochondrie comprend entre 37 AA et 54 AA. Ce peptide signal est plus long que celui rencontré habituellement pour les Hsp60 des autres eucaryotes puisqu'ils sont composés de 30 AA pour *P. falciparum*, 25 AA pour *S. cerevisiae*, 26 AA pour *H. sapiens* et 31 AA pour *A. thaliana*. Un tel résultat n'est cependant pas sans précédent, puisque l'Hsp60 de *D. melanogaster* possède une préséquence d'importation de 57 AA (n° d'accèsion O02649).

Les résultats obtenus par transfection transitoire, sont confirmés par l'analyse de tachyzoïtes ayant intégrés de façon stable, dans leur génome, la construction PS4-CAT. La co-localisation de l'Hsp60 et de la protéine rapporteur CAT, par immunofluorescence indirecte, et par immunoempreinte après fractionnement cellulaire, confirme que les 54 premiers acides aminés de la protéine Hsp60 de *T. gondii* sont capables d'importer la protéine exogène CAT *in vivo* dans la mitochondrie de *T. gondii*.

D'autres délétions devraient permettre de déterminer plus précisément la taille minimale (entre 37 et 54 acides aminés) requise pour la préséquence de l'Hsp60 mitochondriale du toxoplasme. Par ailleurs, les sites de clivage des séquences signal d'importation dans la mitochondrie comportent très souvent une arginine en position -2 (Von Heijne, *et al.*, 1989). Il serait intéressant, par mutation ponctuelle, d'étudier si l'arginine 44 joue effectivement un rôle dans le motif reconnu par les protéases de la matrice mitochondriale de *T. gondii*.

La protéine CAT, codant pour le Chloramphénicol Acétyl Transférase, est une protéine bactérienne utilisée chez *T. gondii* comme enzyme rapporteur ou pour la sélection de parasites modifiés génétiquement. L'inhibition de la croissance parasitaire par le chloramphénicol nécessite une longue sélection de 10 à 12 jours, et son mécanisme d'action est inconnu (Kim, *et al.*, 1993). La sélection des parasites PS4-CAT directement par le chloramphénicol, suggère que la cible moléculaire du chloramphénicol est localisée dans la mitochondrie. La localisation mitochondriale de l'enzyme CAT permet, en effet, tout comme sa localisation cytoplasmique, la survie des tachyzoïtes en présence de chloramphénicol.

IV. L'Hsp60 de *T. gondii* n'est pas inductible par un choc thermique

L'Hsp60 appartient à la famille des protéines de choc thermique (Hsp). Certaines protéines Hsp sont exprimées de façon constitutive dans les cellules, en conditions normales et seraient essentielles au développement normal de la cellule. D'autres protéines Hsp sont induites par différents stress environnementaux tels que des variations de température, un manque de glucose ou d'oxygène (Lindquist and Craig, 1988). Les Hsp60 mitochondriales sont ou ne sont pas inductibles en fonction des organismes. Ainsi, chez *S. cerevisiae* (Johnson, *et al.*, 1989), *Z. mays* et *A. thaliana* (Prasad and Stewart, 1992), un choc thermique induit une sur-expression de la protéine. Chez *T. cruzi*, les isoformes les plus acides de la protéine Hsp60 sont préférentiellement exprimés en cas d'une élévation de température (Sullivan, *et al.*, 1994). Chez *P. falciparum*, la quantité d'Hsp60 reste stable en cas de variation de température (Das, *et al.*, 1997) alors que l'ARNm est sur-exprimé (Syin and Goldman, 1996). L'expression de la protéine Hsp60 de *T. gondii* n'est pas inductible lorsque les parasites intracellulaires passent de 37°C à 42°C pendant 30 min.

V. Les Hsp60 des deux parasites Apicomplexa *T. gondii* et *P. falciparum* sont proches des Hsp60 des plantes supérieures

Les Hsp60 de *T. gondii* et *P. falciparum* sont phylogénétiquement proches des Hsp60 des plantes supérieures. Par ailleurs, l'analyse de la protéine Hsp30 spécifique des bradyzoïtes (Bohne, *et al.*, 1995) et de la protéine constitutive tubuline- α (Stokkermans, *et al.*, 1996) supportent la même origine monophylétique entre les Apicomplexa et les plantes supérieures.

Un résultat similaire a été obtenu récemment avec les enzymes émolase et phosphoglucose isomérase (Dzierszinski, *et al.*, 1999). De même, l'étude de la protéine Hsp90 (Bonnefoy, *et al.*, 1994) et de l'enzyme anti-oxydante glutathion peroxydase (Gamain, *et al.*, 1996) de *P. falciparum* confortent ces observations. En dehors de ces analyses phylogéniques, d'autres éléments rapprochent ces parasites des plantes supérieures. Les Apicomplexa possèdent un plaste résiduel non photosynthétique (l'apicoplaste) phylogéniquement proche des algues vertes (Köhler, *et al.*, 1997) et sont sensibles à de nombreux herbicides (dinitroaniline (Stokkermans, *et al.*, 1996), toltrazuril (Hackstein, *et al.*, 1995), glyphosate (Roberts, *et al.*, 1998)). Ainsi toutes ces données suggèrent fortement un rapprochement entre les plantes supérieures et les Apicomplexa. La mise en évidence de voies métaboliques spécifiques des végétaux ou de protéines ayant des caractéristiques de plante suscite un intérêt croissant dans le développement de drogues anti-parasitaires puisqu'aucun équivalent n'existerait chez les hôtes mammifères.

VI. Les transcrits Hsp60 sont présents dans les deux stades parasitaires et sont plus abondants au stade bradyzoïte

La présence des deux messagers issus du gène nucléaire Hsp60 de *T. gondii* a été démontrée par RT-PCR chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes. La mise au point d'une RT-PCR semi-quantitative a permis de démontrer d'une part que l'ARNm1 codant pour la protéine Hsp60 est plus abondant que l'ARNm2, et d'autre part, que les deux messagers sont sur-exprimés au stade bradyzoïte.

Une quantité accrue de l'ARNm1 comparativement à l'ARNm2 observée par RT-PCR confirme les résultats obtenus par l'amplification 5'RACE : 4 clones correspondant à l'extrémité 5' de l'ARNm1 contre 1 clone pour l'ARNm2. L'ARNm1, plus abondant que l'ARNm2 voit son extrémité 5' plus fréquemment amplifiée que celle de l'ARNm2.

La présence du second messenger (ARNm2) chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes est surprenante puisqu'il ne présente pas de cadre ouvert de lecture. Un autre codon, différent du codon ATG et situé juste en aval du codon stop TAA (nucléotides 135-137) pourrait initier la traduction d'une protéine ne différant de notre Hsp60 que par sa région N-terminale. La séparation des protéines totales de *T. gondii* en tenant compte à la fois des masses moléculaires et des points isoélectriques (gel bidimensionnel) suivie d'une hybridation avec notre anticorps

anti-Hsp60 vérifierait cette hypothèse. De même la séquence codant pour la protéine GFP (« Green Fluorescent Protein ») pourrait être clonée en phase avec l'ARNm2 afin de suivre directement, par immunofluorescence, si l'ARNm2 code pour une protéine.

La régulation transcriptionnelle semble souvent être utilisée dans l'expression des protéines spécifiques des stades tachyzoïtes ou bradyzoïtes. Ainsi les gènes codant pour les protéines de surface SAG1 (Burg, *et al.*, 1988) et SAG4 (Ödberg- Ferragut, *et al.*, 1996) sont spécifiquement transcrits chez les tachyzoïtes ou chez les bradyzoïtes. De même, le gène codant pour la protéine de choc thermique BAG1 (Bohne, *et al.*, 1995 ;Parmley, *et al.*, 1995) n'est transcrit que chez les bradyzoïtes alors que le gène codant pour l'isoforme 3 de la NTPase n'est transcrit que chez les tachyzoïtes (Nakaar, *et al.*, 1998). Contrairement à ces exemples, les transcrits Hsp60 sont présents dans les deux stades parasitaires. Les messagers sont cependant plus abondants chez les bradyzoïtes ce qui suggère que l'expression différentielle du gène Hsp60 entre les deux formes du toxoplasme pourrait se faire au niveau transcriptionnel. Une seconde hypothèse serait une transcription constitutive du gène Hsp60. L'abondance des messagers Hsp60 observée chez les bradyzoïtes par RT-PCR semi-quantitative résulterait alors d'une stabilité plus importante de ces messagers chez les bradyzoïtes. Dans ce cas, une moindre dégradation des ARNm Hsp60 au stade bradyzoïte serait spécifique de nos transcrits. En effet, contrairement à l'Hsp60, l'ARNm codant pour la protéine de surface P36 (BSR4) est exprimé de façon constitutive. Une quantité équivalente de messenger est observée après amplification dans les deux stades parasitaires alors que la protéine est uniquement trouvée chez les bradyzoïtes (Knoll and Boothroyd, 1998).

Les promoteurs des gènes du toxoplasme sont peu caractérisés. Bien que quelques motifs soient impliqués dans l'expression des gènes de *T. gondii*, aucun consensus n'est établi. Les mécanismes permettant la transcription des gènes dans l'un des stades parasitaires sont totalement méconnus. Il serait intéressant de cloner une plus grande région 5' du gène codant pour l'Hsp60 et d'étudier par transfection transitoire la séquence minimale capable d'induire la transcription et l'expression de la protéine rapporteur CAT. De même, l'expression de cette protéine pourrait être analysée lors de la différenciation *in vitro* des tachyzoïtes en bradyzoïtes. Des éléments régulateurs agissant *en cis* sur le promoteur du gène Hsp60 et régulant la transcription en fonction du développement parasite pourraient être ensuite déterminés par la technique de retard sur gel.

VII. L'Hsp60 est régulée au niveau post-transcriptionnel

Alors que les messagers sont abondamment présents chez les bradyzoïtes, par immunoempreinte, aucune protéine Hsp60 n'a été mise en évidence. De plus, par immunofluorescence, nous avons pu démontrer que la protéine Hsp60, absente des bradyzoïtes, ré-apparaît lors de leur différenciation en tachyzoïtes. La cinétique d'apparition de l'Hsp60 dans la mitochondrie de *T. gondii* suit la cinétique d'apparition de l'antigène majeur de surface P30. L'expression de ces protéines persiste lorsque les tachyzoïtes se multiplient activement. L'Hsp60 de *T. gondii* est donc régulée au niveau post-transcriptionnel afin de ne permettre son expression que chez les tachyzoïtes. D'autres gènes de *T. gondii*, tels que celui codant pour l'isoforme 1 de la lactate déshydrogénase (Yang and Parmley, 1997) ou pour la protéine de surface BSR4 (Knoll and Boothroyd, 1998) sont transcrits dans les deux stades parasitaires. La protéine LDH1 est spécifiquement synthétisée chez les tachyzoïtes alors que la protéine BSR4 n'apparaît que chez les bradyzoïtes. Identifier les séquences nucléotidiques et les facteurs protéiques intervenant dans la régulation de la synthèse protéique pourrait permettre de comprendre les mécanismes de la différenciation.

De nombreuses protéines de choc thermique sont régulées en fonction du développement chez les animaux et chez les plantes (Heikkila, 1993a ;Heikkila, 1993b). Chez *T. gondii*, une petite protéine de 30 kDa, l'Hsp30, homologue des Hsp de plantes, est spécifiquement exprimée chez les bradyzoïtes (BAG1 et BAG5,(Bohne, *et al.*, 1995 ;Parmley, *et al.*, 1995)). Un mutant nul pour le gène BAG1 montre d'ailleurs, *in vivo*, un nombre de kystes plus faible comparativement à la souche sauvage (Zhang, *et al.*, 1999). De plus, Silva *et al.* suggèrent qu'une Hsp70 serait impliquée dans la différenciation bradyzoïte-tachyzoïte lors de la réactivation des parasites enkystés (Silva, *et al.*, 1998). Un autre chaperon, de 72 kDa serait également impliquée dans la différenciation *in vitro* et *in vivo* en bradyzoïtes (Weiss, *et al.*, 1998 ;Weiss, *et al.*, 1996). Enfin, la quercétine, qui inhibe la synthèse des protéines Hsp90, Hsp70 et Hsp27, inhibe, *in vitro*, la différenciation en bradyzoïtes (Weiss, *et al.*, 1998). Ainsi, de nombreuses protéines de choc thermique sont impliquées, chez *T. gondii*, dans le mécanisme de la différenciation. Au contraire, l'Hsp60 mitochondriale n'est plus détectée dans

les bradyzoïtes, suggérant une régulation au niveau post-transcriptionnel lors de la différenciation en bradyzoïtes.

Chapitre III. Implication de l'expression des gènes *cyt b* et *Hsp60* sur les fonctions mitochondriales aux stades tachyzoïtes et bradyzoïtes

L'inhibition de la mitochondrie de *T. gondii* par des drogues anti-mitochondriales, par l'oxyde nitrique ou par l'atovaquone induit la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes. Ceci suggère que les bradyzoïtes sont moins dépendants de certaines fonctions mitochondriales. L'étude de l'expression des gènes codant pour les protéines mitochondriales *cyt b* et *Hsp60* de *T. gondii* pourrait permettre de comprendre certaines fonctions de la mitochondrie dans chacun des deux stades parasitaires. Les résultats obtenus précédemment sont résumés dans le tableau ci-dessous.

	Tachyzoïtes	Bradyzoïtes
Cytochrome b		
ARNm	+	+
Protéine	+	?
Hsp60		
ARNm1	++	+++
ARNm2	+	++
Protéine	+	-

Tableau 4: Expression des gènes codant pour le cytochrome b et l'*Hsp60* de *T. gondii* chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes. La mise en évidence des ARNm et des protéines est symbolisée par un signe plus (+). La présence de la protéine *cyt b* n'a pu être déterminée chez les bradyzoïtes. Ceci est illustré par un point d'interrogation (?).

Pour l'*Hsp60*, le nombre de signe plus représente la proportion de messagers observés par RT-PCR semi-quantitative. L'absence de la protéine *Hsp60* chez les bradyzoïtes est illustrée par le signe moins (-).

I. La mitochondrie des tachyzoïtes et des bradyzoïtes est capable d'importer des protéines cytoplasmiques

Tout d'abord, ce travail démontre qu'un potentiel membranaire et qu'un système d'importation efficace permettent le transfert de protéines cytoplasmiques dans la mitochondrie de *T. gondii*, chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes. En effet, chez les tachyzoïtes,

l'importation de la protéine endogène Hsp60 et de la protéine exogène CAT dans la mitochondrie de *T. gondii* a été démontrée, *in vivo*. Chez les bradyzoïtes, l'amplification de l'ARNm codant pour le cyt b sous-entend l'importation des protéines nécessaires à la transcription du gène du cyt b situé sur l'ADNmt.

II. Le complexe *b-c1* serait fonctionnel chez les tachyzoïtes

La protéine Hsp60 est une protéine du système d'importation dans la mitochondrie indispensable pour la formation des complexes enzymatiques. Son expression au stade tachyzoïte concorde avec la mise en évidence d'un complexe *b-c1* fonctionnel. Nous avons en effet amplifié l'ARNm codant pour le cyt b et l'analyse des mutants atovaquone^R (McFadden, *et al.*, 1999) a démontré la présence de la protéine. Ces résultats sont cohérents avec l'inhibition des tachyzoïtes par l'antimycine A agissant *via* le cyt b (Bohne, *et al.*, 1994 ;Tomavo and Boothroyd, 1995).

Ainsi, une des fonctions de la mitochondrie chez les tachyzoïtes passe par le complexe *b-c1*. Cependant, la mise en évidence d'un complexe *b-c1* fonctionnel n'implique pas la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative. Les protéines du cycles de Krebs sont présentes chez les tachyzoïtes (Denton, *et al.*, 1996b) mais de nombreuses protéines de la glycolyse tels que la phosphoglucose isomérase (Dzierszinski, *et al.*, 1999), l'énolase (Dzierszinski, *et al.*, 1999 ;Manger, *et al.*, 1998a) et la lactate déshydrogénase (Yang and Parmley, 1997) ont été identifiées. Denton *et al.* (Denton, *et al.*, 1996b) ont également démontré une faible production d'acétate, ce qui suggère que l'oxydation à travers le cycle de Krebs associée à la chaîne respiratoire ne contribuerait que très peu à la production d'énergie chez les tachyzoïtes. Ceci expliquerait la présence d'une phosphofructokinase dépendante du pyrophosphate dont le rendement est de moitié supérieur à celui des phosphofructokinases dépendantes de l'ATP que l'on rencontre habituellement chez les mammifères (Denton, *et al.*, 1996a). Ainsi la production d'ATP par la mitochondrie des tachyzoïtes n'est pas évidente et si elle y contribue, son rôle serait minime comparativement à la glycolyse.

La chaîne de transport des électrons peut être couplée, chez *T. gondii*, à d'autres métabolismes que la phosphorylation oxydative. En effet, chez *P. falciparum*, la chaîne de transport d'électrons est couplée à la synthèse des pyrimidines par la dihydroorotate déshydrogénase et son inhibition, par l'atovaquone, est létale pour le parasite (fig. 34-A) (Fry,

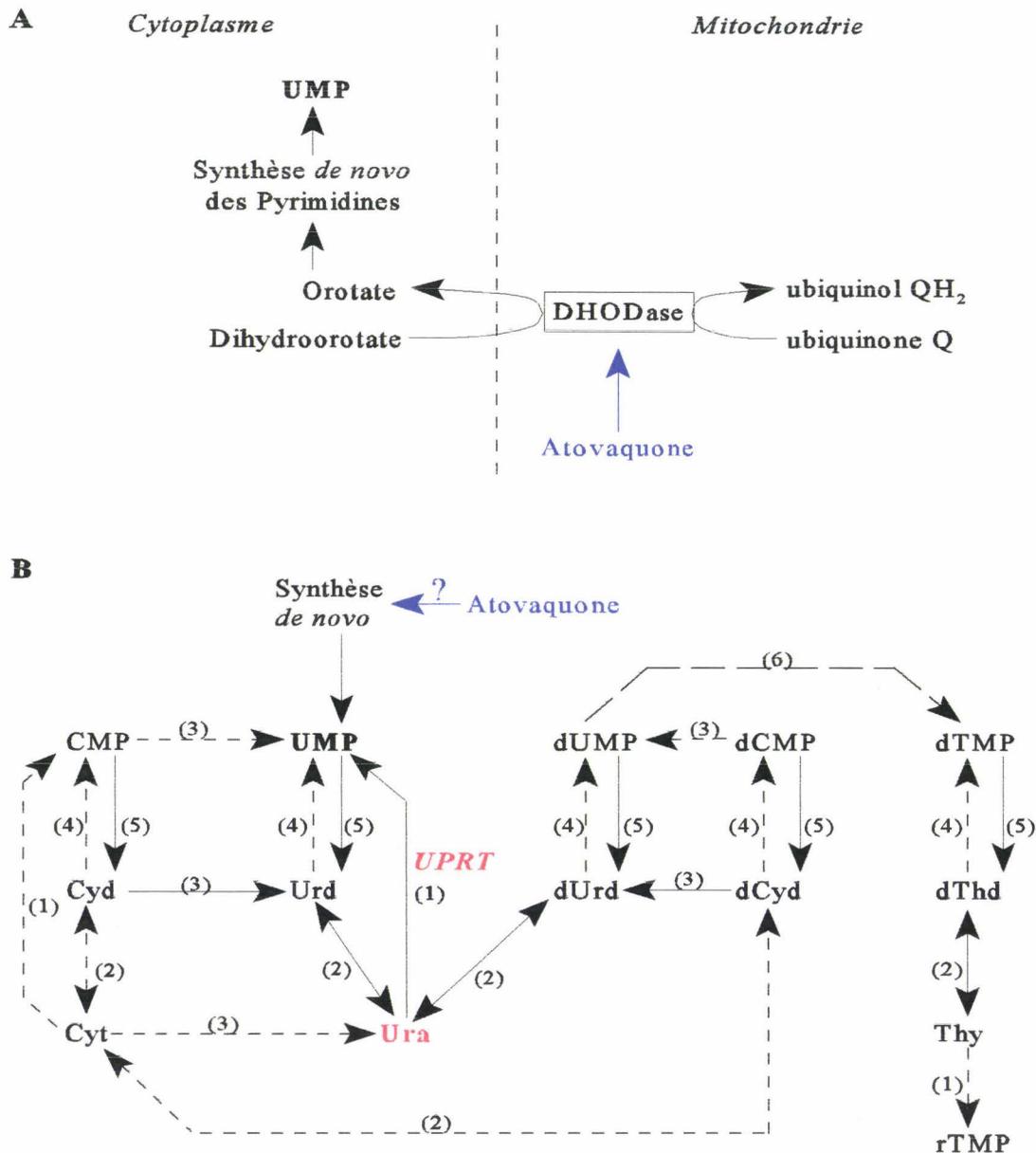


Figure 34: Voie métabolique des pyrimidines chez *P. falciparum* (A, d'après Fry, M, 1991) et *T. gondii* (B, d'après Iltzsch M. H., 1993). **A** : *P. falciparum* ne dépend que de la biosynthèse *de novo* des pyrimidines. L'enzyme dihydroorotate déshydrogénase (DHODase) est localisée dans la mitochondrie et est inhibée par l'atovaquone. **B** : *T. gondii* est capable de récupérer les pyrimidines et de faire la biosynthèse *de novo*. Les flèches pleines représentent les activités détectées chez *T. gondii*, les pointillés indiquent les activités non détectées et les longs pointillés schématisent les activités enzymatiques non testées. (1): phosphoribosyltransférase, (2): nucléoside phosphorylase, (3): déaminase, (4):nucléoside kinase, (5): nucléoside 5'-monophosphate phosphohydrolase, (6): thymidylate synthétase, UPRT: uracile phosphoribosyltransférase.

1991). En revanche, *T. gondii* est capable de récupérer les pyrimidines et ne dépend pas uniquement de leur biosynthèse *de novo*. Pfefferkorn *et al.* ont d'ailleurs démontré que l'ajout d'uracile dans le milieu de culture de parasites sauvages n'augmentait pas leur seuil de sensibilité pour l'atovaquone ; c'est-à-dire que lorsque la voie de récupération des pyrimidines est favorisée, elle ne compense pas la voie de synthèse *de novo* si elle était inhibée par l'atovaquone (fig. 34-B). De plus, ces auteurs ont démontrés que des mutants dépourvus de l'activité enzymatique UPRT (fig. 34-B), incapables de récupérer les pyrimidines n'étaient pas plus sensibles à l'atovaquone ; c'est-à-dire que chez des parasites ne dépendant que de la biosynthèse *de novo* des pyrimidines, l'atovaquone a un effet inhibiteur identique à celui de la souche sauvage (Pfefferkorn, *et al.*, 1993). Il semblerait donc que l'atovaquone, chez *T. gondii*, n'ait pas d'effet sur la synthèse *de novo* des pyrimidines. L'effet physiologique de l'atovaquone diffère donc entre ces deux parasites et le complexe *b-c1*, chez *T. gondii* doit être couplé à d'autres voies métaboliques que la biosynthèse des pyrimidines.

III. Les bradyzoïtes dépendraient moins de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale

La présence ou l'absence de la protéine cyt b n'a pas été déterminée chez les bradyzoïtes. L'absence de la protéine Hsp60 dans les parasites enkystés n'implique pas l'absence d'un système d'importation, mais bien l'absence des structures quaternaires indispensables aux complexes enzymatiques de la chaîne de transport des électrons et de la synthèse d'ATP. Ces résultats, associés à l'absence des enzymes du cycle carboxylique suggèrent que l'énergie ne provient pas de la phosphorylation oxydative chez les bradyzoïtes. En effet, des isoformes d'enzymes de la glycolyse telles que l'énolase (Dzierszinski, *et al.*, 1999 ;Manger, *et al.*, 1998a) et la lactate déshydrogénase (Yang and Parmley, 1995 ;Yang and Parmley, 1997) sont spécifiques des bradyzoïtes. Les pyruvate kinase et lactate déshydrogénase sont d'ailleurs plus actives chez les bradyzoïtes comparativement aux tachyzoïtes (Denton, *et al.*, 1996b). La glycolyse, couplée à la fermentation en lactate serait un moyen adaptatif, pour la production d'ATP chez les bradyzoïtes. Ainsi, il est possible que les tachyzoïtes utilisent la glycolyse et la phosphorylation oxydative pour leur énergie et que la glycolyse devienne la seule source d'énergie lors de la différenciation en bradyzoïtes.

Une hypothèse intéressante quant à l'accumulation des messagers au stade bradyzoïte serait une disponibilité plus rapide de la protéine lors de la différenciation en tachyzoïte. En effet, la différenciation en tachyzoïte s'accompagne de la dégradation de l'amylopectine et une quantité importante de glucose est alors disponible dans le cytoplasme. Si l'ATP, chez les tachyzoïtes, provient de la phosphorylation oxydative, l'Hsp60 est rapidement nécessaire à la formation des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire. De même, si les tachyzoïtes ne synthétisent pas l'ATP par phosphorylation oxydative, la protéine Hsp60 reste indispensable pour la formation des complexes de la chaîne de transport des électrons, dont le rôle essentiel est démontré par l'atovaquone. La présence des transcrits codant pour l'Hsp60 chez les bradyzoïtes permettrait donc leur traduction en une chaperonine immédiatement disponible lors de la différenciation en tachyzoïtes.

La synthèse de peptides correspondant au cyt b serait un moyen d'obtenir un sérum polyclonal dirigé contre le cyt b et de déterminer s'il est présent chez les bradyzoïtes. Deux approches indirectes peuvent également être envisagées puisqu'une chaîne de transport d'électrons fonctionnelle et la synthèse d'ATP impliquent l'expression de toutes les protéines des complexes enzymatiques. D'une part, la caractérisation de l'ADNmt est une étape indispensable pour déterminer si la transcription des gènes mitochondriaux est constitutive ou régulée dans les deux formes parasitaires. Pour la première fois la transcription de l'ADNmt dans les deux stades parasitaires est mise en évidence. L'obtention d'une sonde spécifique de l'ADNmt est une première étape pour sa caractérisation. Une approche par gradient de CsCl ou par électrophorèse en champ pulsé est envisagée. D'autre part, certaines protéines telles que le cytochrome c, la protéine de Rieske, les sous-unités de la cytochrome c oxydase et de l'ATP synthétase sont communes à tous les organismes étudiés et une approche par RT-PCR, suivie de l'expression de protéines recombinantes et de l'obtention de sérum polyclonaux pourrait être un moyen de déterminer si les transcrits sont présents et si les protéines sont exprimées chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes.

Conclusion-Perspectives

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons réussi à cloner et séquencer l'ADNc codant pour le cyt b de *T. gondii*. Il code pour une protéine dont toutes les caractéristiques structurales correspondent à celles des autres cyt b, ce qui suggère une protéine fonctionnelle. La transcription de ce gène mitochondrial a été mise en évidence chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes. Le cyt b n'est pas impliqué dans nos mutants résistants à deux drogues anti-toxoplasmiques, la 4-pyridone et l'atovaquone.

Dans une seconde partie, un gène nucléaire codant pour le chaperon mitochondrial Hsp60 a été caractérisé. Par épissage alternatif, il peut être transcrit en deux messagers ne divergeant que sur leur extrémité 5'. Cependant, un seul de ces messagers code pour une protéine Hsp60 localisée dans la mitochondrie de *T. gondii* grâce à un peptide signal de 37 à 54 acides aminés. Alors que les deux ARNm du gène Hsp60 sont présents chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes et que ces deux messagers sont plus abondants chez les bradyzoïtes, la protéine Hsp60 n'est pas détectée chez les bradyzoïtes et ré-apparaît lors de la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes. Ceci suggère une régulation à la fois transcriptionnelle et post-transcriptionnelle pour une expression spécifique de la protéine Hsp60 de *T. gondii*.

Ainsi, la détection du chaperon Hsp60 et de la protéine cyt b chez les tachyzoïtes concorde avec un complexe *b-c1* fonctionnel et l'implication de la chaîne de transport d'électrons dans ce stade parasitaire. Chez les bradyzoïtes, l'absence de la protéine Hsp60, essentielle à l'assemblage des complexes enzymatiques de la mitochondrie est cohérent avec une dépendance moindre de cette voie métabolique.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives, tant sur le plan fondamental qu'appliqué.

- Sur le plan fondamental :

L'ADNc codant pour le cyt b pourra être utilisé comme une sonde spécifique pour la caractérisation de l'ADNmt de *T. gondii*. L'étude de la transcription de l'ADNmt et de la traduction de ses ARNm chez les tachyzoïtes et chez les bradyzoïtes permettra d'approfondir les fonctions mitochondriales dans chacun de ces stades.

La régulation de l'expression de l'Hsp60 au cours de la différenciation pourra être abordée par l'étude de son promoteur mais surtout par l'étude des régions non traduites et des facteurs protéiques intervenant pour l'expression de la protéine chez les tachyzoïtes.

- Sur le plan appliqué :

Appréhender les mécanismes de régulation des gènes mitochondriaux et nucléaires codant pour des protéines mitochondriales entre les tachyzoïtes et les bradyzoïtes pourra permettre de comprendre les mécanismes moléculaires de la différenciation. Ceci pourrait permettre d'éviter l'enkystement des toxoplasmes et de maintenir les parasites sous la forme tachyzoïte qui est sensible au système immunitaire et à de nombreuses drogues anti-toxoplasmiques. Par ailleurs, bloquer la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes éviterait la réactivation des formes latentes. En cas d'immunodépression, la pathogenèse se trouverait diminuée ou inexistante. Comprendre ces mécanismes de régulation permettra d'interférer avec la mise en place de voies métaboliques spécifiques d'un stade parasitaire.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail, associé à la mise en évidence d'enzymes de la glycolyse spécifiques des stades parasitaires suggère une corrélation entre la différenciation de *T. gondii* et une altération dans le métabolisme des carbohydrates ou la production d'énergie. L'association d'inhibiteurs de la mitochondrie (atovaquone) et de la glycolyse semble donc être une combinaison thérapeutique idéale contre le développement intracellulaire de *T. gondii*. Différents travaux, réalisés dans notre laboratoire ou par d'autres équipes ont ainsi mis en évidence que les enzymes de la glycolyse telles que l'énolase (Dzierszinski, *et al.*, ;Manger, *et al.*, 1998a), la phosphoglucoseisomérase (Dzierszinski, *et al.*,), la lactate déshydrogénase (Gomez, *et al.*, 1997 ;Yang and Parmley, 1997), et la phosphofructokinase (Denton, *et al.*, 1996a ;Peng, *et al.*, 1995) présentent des caractéristiques spécifiques aux Apicomplexa et pourraient servir de cible thérapeutique.

Matériels et Méthodes

I. Techniques de Biologie Moléculaire

I. 1. Extraction d'acides nucléiques

I. 1. 1. Extraction d'ADN

L'ADN génomique est extrait de tachyzoïtes purifiés et de cellules HFF non infestées (contrôle négatif). Les échantillons sont digérés, pendant une nuit, à 55°C, dans une solution contenant 0,5% SDS; 100 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl-pH 8; 20 µg/ml RNase A et 1 mg/ml Protéinase K (Boehringer Mannheim). Les protéines contaminantes sont éliminées par une double extraction au phénol (V/V) suivies d'une extraction au chloroforme (V/V). L'ADN contenu dans la phase aqueuse est alors précipité, sur la nuit, à -20°C, par 0,3 M d'acétate de sodium pH 6 et 2 volumes d'éthanol absolu. L'ADN est ensuite lavé à l'éthanol 80° froid, séché sous vide et repris dans de l'eau distillée ou dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM). La concentration de l'ADN est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm, sachant que 1 unité de DO correspond à 50 µg d'ADN par ml. La pureté de la préparation est contrôlée par le calcul du rapport DO_{260 nm}/DO_{280 nm} qui doit être proche de 2.

I. 1. 2. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont issus de tachyzoïtes et de bradyzoïtes purifiés ainsi que de cellules HFF non infestées et de cerveaux d'animaux sains (contrôles négatifs). Les échantillons sont tout d'abord lavés en PBS, puis repris par un tampon de lyse (1% SDS; 50 mM acétate de sodium-pH 5,2; 10 mM EDTA). Un volume identique de phénol équilibré par 50 mM d'acétate de sodium-pH 5,2 est ajouté et les échantillons sont incubés à 65°C, pendant 15 min, avec de fréquentes agitations. Après une centrifugation de 5 min à 13 000 g, la phase aqueuse supérieure est conservée et le phénol de la phase inférieure est ré-extrait par l'ajout d'un demi-volume de tampon de lyse. Les deux phases aqueuses ainsi obtenues sont mélangées et extraites à nouveau par un volume de phénol, suivi de deux extractions au chloroforme. Les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont précipités, sur la nuit, à -20°C, par 0,3 M

d'acétate de sodium-pH 5,2 et 3 volumes d'éthanol absolu. Ils sont ensuite lavés par de l'éthanol à 80° froid, séchés et repris dans de l'eau déminéralisée autoclavée contenant 0,1% de diéthyl pyrocarbonate (DEPC), un inhibiteur de RNAses.

I. 2. Réactions de polymérisation en chaîne (« PCR »)

Les amorces sens et anti-sens utilisées au cours de ce travail ont été synthétisées par les laboratoires Eurogentec (Belgique).

Les PCR sont réalisées à partir d'environ 500 ng d'ADN génomique matrice, de 2,5 µM d'amorces, de 5 U de l'enzyme ADN polymérase *Taq* (Promega) et de chacun des 4 dNTP à la concentration de 200 µM. La réaction se fait dans le tampon suivant : 10 mM Tris-HCl pH9; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 1,5 mM MgCl₂ et le volume réactionnel de 50 µl est recouvert d'huile minérale pour éviter l'évaporation.

Un thermocycleur automatique (Mini-cycler, Prolabo) a permis de réaliser les variations cycliques de températures suivantes. Une première dénaturation (94°C, 10 min) est suivie de 35 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min, une étape d'hybridation d'une minute et une étape d'élongation à 72°C pendant 2 min à 3 min. Les températures d'hybridation dépendent du pourcentage en bases GC des amorces et sont précisées dans les tableaux 9 et 11. Une dernière élongation de 10 min à 72 °C termine la PCR.

Les produits amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse en tampon TAE (Tris 40 mM; acétate 40 mM; EDTA 1 mM-pH 8) sur gel d'agarose (Gibco BRL) contenant du bromure d'éthidium (BET; 0,5 µg/ml). L'exposition aux ultraviolets révèle la fluorescence émise par le BET intercalé dans l'ADN. La taille des fragments d'ADN ainsi visualisés est déduite par comparaison avec des marqueurs de poids moléculaire (Boehringer Mannheim).

Amorce	Séquence	Sens	Position	N° séquence
Amorces dégénérées pour l'amplification du fragment de 420 pb du cyt b de <i>T. gondii</i> par RT-PCR				
CYTA	5'-GTCYTNCCNTGGGGNCARATG-3'	S	484-504	AF015627
CYTB	5'-NARRAARTACCAAYTCNGG-3'	AS	898-878	//
Amorces pour l'amplification par RACE du cyt b de <i>T. gondii</i>				
CYT2	5'-TTTTATCTTGCCTTTTATTGG-3'	S	642-644	AF015627
CYT3	5'-GGCTACTTGGAGGTTACTACTG-3'	S	566-586	//
CYT4	5'-GTTCCATCAAACCAAAAAGCCGC-3'	AS	823-802	//
CYT5	5'-TGCAGGATTGCTAGAACCATT-3'	AS	705-685	//
Amorces pour l'amplification par RACE de l'Hsp60 de <i>T. gondii</i>				
HSP1	5'-ACCGTCGCGGCCACCTTCTC-3'	AS	641-621	AF065609
HSP2	5'-CCGTGGATGCGGGAATGAACC-3'	S	439-459	//
HSP3	5'-GTCTCCGTTGCGCGAGATCGT-3'	AS	587-567	//
HSP5	5'-CTGGGAGCCCAGTTGGTGAAG-3'	S	327-347	//
HSP6	5'-CGCCGGTGACGGGACAACCAC-3'	S	374-394	//
Amorces non spécifiques du kit Marathon utilisées pour l'amplification par RACE				
AP1	5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'			
AP2	5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'			
Amorces pour l'obtention des ADNc complets du cytb et de l'Hsp60 par RT-PCR				
CYT6	5'-ATGGTTTCGAGAACACTCAGT-3'	S	91-111	AF015627
CYT7	5'-TTAGTATAAGCATAGAACCAATCC-3'	AS	1198-1174	//
HSP7	5'-CCTTGGCCTCCTTTCTTCTCT-3'	S	1-21	AF065609
HSP8	5'-ATGTACATCCACTGTTATTTTC-3'	S	98-118	AF065610
HSP9	5'-CTAGTACATGCCTCCCATGCC-3'	AS	1764-1784	AF065609
Amorces contrôles des RT-PCR				
SAG1S	5'-GGCGATGCATGGTTTTTTGACGAGTATG-3'	S	Burg et al. 1988	
SAG1AS	5'-GGCCTTAATTAATCACGCGACACAAGCTGCG-3'	AS	//	
SAG4S	5'-AAGAGCTGGACCTACG-3'	S	Ödberg- Ferragut et al. 1996	
SAG4AS	5'-TTACATTGATATCAACACAAAGGC-3'	AS	//	
ACTS	5'-ATCGTCGCGCATTGTGAC-3'	S	Dobrowolski et al. 1996	
ACTAS	5'-TCGGGATCCAGATGGCGGATGAAAG-3'	AS	//	
TUBS	5'-ATGAGAGAGGTTATCAGCATC-3'	S	Nagel et al. 1988	
TUBAS	5'-TTAGTACTCGTCACCATAGCC-3'	AS	//	

Tableau 5: Nom, séquence, et position ou référence des amorces choisies pour l'amplification par RT-PCR ou par la méthode de « RACE » des ARNm partiels ou complets des gènes codant pour le cytochrome b et l'Hsp60 de *T. gondii*.

N=[A, g, C, T]; Y=[C, T]; R=[A, g]; S: Sens; AS: Antisens

I. 3. Obtention d'un fragment d'ADNc codant pour le cytochrome b de *T.gondii* par RT-PCR

Des amorces dégénérées (amorces CYTA et CYTB, tableau 5) basées sur les AA conservés chez tous les cytochromes b (VLPWGQM, VPEWYF) sont choisies. Afin d'éviter ou de minimiser l'amplification des pseudogènes nucléaires (Ossorio, *et al.*, 1991) par PCR, la transcription inverse des ARNm suivie d'une amplification en chaîne (RT-PCR) est préférée.

Les ARNm sont purifiés de tachyzoïtes de la souche PLK en utilisant le kit de purification QuickPrep[®]Micro (Pharmacia Biotech). La synthèse d'ADNc simple brin est réalisée, à 42°C pendant 1h, par l'hybridation d'oligonucléotide poly(dT)₁₈ sur 1 µg d'ARNm, en présence de la transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine (100 unités, « Moloney murine leukemia virus », MMLV, Stratagène) et de 10 nmol de dNTP.

La RT-PCR suit les conditions de la PCR mais la matrice consiste en l'ADNc simple brin, obtenu précédemment, et dilué 8 fois dans de l'eau distillée. Elle est réalisée en présence du vingtième (1/20^e) de l'ADNc dilué, et l'hybridation des amorces dégénérées CYTA et CYTB s'effectue à 45°C. Le résultat est analysé en gel d'agarose 1% et le fragment d'environ 420 pb est purifié, cloné puis séquencé.

I. 4. Purification de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose

La zone de gel d'agarose, contenant les fragments d'ADN d'intérêts, est prélevée et dissoute à 50°C pendant 5 min en présence de NaI 6 M. L'adjonction d'une suspension de billes de silice (Glassmilk, Geneclean II kit, Bio 101 Inc.) permet l'accrochage de l'ADN qui, après plusieurs lavages, est élué par de l'eau distillée. La quantité de produit purifié est évaluée sur gel d'agarose.

Les fragments d'ADN dont la taille attendue est inférieure à 200 pb sont séparés sur gel d'agarose « Low Melting Point » (agarose LMP, Gibco BRL) à 2%. Le fragment d'agarose contenant l'ADN d'intérêt est découpé et du tampon TE (Tris-HCl 10 mM-pH 8; EDTA 1 mM) est ajouté pour obtenir une concentration d'agarose inférieure ou égale à 0,4%. Il est alors dissout 10 min à 65°C avant l'ajout d'un volume de phénol et d'une nouvelle incubation

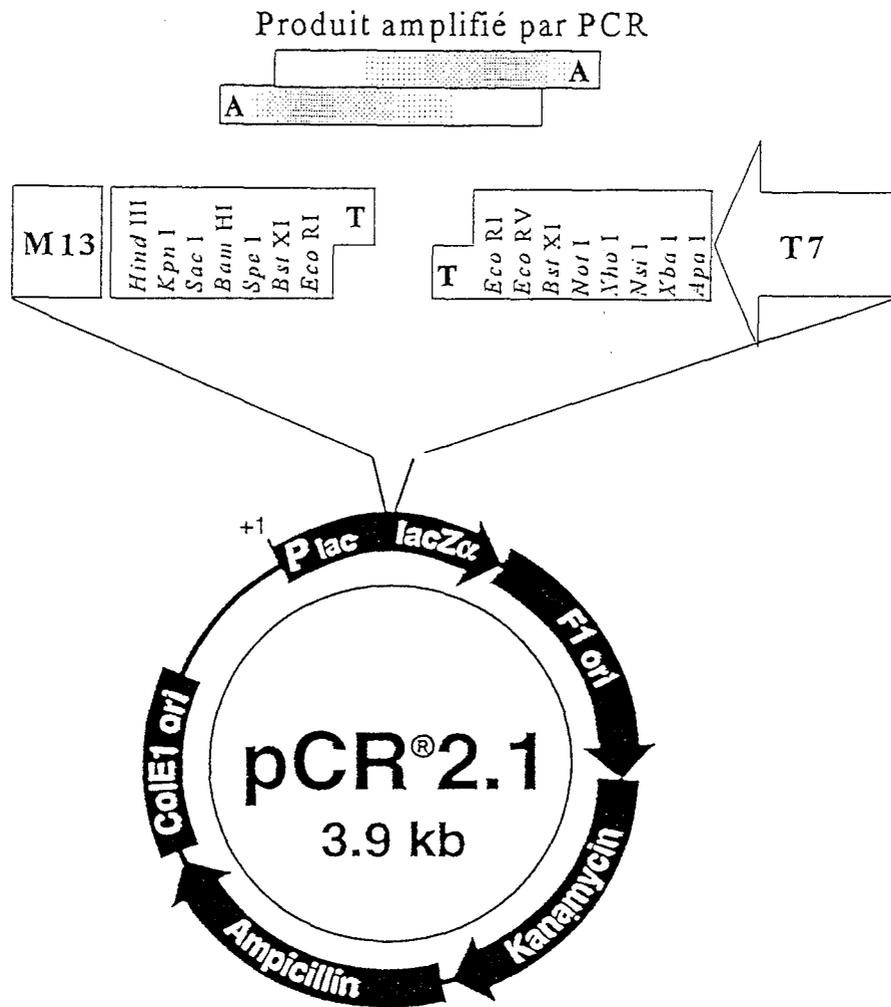


Figure 35: Vecteur de clonage pCR 2.1.

Ori, ColE1: origines de réplique plasmidique chez *E. coli*

f1 ori, origine de réplique du phage f1

amp^R, ampicilline, gène codant pour la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline ou à ses dérivés

kanamycine, gène conférant la résistance à la kanamycine

lacZα gène codant pour la partie α de la β-galactosidase

Plac, promoteur inducible par l'IPTG permettant la transcription du gène lacZα

T7 promoteur permettant la transcription par l'ARN polymérase du phage T7

M13, amorce réverse

de 15 min à 65°C. La phase organique est séparée de la phase aqueuse supérieure par une centrifugation de 10 min à 13 000 g. L'ADN contenu dans la phase supérieure est conservé et le phénol de la phase inférieure est ré-extrait par un demi-volume de TE suivi d'une incubation de 15 min à 65°C. Après une nouvelle centrifugation, les deux phases aqueuses obtenues sont mélangées et subissent deux extractions au chloroforme. L'ADN ainsi purifié est précipité sur la nuit à -20°C, en présence d'acétate de sodium 0,3 M et de 2,5 volumes d'éthanol absolu. Il est ensuite lavé par de l'éthanol à 80° froid, séché sous vide, et repris dans de l'eau distillée. La quantité d'ADN purifié est évaluée sur gel d'agarose.

I. 5. Les techniques de clonage d'ADN

L'enzyme ADN polymérase *Taq* (Promega) utilisée ajoute un résidu déoxyadénosine à l'extrémité 3' du produit amplifié. Ceci permet l'insertion du fragment amplifié dans le vecteur pCR[®]2.1 (Original TA Cloning[®] Kit, Invitrogen, figure 35), linéarisé et présentant des résidus déoxythymidine à ses extrémités 3'. La ligation est réalisée sur la nuit, à 14°C, par l'enzyme T4 ADN ligase (Original TA Cloning[®] Kit, Invitrogen). Le produit ligué est ensuite dialysé contre de l'eau distillée sur une membrane 0,0025 µm (Costar) avant électroporation dans des bactéries compétentes.

Des bactéries *E. coli* XL1-Blue (Stratagène) en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm}=0,6$) dans du milieu LB (Luria Bertani : 10 g/l tryptone, 5 g/l extraits de levure, 10 g/l NaCl) sont refroidies à 4°C pendant 30 min puis centrifugées à 4 000 g pendant 15 min. Elles sont ensuite rincées deux fois par de l'eau distillée, une fois dans de l'eau glycérolée à 10% et finalement reprises par un faible volume d'eau contenant 10% de glycérol (Sigma). Les bactéries sont utilisées immédiatement ou des aliquots de 50 µl sont conservés à -80°C.

L'ADN dialysé (1/4 de la ligation) est mélangé à 40 µl de bactéries compétentes dans des cuvettes d'électroporation de 2 mm de largeur (BTX). La transformation se fait par électroporation des bactéries selon les paramètres suivants : 2500V; 129Ω; 4,5 ms à 6 ms (Electro Cell Manipulator 600, BTX). Les bactéries sont immédiatement reprises par 1 ml de milieu LB et sont incubées 1h à 37°C. Cette étape permet l'expression du gène plasmidique

Nom amorce	Séquence
CYT5	5'-TGCAGGATTGCTAGAACCATT-3'
CATAS	5'-CAACTGACTGAAATGCCTCAA-3'
T7	5'-AATACGACTCACTATAG-3'
Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
Universal	5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'

Tableau 6: Nom et séquence des amorces utilisées en séquençage. Les amorces pour le séquençage progressif des ADNc ou de l'ADN génomique ne sont pas précisées.

codant pour la résistance à l'ampicilline. Les bactéries sont alors étalées sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB-Bactoagar (15 g/l), ampicilline (50 µg/ml), X-gal (2%), IPTG (10 mM). Après une nuit à 37°C, les colonies bactériennes contenant le plasmide sont isolées.

L'ADN plasmidique est extrait des colonies positives par la méthode de lyse alcaline (Maniatis, *et al.*, 1990) ou suivant un protocole de minipréparations plasmidiques du kit Bio101 (Bio101, Inc.). L'ADN plasmidique digéré par les enzymes de restriction appropriées est vérifié sur gel d'agarose 1%. Lorsque les fragments d'ADN correspondent au profil de restriction attendu, les clones sont amplifiés et de grandes quantités de plasmides sont purifiées selon le kit Qiagen. La concentration de l'ADN est alors déterminée par mesure spectrophotométrique à 260 nm. Les plasmides contenant l'insert d'intérêt sont ainsi prêts pour le séquençage.

I. 6. Séquençage

Le séquençage automatique est réalisé grâce à l'appareil « Automated Laser Fluorescent ALF™ DNA Sequencer » (Pharmacia Biotech). Le principe des réactions suit la méthode de terminaison des chaînes décrite par Sanger *et al.* (Sanger, *et al.*, 1977).

L'ADN plasmidique double brin (10 µg) est dénaturé pendant 10 min à température ambiante par 0,4 M de NaOH, précipité puis repris dans de l'eau distillée. La matrice s'apparie ensuite avec 1 à 10 pmol d'amorces du kit (Universal Primer M13 -20 et Reverse Primer; tableau 7) marquées par un fluorochrome (Cy5 indodicarbocyanine), ou avec des amorces internes, spécifiques de l'insert. L'hybridation est réalisée à 65°C pendant 5 min puis à 37°C pendant 10 min et enfin, à température ambiante pendant 10 min.

Dans le cas des amorces internes, l'incorporation du dATP marqué au Cy5 (Fluore-dATP Labelling mix, Pharmacia Biotech) est alors réalisée par une courte élongation de 5 min à 37°C en présence de l'enzyme ADN polymérase T7 (AutoRead™ Sequencing kit, Pharmacia Biotech) et de chacun des trois autres nucléosides triphosphate (dGTP, dTTP, dCTP).

Le tampon d'élongation (304 mM d'acide citrique, 324 mM de DTT et 40 mM de MnCl₂-pH7,5) et du DMSO sont alors ajoutés. Pour le séquençage avec les amorces du kit, l'enzyme ADN polymérase T7 est ajoutée à cette étape. Le mélange réactionnel est ensuite

réparti entre 4 tubes, chacun contenant 50 mM de NaCl, 40 mM de Tris-HCl (pH 7,6), les 4 dNTP en excès (1 mM) et l'un des 4 ddNTP (5 μ M). Une incubation de 5 min à 37°C de ces 4 tubes permet l'élongation et l'arrêt de polymérisation par les ddNTP, statistiquement à chacune des positions possibles en aval de l'amorce. La réaction est finalement arrêtée dans les 4 tubes, par une solution à 100% de formamide contenant 5 mg/ml de bleu Dextran 2000.

Les échantillons sont dénaturés et déposés sur un gel dénaturant de polyacrylamide 6% (ReadyMix, Pharmacia Biotech). La migration s'effectue en tampon TBE 0,6x sous une puissance de 25W, à une température constante de 55°C. Le laser est fixe et détecte les fragments d'ADN de différentes taille marqués par le fluorochrome, au fur et à mesure de leur passage.

Un logiciel AlfinTM, version 10.1 permet de convertir les signaux fluorescents en bases nucléiques et d'obtenir directement les séquences.

I. 7. Obtention des extrémités 5' et 3' des ADNc (« RACE »)

Les extrémités 5' et 3' des ADNc sont obtenues par la technique du « RACE » (Rapid Amplification of cDNA Ends) selon le protocole Marathon (MarathonTM cDNA Amplification Kit, Clontech).

I. 7. 1. Construction de la banque d'ADNc

Les ARNm sont purifiés de tachyzoïtes de la souche PLK en utilisant le kit de purification QuickPrep[®] Micro (Pharmacia Biotech). Un microgramme d'ARNm est mélangé avec 2 μ mol d'oligonucléotide poly(dT)₃₀ qui s'hybride sur la séquence polyA des ARNm. La température d'hybridation est de 70°C pendant 2 min, puis le tube est refroidi 2 min sur la glace. La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée, à partir de l'oligonucléotide poly(dT)₃₀, par la transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine (100 unités, « Moloney murine leukemia virus », MMLV), en présence de 10 mmol de dNTP, à 42°C pendant 1h.

La seconde étape consiste à dégrader le brin d'ARNm par la RNase H d'*E. coli*, puis à synthétiser le second brin de l'ADNc par l'ADN polymérase I d'*E. coli* suivie de l'action de l'ADN ligase d'*E. coli*. La réaction enzymatique s'effectue en présence de 10 nmol de dNTP pendant 1h30 à 16°C. L'enzyme ADN polymérase T4 (10 unités), incubée 45 min à 16°C, crée des extrémités franches sur l'ADNc double brin. Après une extraction phénol/chloroforme, celui-ci est lavé, séché puis dissout dans 10 µl d'eau stérile.

Enfin, l'extrémité franche d'oligonucléotides double brin appelés « adaptateurs » (MarathonTM cDNA Amplification Kit, Clontech) est liguée de chaque côté de l'ADNc double brin. Cette réaction est catalysée pendant une nuit à 16°C par l'enzyme ADN T4 ligase, en présence de 20 pmol d'adaptateurs et de 5 µl d'ADNc obtenu précédemment. La ligase est ensuite inactivée par chauffage à 70°C pendant 5 min.

I. 7. 2. Amplification des extrémités 5' et 3' des ADNc codant pour le cyt b ou pour l'Hsp60 de *T. gondii*

Les extrémités 5' et 3' des ADNc codant pour le cytochrome b (cyt b) et pour la protéine Hsp60 de *T. gondii* sont obtenues par la technique des PCR emboîtées (« Nested-PCR »). Les premières PCR utilisent la banque d'ADNc préparée ci-dessus comme matrice, et les matrices des PCR emboîtées sont le produit de la PCR précédente, dilué au 1/250^e. L'enzyme Taq polymérase (AdvantageTM KlenTaq polymérase, Clontech) est initialement bloquée par un anticorps (TaqStartTM, Clontech), afin d'éviter la fixation de l'enzyme sur la matrice d'ADN à des températures faibles et d'empêcher ainsi des amplifications non spécifiques. L'enzyme sera disponible et ne débutera la réaction d'amplification que lorsque la température de 98 °C sera atteinte.

Les amorces pour le cyt b sont choisies sur le fragment de 420 pb obtenu par RT-PCR sur l'ADNc de tachyzoïtes de la souche PLK. Une banque soustractive entre des bradyzoïtes et des tachyzoïtes de la souche 76K a permis d'obtenir un clone, présentant une forte homologie avec les Hsp60 (Yahiaoui, *et al.*, 1999). Les amorces pour l'Hsp60 sont choisies sur l'insert de ce clone 57 entièrement séquencé. Les amorces sont regroupées dans le tableau 5.

L'extrémité 5' de l'ADNc codant pour le *cyt b* est obtenue par une PCR de 35 cycles utilisant les amorces AP1 (Marathon™ cDNA Amplification Kit, Clontech) et CYT4 (T° d'hybridation : 55°C), suivie d'une PCR de 20 cycles utilisant les amorces plus internes AP2 (Marathon™ cDNA Amplification Kit, Clontech) et CYT5 (T° d'hybridation : 45°C).

L'extrémité 3' de l'ADNc codant pour le *cyt b* est obtenue en utilisant dans les mêmes conditions les amorces AP1-CYT3 (T° d'hybridation : 55°C), puis les amorces AP2-CYT2 (T° d'hybridation : 45°C).

Les extrémités 5' des ADNc codant pour l'Hsp60 sont obtenues par une PCR de 35 cycles utilisant les amorces AP1 et HSP1 (T° d'hybridation : 50°C), suivie d'une PCR de 20 cycles utilisant les amorces AP2 et HSP3 (T° d'hybridation : 55°C).

L'extrémité 3' de l'ADNc codant pour l'Hsp60 est obtenue par une PCR de 35 cycles suivie de deux PCR emboîtées de 20 cycles chacune. Les amorces utilisées sont respectivement: AP1-HSP5 (T° d'hybridation : 55°C), AP2-HSP6 (T° d'hybridation : 57°C), et AP2-HSP2 (T° d'hybridation : 54°C).

I. 8. Obtention des ADNc complets

Les produits de RACE ainsi obtenus et correspondant aux extrémités 5' et 3' des ADNc codant pour le *cyt b* et pour l'Hsp60 de *T. gondii* sont purifiés sur gel d'agarose et clonés dans le vecteur pCR®2.1 (Original TA Cloning® Kit, Invitrogen). Les clones positifs sont amplifiés, et les plasmides sont isolés. Le séquençage automatique utilisant les amorces du kit (AutoRead™ Sequencing kit, Pharmacia Biotech) permet d'obtenir une partie des séquences des inserts. Des amorces internes, spécifiques des séquences sont alors choisies et permettent le séquençage progressif de la totalité des inserts. La jonction entre les extrémités 5' et 3' est réalisée à l'aide des régions chevauchantes (81 pb, entre les amorces CYT5 et CYT2 pour le *cyt b*; 149 pb entre les amorces HSP3 et HSP2 pour l'Hsp60) et du logiciel PC/GENE® Release 18.0.

Les ADNc ainsi séquencés et reconstitués par informatique, permettent de choisir des amorces extrêmes correspondant aux codons de départ et d'arrêt de la traduction pour le

ARNm	Amorces	T° d'hybridation (°C)	Taille amplifiée (pb)
ARNCyt	CYT6-CYT7	49	1107
ARNHsp1	HSP7-HSP9	51	1784
ARNHsp2	HSP8-HSP9	51	1698

Tableau 7: Taille et nom des ARNm entiers, amplifiés par RT-PCR, et correspondant aux gènes codants pour le cyt b et l'Hsp60. Les températures d'hybridation sont précisées pour chaque couple d'amorce utilisé.

Nom amorce	Séquence	Sens	Position	N° séquence
Amorces pour la synthèse de la sonde Cyt b par PCR				
CYT3	5'-GGCTACTTGGAGGTTACTACTG-3'	S	566-586	AF015627
CYT4	5'-GTTCCATCAAACCAAAAGCCGC-3'	AS	823-802	//
Amorces pour la synthèse des sondes Hsp60 par PCR				
HSP1	5'-ACCGTCGCGGCCACCTTCTC-3'	AS	641-621	AF065609
HSP5	5'-CTGGGAGCCCAGTTGGTGAAG-3'	S	327-347	//
HSP9	5'-CTAGTACATGCCTCCCATGCC-3'	AS	1764-1784	//

Tableau 8: Nom, séquence, et position des amorces utilisées pour la synthèse de sondes marquées à la digoxygénine par PCR.

S: Sens; AS: Antisens

Sondes	Amorces	T° d'hybridation (°C)	Taille amplifiée (pb)
SHSPcom1	HSP5-HSP1	57	315
SHSPcom2	HSP5-HSP9	51	1 458
SCYTb	CYT3-CYT4	50	258

Tableau 9: Taille et nom des sondes marquées par PCR à la digoxygénine. Les températures d'hybridation sont précisées pour chaque couple d'amorce utilisé.

cytochrome b (amorces CYT6 et CYT7). Des amorces correspondant aux deux extrémités 5' des ARNm (amorces HSP7, HSP8) et au codon d'arrêt de la traduction pour l'Hsp60 (amorce HSP9) ont été choisies. Ces amorces sont regroupées dans le tableau 5.

Chaque couple d'amorce (CYT6-CYT7; HSP7-HSP9 et HSP8-HSP9) permet l'amplification par RT-PCR, sur l'ADNc de la souche PLK, des ARNm entiers correspondants aux deux protéines étudiées. Les produits des RT-PCR, précisés dans le tableau 7, sont à nouveau purifiés sur gel d'agarose et clonés dans le vecteur pCR[®]2.1. Pour chacun des trois ADNc obtenus, trois clones positifs sont amplifiés, et l'insert est totalement séquencé sur les deux brins. L'analyse informatique des trois séquences obtenues dans les deux sens permet d'enlever les ambiguïtés de séquences et de proposer une séquence nucléotidique définitive pour les trois ADNc, un ADNc codant pour le cyt b et deux pour l'Hsp60.

I. 9. Préparation des sondes marquées à la digoxygénine

Le marquage est effectué par PCR avec différentes amorces décrites dans le tableau 8 et selon le protocole proposé par Boehringer Mannheim. La réaction s'effectue dans un volume de 100 µl et comprend le dUTP marqué à la digoxygénine (PCR DIG labeling mix, Boehringer Mannheim). Après purification sur gel d'agarose, l'efficacité de marquage de la sonde est évaluée par comparaison d'intensité avec une gamme étalon réalisée à partir d'un ADN contrôle (Boehringer Mannheim).

I. 10. « Southern blot »

Environ 5 µg d'ADN génomique sont digérés par les endonucléases de restriction suivantes : *Ava* II (Boehringer Mannheim), *Bam* HI (Biolabs), *Eco* RI (Biolabs), *Xho* I (Boehringer Mannheim), *Bam* HI-*Ava* II et *Ava* II-*Xho* I, à raison de 10 unités d'enzymes par microgramme d'ADN, pendant 4h à 37°C.

L'ADN génomique digéré est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1%, en TAE, pendant environ 5h à 80 V. Afin de faciliter le transfert des grands fragments d'ADN, le gel est incubé pendant 30 min dans du HCl 0,25 M (étape de dépurination de l'ADN), puis

deux fois 15 min dans une solution NaOH 0,5 M-NaCl 1,5 M (étape de dénaturation). Les fragments d'ADN sont alors transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond N⁺, Boehringer Mannheim), pendant la nuit, en tampon NaOH 0,5 M-NaCl 1,5 M. La membrane est finalement rincée par du SCC 2x (SSC 1x: NaCl 150 mM; citrate de sodium 15 mM; pH 7,4) et l'ADN est fixé par cuisson à 120°C pendant 30 min.

La membrane de nylon est pré-hybridée à 42°C, au moins 1h, dans un tampon SSC 5x, contenant 2% (P/V) d'agent bloquant (Boehringer Mannheim), 0,1% de N-lauryl sarcosine, 0,02% de SDS et 50% de formamide (V/V). La sonde marquée et dénaturée à 95°C pendant 10 min, est ajoutée à raison de 5 à 25 ng/ml de solution d'hybridation. Après une incubation d'une nuit à 42°C, 2 lavages de 5 min sont effectués à température ambiante dans une solution SSC 2x-SDS 0,1%. Deux autres lavages, à 68°C, sont réalisés dans une solution SSC 0,1x-SDS 0,1%.

La détection est basée sur la reconnaissance de la digoxigénine par un anticorps couplé à la phosphatase alcaline, qui est capable de déphosphoryler un substrat chimioluminescent (CDP-Star, Boehringer Mannheim). La membrane de nylon est saturée 30 min dans une solution d'acide maléique (0,1 M-pH 7,5) contenant 0,15 M de NaCl, et 10% (P/V) d'agent bloquant. L'anticorps anti-digoxigénine dilué au 1/20 000^e dans le même tampon, est ajouté pendant 30 min sur la membrane. Après 3 lavages de 10 min dans l'acide maléique (0,1M-pH 7,5)-NaCl 0,15 M- Tween 20 à 0,3% (V/V), la membrane est équilibrée 2 min et 5 min, dans une solution de Tris-HCl 0,1 M-pH 9,5; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 50 mM. Le substrat, dilué au 1/100^e dans la même solution, est mis au contact de la membrane pendant 5 min, et celle-ci est exposée environ 15 min sur un film X-Omat (Kodak).

Le Southern blot du gène codant pour l'Hsp60 est réalisé avec la sonde SHSPcom1, comprenant 315 pb communes aux deux ADNc amplifiés (tableau 9).

I. 11. « Northern blot »

Dix microgrammes d'ARN totaux purifiés sont repris dans un tampon de dénaturation comprenant 50% de formamide désionisé, 6% de formaldéhyde 12,3 M désionisé et du MOPS 1x [MOPS 10x: acide 3-(N-Morpholino) Propanesulfonique 0,2 M-pH 7; acétate de sodium 80 mM, EDTA 10 mM-pH8]. Les échantillons sont incubés 15 min à 55°C et 5 µl de tampon

de dépôt sont ajoutés (15% Ficoll (type 400; Pharmacia); 0,25% bleu de bromophénol; 0,25% cyanol de xylène).

Les ARN sont déposés dans un gel dénaturant à 1% d'agarose contenant 6% de formaldéhyde désionisé et du MOPS 1x. Parallèlement aux échantillons, un marqueur de poids moléculaire marqué à la digoxygénine (0,3-7,4 kb, Boehringer Mannheim) est déposé sur le gel. La migration s'effectue dans du MOPS 1x, à 60V, pendant environ 4h. Le gel est alors rincé dans de l'eau DEPC et dans du tampon SSC 20x. Les ARN sont alors transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond N⁺, Boehringer Mannheim), pendant une nuit, à température ambiante, en présence de SSC 20x. La membrane est finalement rincée dans du SSC 2x et séchée à 120°C pendant 30 min.

Les étapes de pré-hybridation, d'hybridation et de révélation sont similaires à celles décrites pour le Southern blot. Les sondes utilisées sont marquées à la digoxygénine par PCR et sont décrites dans le tableau 9.

L'ARNm du gène codant pour le cyt b est révélé par la sonde SCYTb. Les ARNm du gène codant pour l'Hsp60 sont révélés par la sonde SHSPcom2, commune aux deux séquences d'ADNc (tableau 9).

I. 12. Analyse des ARNm par RT-PCR

I. 12. 1. RT-PCR

La présence de chacun des ARNm dans les formes tachyzoïtes et bradyzoïtes ne peut être déterminée par Northern blot en raison de la faible quantité de bradyzoïtes disponibles dans le cerveau des animaux de laboratoire. En revanche, la méthode de transcription inverse des ARNm en ADNc, suivie de l'amplification par PCR (RT-PCR) est adéquate pour étudier l'expression des gènes dans les stades tachyzoïte et bradyzoïte de *T. gondii*.

Les ARN totaux sont extraits de $2 \cdot 10^6$ tachyzoïtes et de $2 \cdot 10^6$ bradyzoïtes de la souche 76K. Les parasites purifiés et rincés en PBS, sont repris par un tampon de lyse (SDS 1%; acétate de sodium 50 mM-pH 5,2; EDTA 10 mM). Un volume équivalent de phénol équilibré par 50 mM d'acétate de sodium-pH 5,2 est ajouté et les tubes sont incubés 15 min à 65°C. La phase aqueuse supérieure obtenue par une centrifugation de 5 min à 13 000 g est récupérée et

le phénol est ré-extrait par un demi-volume de tampon de lyse. Les deux phases aqueuses sont mélangées, et subissent une nouvelle extraction au phénol, suivie de deux extractions au chloroforme. Les ARN totaux sont précipités sur la nuit, à -20°C , en présence de 0,3 M d'acétate de sodium-pH 5,2 et de 3 volumes d'éthanol absolu.

Une seconde étape consiste en l'élimination de l'ADN contaminant par digestion enzymatique. Après précipitation, les ARN totaux sont lavés, séchés, repris dans de l'eau distillée et sont digérés par l'enzyme DNase I (10 u/10 μg , Boehringer Mannheim), pendant 30 min à 37°C , en présence d'un inhibiteur de RNase (RNAsine, 1 u/ μg , Promega). Puis, deux extractions phénol/ chloroforme (V/V) suivie d'une extraction au chloroforme sont réalisées et les échantillons sont précipités sur la nuit, à -20°C , en présence de 0,3 M d'acétate de sodium-pH 5,2 et de 3 volumes d'éthanol absolu. Les ARN totaux sont à nouveau lavés, séchés et repris dans de l'eau distillée et la présence d'ADN contaminant est vérifiée par amplification par PCR. Des PCR de 35 cycles utilisant les couples d'amorces SAG1S-SAG1AS; SAG4S-SAG4AS et CYT6-CYT7 sont réalisées et attestent de l'absence d'ADN contaminant. Les couples d'amorces SAG1S-SAG1AS et SAG4S-SAG4AS permettent l'amplification des protéines de surface SAG1 (P30, (Burg, *et al.*, 1988)) et SAG4 (P18, (Ödberg- Ferragut, *et al.*, 1996)), spécifiques respectivement des tachyzoïtes et des bradyzoïtes. Les amorces CYT6-CYT7 amplifient le cadre ouvert de lecture du *cyt b*.

La synthèse d'ADNc simple brin peut alors être réalisée, à 42°C pendant 1h, par l'hybridation d'oligonucléotide poly(dT)₁₈ sur 1 μg d'ARNm, en présence de la transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine (100 unités, « Moloney murine leukemia virus », MMLV, Stratagène) et de 10 nmol de dNTP.

L'ADNc simple brin, dilué 10 fois dans de l'eau distillée, et correspondant à environ 10^4 parasites est utilisé pour chaque amplification. Les RT-PCR utilisent les conditions décrites pour la PCR et sont réalisées avec les couples d'amorces CYT6-CYT7 pour le *cyt b*; SAG1S-SAG1AS pour la protéine de tachyzoïte P30, SAG4S-SAG4AS pour la protéine de bradyzoïte P18. Les amorces HSP7-HSP9 et HSP8-HSP9 sont utilisées pour l'amplification des deux ADNc de l'Hsp60 et les amorces ACTS-ACTAS amplifient l'ADNc codant pour l'actine (Dobrowolski and Sibley, 1996) et servent de contrôle (tableau 5).

De la même façon, les ARNm des cellules HFF et de cerveaux de souris non infestées sont purifiés. L'ADNc synthétisé à partir de ces dernières cellules sert de matrice pour les contrôles des RT-PCR.

I. 12. 2. RT-PCR semi-quantitative

La RT-PCR semi-quantitative est utilisée pour analyser quantitativement la présence des deux transcrits homologues à l'Hsp60, dans les formes bradyzoïtes et tachyzoïtes de *T. gondii*. Elle est réalisée avec les amorces HSP7-HSP9 et HSP8-HSP9.

Les ARN totaux issus de tachyzoïtes et de bradyzoïtes purifiés (souche 76K) sont extraits à 65°C selon la méthode précédente. La digestion à la DNase I est également vérifiée par PCR avant synthèse de l'ADNc simple brin. Celle-ci est réalisée par l'enzyme transcriptase inverse AMV (Boehringer Mannheim). Les PCR sont ensuite effectuées dans un volume réactionnel de 100 µl et subissent 40 cycles d'amplification. La matrice d'ADNc simple brin est calibrée par l'amplification de l'ARNm codant pour l' α -tubuline (Nagel and Boothroyd, 1988), et subit deux dilutions successives au 1/10^e. Les amorces TUBS et TUBAS permettant l'amplification de l' α -tubuline sont précisées dans le tableau 5.

I. 13. Clonage du gène codant pour l'Hsp60 par criblage d'une banque génomique

La banque d'ADN génomique (ADNg) a été construite à partir de la souche PLK de *T. gondii* et se trouve disponible au « National Institute of Health » (NIH, USA). Elle comprend des fragments de taille d'environ 15 kb, obtenus par digestion partielle de l'ADNg par l'enzyme de restriction *Sau* 3A et clonés au site *Bam* HI du phage Lamda DASH[®] II (Stratagène).

I. 13. 1. Titration de la banque

Des bactéries XL1-Blue MRAP2 sont amplifiées dans un milieu LB contenant 0,2% de maltose et 10 mM de MgSO₄, jusqu'à DO_{600nm} = 0,7. Elles sont alors centrifugées 10 min à 3 000 g et reprises par 10 mM de MgSO₄ afin d'obtenir une unité de DO par ml. Parallèlement, les phages sont dilués de 10 en 10 dans un tampon SM (NaCl 100 mM; MgSO₄-7H₂O 8 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; gélatine 0,01%).

Puis, 100 µl de bactéries sont incubées avec 100 µl de chacune des dilutions de phages, pendant 15 min à 37°C, sans agitation, afin de permettre l'entrée de l'ADN phagique dans les bactéries. L'ensemble est mélangé avec du Top agarose (milieu NZY, NZamine 10 g/l; NaCl 5 g/l; extraits de levure 5 g/l; MgSO₄-7H₂O 8 mM; pH 7, contenant 7 g/l d'agarose) préchauffé à 45°C, et étalé sur des boîtes NZY agar (milieu NZY additionné de 15 g/l de Bactoagar) préchauffées à 37°C. Les boîtes sont alors incubées sur la nuit à 37°C.

Le milieu Top agarose permet la diffusion des phages et la formation de plages de lyse sur le tapis bactérien. L'agarose est préféré à l'agar pour la digestion future de l'ADN phagique par les endonucléases de restriction.

Le lendemain, on observe environ 400 plages de lyse correctement dissociées pour les phages dilués à 10⁻⁷. Les phages dilués à 2.10⁻⁷ sont étalés sur 30 boîtes, contenant chacune 800 plages de lyse, dont chaque phage, contient en moyenne 10 kb à 15 kb; ce qui permettra l'analyse de 2,4.10⁸ pb à 3,6.10⁸ pb, soit l'équivalent de 3 à 4,5 fois le génome de *T. gondii* (environ 8.10⁷ pb/génome).

I. 13. 2. Criblage de la banque génomique

Les phages dilués à 2.10⁻⁷ sont mélangés aux bactéries XL1-Blue MRAP2 et étalés sur 30 boîtes NZYagar comme précédemment. Après une nuit à 37°C, le milieu Top-agarose est durci par une incubation des boîtes pendant 2h à 4°C. Les phages sont alors transférés sur une membrane de nylon (Hybond N⁺, Amersham) et leur ADN est successivement dénaturé, neutralisé et rincé, par dépôt successif des membranes, sur du papier Whatman imbibé des tampons suivant : NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M (5 min)/ NaCl 1,5 M; Tris-HCl 0,2 M pH 8 (2 min)/ Tris-HCl 0,2 M pH 7,5; SSC 2x (2 min). Les membranes sont finalement séchées sur du papier Whatman sec et l'ADN est fixé par cuisson de 30 min à 120°C.

Chaque membrane est alors hybridée avec la sonde SHSPcom2, marquée par PCR à la digoxygénine (tableau 9). Les étapes de pré-hybridation, hybridation, lavages et révélation sont identiques à celles décrites pour le Southern blot.

I. 13. 3. Amplification des clones positifs et extraction d'ADN de phages

Les plages de lyse positives sont récupérées et les phages sont conservés à 4°C dans du tampon SM-chloroforme 5% (V/V). Chaque plage de lyse est à nouveau titrée et subit un second criblage dans des conditions strictement identiques. Deux plages de lyse pour chacun des 4 clones positifs sont prélevées et conservées à 4°C. Une plage de lyse, pour deux clones différents, est à nouveau titrée et sera utilisée pour l'extraction de l'ADN phagique.

Pour ces deux clones, environ $2 \cdot 10^6$ phages sont incubés 15 min à 37°C, sans agitation, en présence de 5 unités de DO de bactéries XL1-Blue MRA. L'ensemble est ajouté à 500 ml de milieu NZY préchauffé et est laissé en incubation, avec agitation, à 37°C jusqu'à lyse des bactéries. L'ajout de chloroforme termine la lyse. L'ensemble est centrifugé pendant 15 min à 10 000 g et l'ADN est extrait du surnageant selon le protocole décrit par Maniatis *et al.* (Maniatis, *et al.*, 1990).

I. 13. 4. Sous-clonage et séquençage

Après les extractions au phénol et au chloroforme suivies d'une précipitation en présence d'acétate de sodium 0,3 M et de 2,5 volumes d'éthanol absolu, l'ADN de phage est repris dans de l'eau distillée et environ 10 µg sont digérés par des endonucléases de restriction. Les produits de digestion sont alors séparés sur gel d'agarose, transférés sur membrane Hybond N⁺ (Boehringer Mannheim) et hybridés par Southern blot, avec la sonde utilisée pour le criblage de la banque génomique. Le choix se porte sur la digestion par l'enzyme *Eco* RV, dont un seul fragment d'environ 5 à 6 kb est reconnu par la sonde marquée à la digoxygénine. Les deux clones sélectionnés présentent un profil de restriction identique. Pour l'un d'eux, 10 µg d'ADN phagique purifié sont digérés par l'enzyme *Eco* RV et la totalité des produits de digestion sont directement purifiés, sans séparation électrophorétique, par des billes de silice (Glassmilk, GeneClean II kit, Bio 101 Inc.).

Environ 5 µg du plasmide Bluescript SK⁺ (Stratagène) sont digérés par l'enzyme *Eco* RV (10 u/µg, Boehringer Mannheim), pendant 2h à 37°C. Le plasmide linéarisé est alors déphosphorylé par 10 unités de phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim), à 37°C pendant 1h. Cette enzyme est ensuite inactivée par chauffage de 10 min à 70°C. Le plasmide est alors

Nom amorce	Séquence	Sens	Position
PSS1	5'-GGGGATGCATATGCTTGCAGGATGCAACCGCCTGGCA-3'	S	168-194
PSS2	5'-GGGGATGCATATGCTTGCCCGCGCTTCAGCGAGAGTT-3'	S	57-83
PSAS1	5'-GGGGATGCATAATTACCACGTTGCGTCCCTTCGG-3'	AS	242-219
PSAS2	5'-GGGGATGCATGCTGCTGGCATGGCGAACCTGAAA-3'	AS	131-108
PSAS3	5'-GGGGATGCATCTGGTTTCTGGCGTCACAGCCGAACCG-3'	AS	167-141
PSAS4	5'-GGGGATGCATGCCGAGAGTGACTCCGACTGC-3'	AS	218-195

Tableau 10: Nom, séquence, et position des amorces choisies sur la séquence Hsp60 (n°AF065609) pour l'amplification par PCR des peptides signaux utilisés dans la construction plasmidique de ciblage de l'enzyme CAT. Les sites de restriction reconnus par l'endonucléase de restriction *Nsi* I sont précisés en gras.

S: Sens; AS: Antisens

Peptide Signal	Amorces	T° d'hybridation (°C)	Taille amplifiée (pb)
PS1	PSS1-PSAS1	66	95
PS2	PSS2-PSAS2	66	95
PS3	PSS2-PSAS3	68	131
PS4	PSS2-PSAS4	55	182
PS5	PSS2-PSAS1	66	206

Tableau 11: Taille et nom des peptides signaux obtenus par PCR pour la construction plasmidique de ciblage de l'enzyme CAT. Les températures d'hybridation sont précisées pour chaque couple d'amorce utilisé.

purifié par deux extractions au phénol/ chloroforme (V/V) suivies d'une extraction au chloroforme, puis précipité à -20°C.

Les quantités d'inserts d'ADN phagiques et du plasmide linéarisé et déphosphorylé sont estimées sur gel d'agarose. La ligation des extrémités franches des inserts et du plasmide est réalisée, sur la nuit, à 14°C, par l'enzyme T4 ADN ligase. Le produit de ligation est ensuite dialysé et électroporé dans les bactéries XL1-Blue compétentes. Les plasmides des colonies blanches sont alors analysés par digestion par des endonucléases de restriction. Un clone positif est finalement amplifié, et la totalité de l'ADNg de *T. gondii* inséré est progressivement séquencé par des amorces internes spécifiques du gène codant pour l'Hsp60.

I. 14. Constructions plasmidiques

I. 14. 1. Constructions plasmidiques pour le ciblage de l'enzyme CAT

Les **peptides signaux PS1 à PS5** correspondants respectivement aux acides aminés 38-62; 1-25; 1-37; 1-54 et 1-62 de la protéine Hsp60 (figure 24) sont amplifiés par PCR en utilisant les amorces décrites dans le tableau 10, et l'ADNc1 cloné dans le vecteur pCR[®]2.1, comme matrice. Chaque amorce comprend le site de restriction pour l'endonucléase *Nsi* I. Les produits d'amplification respectivement de 95 pb (PS1 et PS2), 131 pb (PS3), 182 pb (PS4) et 206 pb (PS5) (tableau 11) sont purifiés du gel d'agarose LMP 2% par extraction phénolique à 65°C. Ils sont ensuite digérés 2h à 37°C par 50 unités d'enzyme *Nsi* I (Biolabs), à nouveau purifiés par extractions phénol/chloroforme- chloroforme et précipités sur la nuit à -20°C.

Le **plasmide pT/70** (Soldati and Boothroyd, 1995) est un vecteur d'expression comprenant le cadre de lecture du gène codant pour la protéine rapporteur CAT (600 pb), sous le promoteur de l' α -tubuline de *T. gondii* (70 pb en aval du codon d'initiation de la traduction de la protéine α -tubuline), et encadré en 3' par 300 pb de la séquence 3' non traduite de la protéine SAG1, dont le site de polyadénylation. Environ 5 μ g de ce plasmide sont linéarisés, entre le promoteur α -tubuline et le gène CAT, par 50 unités d'enzyme *Nsi* I, pendant 2h à

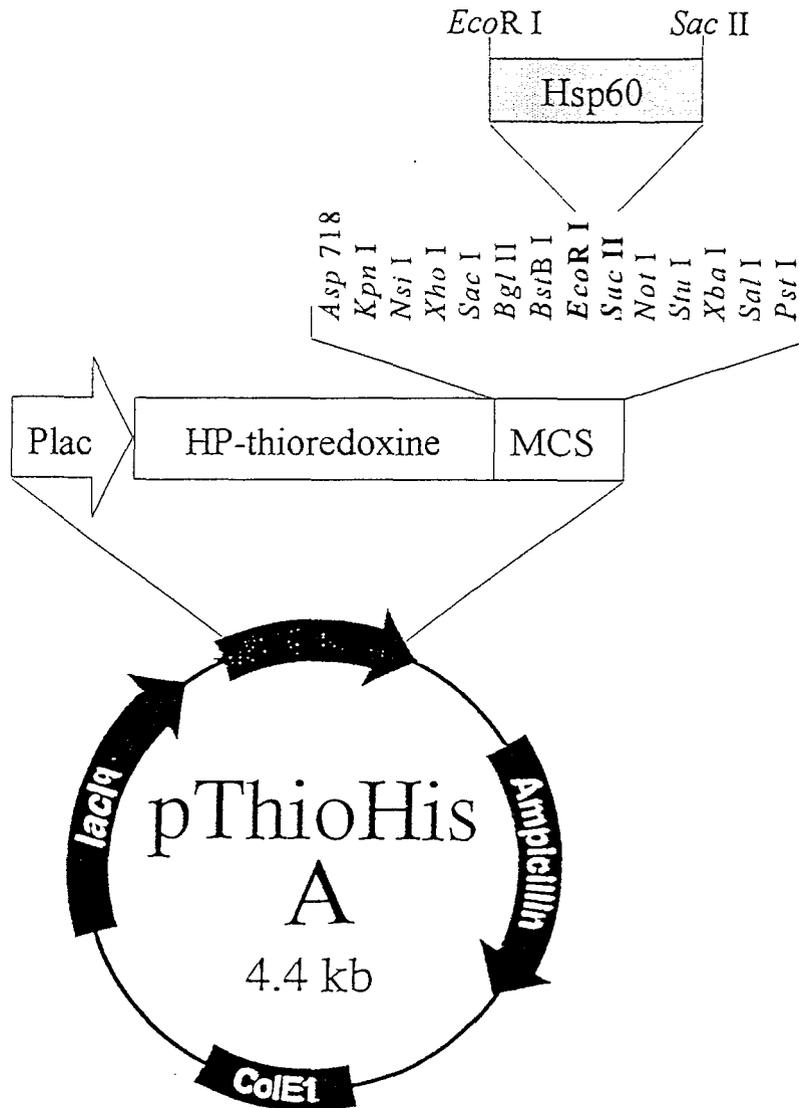


Figure 36: Construction plasmidique pour l'expression de la protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60. Les 856pb de l'extrémité C-terminale de la protéine Hsp60 de *T. gondii* sont clonées dans le vecteur A pThioHis (His-Patch Thiofusion™) aux sites *EcoR* I-*Sac* II. En présence d'IPTG, le peptide recombinant Hsp60 sera synthétisé en fusion avec la protéine thioredoxine.

ColE1, origine de répliation plasmidique chez *E. coli*

Ampicilline, gène codant pour la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline

Plac, promoteur du gène lac de la β -galactosidase, inductible par l'IPTG et permettant la transcription de la protéine recombinante

lacI^q, répresseur du gène lac, inhibant la transcription en absence d'IPTG

HP-thioredoxine, ORF codant pour l'HP-thioredoxine bactérienne de 12,8 kDa

MCS, site de clonage multiple

Hsp60, fragment de l'ADNc1 codant pour les 285 acides aminés C-terminaux de la protéine Hsp60 de *T. gondii*

37°C. Le plasmide linéarisé est alors déphosphorylé, purifié par extractions phénol/chloroforme et chloroforme et précipité sur la nuit à -20°C.

La ligation entre chaque peptide signal et le plasmide pT/70 est alors réalisée sur la nuit à 14°C, par l'enzyme T4 ADN ligase (Boehringer Mannheim). Les produits de ligation sont dialysés et électroporés dans des bactéries XL1-Blue compétentes. Les plasmides présents dans les colonies résistantes à l'ampicilline sont ensuite extraits et digérés par l'enzyme *Nsi* I. Les profils de digestion, analysés en gel d'agarose 2% permet de vérifier les plasmides ayant intégré les différents peptides signaux. Trois clones, pour chaque construction sont amplifiés et leur plasmide séquencé. L'amorce interne anti-sens, correspondant à l'extrémité 5' du gène CAT (amorce CATAS, tableau 6) permet de remonter sur les jonctions CAT-PS et PS- α -tubuline et de vérifier précisément le clonage. Les plasmides ayant correctement intégré un peptide signal entre le promoteur α -tubuline et le gène CAT sont amplifiés, puis électroporés dans les toxoplasmes, afin d'étudier la localisation de la protéine CAT.

I. 14. 2. Construction plasmidique pour l'expression de la protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60

Environ 5 μ g du vecteur pCR[®]2.1 contenant l'ADNc1 codant pour la protéine Hsp60 (amplifié par RT-PCR avec les amorces HSP7-HSP9) sont digérés par les endonucléases de restriction *Eco* RI et *Sac* II (Boehringer Mannheim). Les produits de digestion sont analysés en gel d'agarose 1% et le fragment de 856 pb, correspondant aux 285 acides aminés C-terminaux de la protéine Hsp60, est purifié par « Geneclean » (GeneClean II kit, Bio 101 Inc.).

Le vecteur His-Patch ThioFusion[™] Expression système (Invitrogen) permet l'expression dans *E. coli* d'une protéine exogène, fusionnée avec la protéine thioredoxine de 11,7 kDa. Celle-ci, modifiée génétiquement par mutagenèse, contient 3 résidus histidines, capable de former dans l'espace un site de fixation pour les métaux, et permet donc la purification de la protéine fusionnée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. Le vecteur contient le promoteur *trp-lac* et l'expression de la protéine recombinante est inducible par l'IPTG. Le vecteur A permettra le clonage en phase de notre peptide recombinant, fusionné avec la thioredoxine (figure 36).

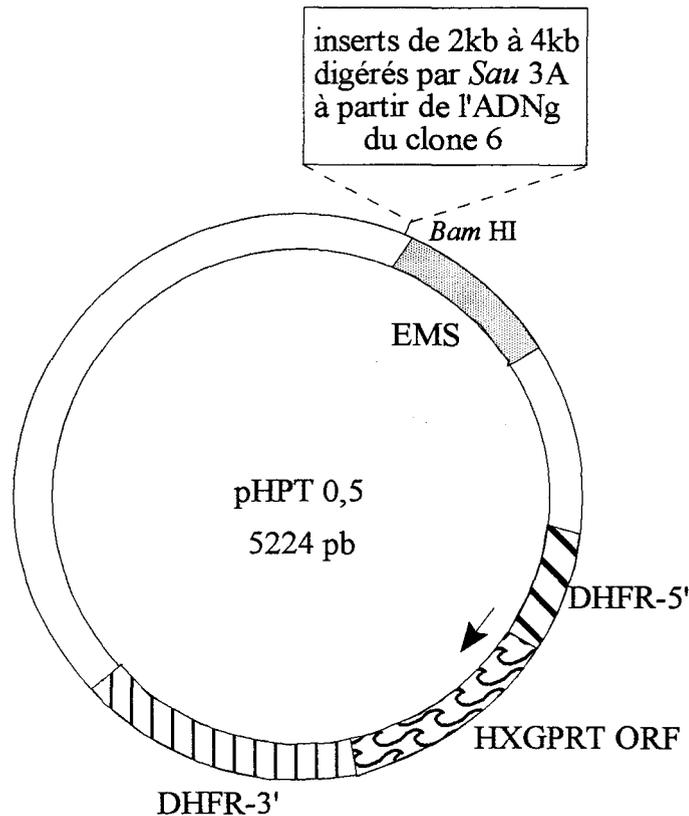


Figure 37: Construction plasmidique pour la complémentation de la souche RH HXGPRT. L'ADNg du clone 6 résistant à la 4-pyridone et à l'atovaquone est digéré partiellement par l'endonucléase de restriction *Sau* 3A. Les inserts de 2kb à 4kb sont clonés dans le vecteur pHPT 0,5 au site *Bam* HI.

EMS, "Episomal Maintenance Sequence", permet le maintien sous forme épisomale du plasmide pHPT 0,5 dans *T. gondii*

DHFR5' et DHFR3', extrémités 5' et 3' non codantes du gène DHFR de *T. gondii*, permet la transcription du gène HXGPRT et la stabilisation de son ARNm

HXGPRT ORF, cadre ouvert de lecture du gène HXGPRT de *T. gondii*

Le vecteur pHPT 0,5 dérive du vecteur pUC19 (Black M. *et al.*, 1998). Il peut se répliquer dans *E. coli* et possède le gène conférant la résistance à l'ampicilline.

Environ 5 µg du vecteur A His-Patch ThioFusion™ sont digérés par les enzymes de restriction *Eco* RI et *Sac* II, déphosphorylés et précipités. La ligation entre le vecteur et l'insert, est réalisée sur la nuit, à 14°C, par l'enzyme T4 ADN ligase (Boehringer Mannheim) et la construction dialysée est électroporée dans les bactéries Top10 compétentes pour la production de la protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60.

I. 14. 3. Construction plasmidique pour la complémentation de la souche RH de *T. gondii* sensible à la 4-pyridone

L'ADN est extrait de tachyzoïtes purifiés du clone 6, obtenu par mutagenèse chimique et résistant à la 4-pyridone et à l'atovaquone (souche RH), puis dialysé sur la nuit, à 4°C contre du tampon TE. Une cinétique de digestion réalisée sur 1 µg de cet ADN par l'enzyme de restriction *Sau* 3A (Boehringer Mannheim) et analysée en gel d'agarose permet d'établir les conditions de digestion partielle pour obtenir des fragments d'ADN d'environ 2 à 4 kb. Ainsi, 30 µg d'ADN génomique dialysé sont digérés par l'enzyme *Sau* 3A à raison de 0,025 unités par µg d'ADN à 37°C pendant 15 min. La digestion enzymatique partielle est alors arrêtée par chauffage de 20 min à 65°C. Les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose LMP 1% et les fragments de 2 à 4 kb sont purifiés par extraction phénolique à 65°C et précipités.

Le plasmide pHPT 0,5 (Black and Boothroyd, 1998) contient le cadre ouvert de lecture du gène HXGPRT de *T. gondii* encadré en 3' et en 5', par les régions non codantes du gène DHFR (figure 37). L'hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transférase est une enzyme multifonctionnelle, non essentielle, impliquée dans la synthèse des bases puriques (Krug, *et al.*, 1989). L'existence d'une souche de toxoplasmes déficients en HXGPRT (Donald and Roos, 1994) permet la sélection positive des parasites possédant le gène HXGPRT par l'utilisation de l'acide mycophénolique (MPA) et de la xanthine. La seule voie métabolique permettant la synthèse des purines chez les parasites HXGPRT⁻ est bloquée par l'acide mycophénolique et les parasites possédant le gène de sélection HXGPRT survivent en synthétisant leurs purines à partir de la xanthine (figure 18). Les parasites possédant ce gène peuvent également être sélectionnés négativement par la 6-thioxanthine (Roos, *et al.*, 1994). Ce plasmide contient également la séquence EMS (« Episomal Maintenance Sequence ») de 500 pb permettant la réplication du plasmide sous forme épisomale dans *T. gondii*, sans intégration dans son génome (Black and Boothroyd, 1998).

Environ 5 µg du plasmide pHPT 0,5 sont linéarisés par l'endonucléase de restriction *Bam* HI (Biolabs), déphosphorylés et précipités. La ligation entre le vecteur et les inserts de 2 à 4 kb est effectuée sur la nuit, à 14°C par l'enzyme T4 ADN ligase (Boehringer Mannheim). La construction dialysée est alors électroporée dans les bactéries XL1-Blue compétentes. Les plasmides présents dans les colonies résistantes à l'ampicilline sont purifiés et digérés par l'enzyme *Bam* HI afin de vérifier la représentativité de la banque sous-génomique du clone 6 ainsi formée.

La totalité des ligations dialysées, contenant environ 2,5 équivalents génome du clone 6, sont électroporées dans les bactéries XL1-Blue. L'ensemble est repris par 500 ml de milieu LB et après 1h d'incubation à 37°C, l'ampicilline (50 µg/ml) et la tétracycline (50 µg/ml) sont ajoutées. Les bactéries ($DO_{600nm} = 0,8$) sont ensuite centrifugées à 4 000 g pendant 20 min à 4°C et le culot est lysé par un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl pH 8, 2 mg/ml de lysozyme, 100 mM d'EDTA et 0,1 mg/ml de RNase. Après une incubation de 20 min à température ambiante en présence de ce tampon, 10% de Triton X-100 sont ajoutés. Le surnageant, obtenu par une centrifugation de 30 min à 13 000 g subit deux extractions phénol/chloroforme (V/V) et une extraction au chloroforme. L'ADN est précipité 30 min à température ambiante en présence de 0,3 M d'acétate de sodium pH 7 et de 0,54 volumes d'isopropanol, puis centrifugé 20 min à 13 000 g. Le culot d'ADN est repris dans du tampon TE, auquel 1 g/ml de chlorure de césium et 0,2 mg/ml de BET sont ajoutés. Une ultracentrifugation à 50 000 rpm pendant 42h en rotor vertical Ti 50, permet de séparer une bande diffuse supérieure contenant l'ADN génomique bactérien, de l'ADN plasmidique. Les plasmides purifiés par gradient de chlorure de césium sont récupérés, le BET est retiré par 3 extractions au butanol saturé en eau, et les plasmides sont précipités par un volume d'isopropanol. Après une incubation de 30 min à température ambiante, l'ADN plasmidique est centrifugé à 13 000 g pendant 25 min, lavé à l'éthanol 80° froid, séché et repris par de l'eau distillée. La concentration d'ADN est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm, et les plasmides sont conservés à -20°C jusqu'à électroporation dans la souche de toxoplasme HXGPRT.

I. 15 Comparaison de séquences et analyse phylogénique

L'interrogation de banques de séquences protéiques (Swissprot et Pir) et nucléiques (GenBank et EMBL), réalisée en utilisant le programme BLAST a permis de comparer les pourcentages d'identité et de similarité de nos séquences cytb et Hsp60 de *T. gondii* avec les autres séquences connues.

Pour l'analyse phylogénique, les séquences connues d'Hsp60 et de son homologue bactérien GroEL sont tout d'abord alignées en utilisant le programme CLUSTALW, après le retrait manuel des peptides signaux d'importation trouvées dans les séquences d'eucaryotes. Les matrices de distance calculées sur le nombre de résidus identiques (programme PROTDIST) sont ensuite analysées par la méthode de « neighbor joining » (programme NEIGHBOR du logiciel PHYLIP). Les valeurs de noeuds (« bootstrap ») sont obtenues à partir de 100 répétitions avec l'aide des programmes SEQBOOT et CONSENSE.

II. Techniques de Biologie Cellulaire

II. 1. Culture et purification des parasites

II. 1. 1. Culture des parasites

Les **tachyzoïtes** de la souche virulente RH (Sabin, 1941) et des souches avirulentes 76K (Laugier and Quilici, 1970) et PLK (Kasper and Ware, 1985) sont entretenus *in vitro* sur des cellules de fibroblastes humains (HFF : « Human Foreskin Fibroblasts ») à confluence. Les cellules sont cultivées dans du DMEM (Biowhittaker) contenant 10% de sérum de veau foetal (Dutscher), 4mM de glutamine, 5µg/ml de gentamycine (Sigma) et sont placées à 37°C dans une étuve à 5% de CO₂. Ces cellules, au cytoplasme volumineux forment en 4 ou 5 jours un tapis cellulaire stable pendant 3 semaines.

L'entretien sous forme chronique de **bradyzoïtes** des souches 76K et PLK s'effectue toutes les six semaines chez des souris Swiss par injection intrapéritonéale de bradyzoïtes. Des rats Fisher sont également utilisés pour l'obtention de kystes.

I. 1. 2. Purification des parasites

Les **tachyzoïtes**, fraîchement sortis des cellules sont débarassés des débris cellulaires par filtration sur une colonne de fibres de verre (Grimwood, *et al.*, 1979) et par filtration sur des membranes de polycarbonate 3µm (Nucléopore), puis lavés deux fois dans du milieu de culture.

Les **kystes** sont prélevés des cerveaux d'animaux infestés depuis six à huit semaines et isolés selon la méthode proposée par Cornelissen (Cornelissen, *et al.*, 1981). Le cerveau prélevé de souris est broyé dans un homogénéiseur de potter dans 4 ml de PBS (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-pH7,4; 150 mM NaCl). L'homogénat est centrifugé à 3 000 g pendant 5 min. Le culot est ensuite repris par 7,5 ml de PBS et 2,5 ml de Percoll isotonique (90% de Percoll (Pharmacia), 10% de NaCl 1,5M). La suspension est centrifugée à 3 000 g pendant 15

min et le culot est à nouveau repris par 5 ml de PBS et centrifugé 5 min à 3 000 g. Le culot ainsi obtenu contient des kystes, des hématies et quelques contaminants cellulaires. Les kystes issus de cerveau de rats sont isolés de manière identique mais les volumes des tampons sont augmentés de 2,5 fois.

Afin d'éliminer les hématies contaminantes, les culots sont rapidement repris par 4 ml de tampon de lyse (NH_4Cl 0,15 M dans du Tris-HCl 20 mM-pH 7,4; 9 V/1 V), et lavés deux fois en PBS.

Les **bradyzoïtes** sont libérés par une digestion des kystes à 37°C pendant 15 min dans une solution de pepsine acide (0,5% pepsine-HCl (pH2)-150 mM NaCl). Les bradyzoïtes purifiés sont alors lavés par 10 ml de milieu de culture contenant 10% de sérum de veau foetal.

II. 2. Préparation des inhibiteurs

La 3-bromo-2,6 diméthyl-5-(4(4 trifluorométhoxyphénoxy)phényl)pyrid 4-one (4-pyridone ou drogue 17C90) ainsi que la 2-(trans-4-(4-chlorophényl)cyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphtoquinone (atovaquone ou drogue 566C80), fournies par les laboratoires Wellcome (Angleterre) sont préparées dans du DMSO (Sigma) à 10 mM. Ces drogues sont utilisées pour tester des mutants résistants à la 4-pyridone et à l'atovaquone.

Le chloramphénicol (forme hydrosoluble, Sigma) est préparé dans du DMEM à 100 mM et sert à la sélection de parasites ayant intégré de façon stable, dans leur génome, une construction plasmidique portant le gène de sélection CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase) (Kim, *et al.*, 1993).

L'acide mycophénolique (MPA, Sigma) est préparé à la concentration de 12,5 mg/ml dans du méthanol 100%, et la xanthine (Sigma) est dissoute dans du KOH 0,5 M pour obtenir une concentration de 25 mg/ml. Ces deux drogues sont utilisées pour la sélection positive des parasites complémentés par le plasmide portant le gène HXGPRT (Roos, *et al.*, 1994).

Pour chaque drogue, les dilutions sont ensuite préparées dans le milieu de culture cellulaire et filtrées (0,22 μm , Millipore) juste avant l'utilisation.

II. 3. Incorporation d'uracile tritiée

Le marquage radioactif à l'uracile tritiée permet de mesurer de façon rapide et reproductible la croissance intracellulaire de *T. gondii*. L'uracile est un précurseur spécifique des acides nucléiques parasites car le toxoplasme possède l'uridine phosphorylase, enzyme absente des cellules hôtes (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1977a). Des cellules HFF confluentes, en plaque de 24 puits, sont infestées par 50 000 tachyzoïtes par puits. Après six heures d'invasion, le milieu de culture est remplacé par celui contenant les différentes drogues aux concentrations choisies. Trente six heures après l'invasion, 2 μCi de [5,6- ^3H]-uracil (NEN) sont ajoutés par puits et les plaques sont incubées 4 h dans les conditions normales de culture. Après marquage, le milieu radioactif est éliminé et les cellules sont lysées par 1 ml d'HBSS (« Hank's Balanced Salts Solution ») contenant 1% SDS et 100 $\mu\text{g/ml}$ d'uracile froid (Sigma). 250 μl d'acide trichloroacétique (TCA) 50% froid sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont conservées toute la nuit à 4°C. Les acides nucléiques ainsi précipités sont récupérés sur un filtre de papier Whatman (2,4 cm), lavés 3 fois par du TCA 5% froid et une fois par de l'éthanol (système de filtration Millipore). La radioactivité des filtres séchés est ensuite mesurée en présence de liquide scintillant (OPTI fluor, Baker).

II. 4. Transfection transitoire

La technique de transfection de *T. gondii* par électroporation a été récemment développée par Soldati et Boothroyd (Soldati and Boothroyd, 1993). Des tachyzoïtes de la souche 76K purifiés des cellules HFF sont centrifugés à 3 000 g pendant 10 min. Le milieu de culture est éliminé et les parasites sont lavés dans un grand volume de cytomix (120 mM KCl; 0,15 mM CaCl_2 ; 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -pH 7,6; 25 mM HEPES-pH 7,6; 2 mM EGTA-pH 7,6; 5 mM MgCl_2). Le culot est repris par du cytomix supplémenté en agents anti-oxydants (2 mM ATP, 5 mM glutathion, Sigma) afin d'obtenir $12,5 \cdot 10^6$ parasites par ml.

Les différentes constructions plasmidiques PS-CAT sont utilisées sous forme circulaire. Les plasmides sont préparés par la méthode Qiagen, purifiés par extraction des protéines au phénol/chloroforme, précipités 1 h à -80°C, en présence de 250 mM de NaCl et de 2,5 volumes

d'éthanol absolu, puis centrifugés 30 min à 13 500 g. Le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 80%, séché et remis en suspension dans du cytomix.

10^7 tachyzoïtes préparés ci-dessus sont mélangés à 50 µg de plasmide circulaire dans des cuvettes d'électroporation de 4 mm de largeur (BTX). L'électroporation est réalisée selon les paramètres suivants: 2500V; 25µF; 48Ω; 0,5 ms (Electro Cell Manipulator 600, BTX). Après électroporation, les parasites sont remis immédiatement en culture sur des cellules HFF confluentes. La localisation de la protéine CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase) est analysée par immunofluorescence indirecte et l'activité enzymatique est déterminée par chromatographie sur couche mince.

II. 5. Transfection stable

50 µg de la construction PS4-CAT sont linéarisés par l'enzyme *Asp* 718, précipités, repris dans du cytomix et électroporés dans $2 \cdot 10^7$ tachyzoïtes de la souche 76K. Les parasites sont immédiatement remis en culture sur un tapis de cellules HFF confluentes dans des flacons de 25 cm².

La sélection en présence de 20 µM de chloramphénicol (Kim, *et al.*, 1993) débute 28 h après l'électroporation et se poursuit pendant 4 semaines. Les populations émergentes, ayant intégré de façon stable le plasmide PS4-CAT, sont résistantes au chloramphénicol. Elles sont clonées en présence de chloramphénicol, par la technique de dilution limite, dans des plaques de 96 puits. Les clones sont finalement testés par immunofluorescence indirecte pour la présence de la protéine CAT et un clone positif est amplifié.

II. 6. Analyse par immunofluorescence indirecte

Des cellules HFF sont cultivées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre dans des chambres de culture à 4 puits (Nunclon). Une fois à confluence, chaque puits est infesté par un million de parasites électroporés. Le milieu est changé après 12h d'invasion et l'analyse en immunofluorescence s'effectue après 24h d'invasion.

Les cellules, après un lavage en PBS, sont fixées par une solution de paraformaldéhyde à 4% en PBS, pendant 30 min à température ambiante. Des lavages rapides en PBS sont suivis d'une perméabilisation par du Triton X-100 0,2% en PBS pendant 30 min. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire, pendant 30 min, dans une solution de Triton X-100 0,1% en PBS saturé par 10% de sérum de veau foetal. Puis, les lamelles sont rincées par une solution de Triton X-100 0,1% en PBS et incubées 30 min avec les anticorps secondaires dans la solution Triton X-100 0,1%/PBS/sérum de veau foetal 10%. Après lavages en PBS, les lamelles sont montées en Moviol (Calbiochem) et observées au grossissement x 800 à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Zeiss Axiophot). Les prises de vue sont effectuées sur un film Fuji Provia 1600 ISO.

Les parasites transfectés de façon **transitoire** par les différentes constructions PS-CAT sont analysés avec les anticorps suivant :

- Anticorps primaire : sérum polyclonal de lapin anti-CAT dilué au 1/300^e (5Prime, 3Prime, Inc.)
- Anticorps secondaire : sérum de chèvre couplé à la fluorescéine et dirigé contre les Ig de lapin (1/80^e, Sigma)

Le clone positif, ayant intégré de façon **stable** le plasmide PS4-CAT dans son génome, est analysé pour la **double localisation** des protéines Hsp60 et CAT. Les anticorps primaires utilisés sont :

- sérum polyclonal de souris anti-Hsp60 dilué au 1/10^e
- sérum polyclonal de lapin anti-CAT dilué au 1/300^e (5Prime, 3Prime, Inc.)

Les anticorps conjugués utilisés secondairement sont :

- sérum de chèvre couplé à la fluorescéine et dirigé contre les Ig de souris (1/80^e, Sigma)
- sérum de chèvre couplé au Texas Red et dirigé contre les Ig de lapin (1/100^e, Zymed)

II. 7. Isolement et purification des mitochondries

La purification des mitochondries de *T. gondii* s'inspire de la méthode décrite précédemment pour l'isolement des organites parasitaires (Leriche and Dubremetz, 1991). Elle s'effectue par gradient de saccharose sur des tachyzoïtes ayant intégré de façon stable la

5.10⁸ tachyzoïtes PS4-CAT
 repris dans le tampon TES à la
 concentration de 2.10⁸ parasites
 par ml sont cassés à la French
 Press et centrifugés à 1 200 x g
 pendant 10 min.

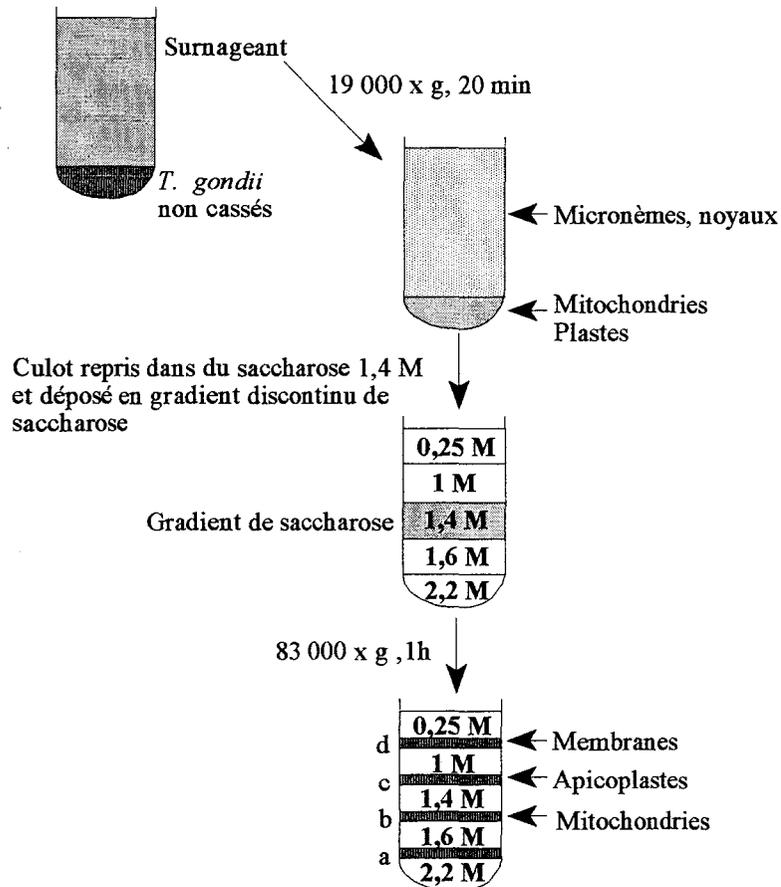


Figure 38: Isolement et purification des mitochondries de tachyzoïtes PS4-CAT par gradient discontinu de saccharose.

construction PS4-CAT. Environ $5 \cdot 10^8$ tachyzoïtes PS4-CAT purifiés sont lavés dans du milieu TES (Triethanolamine 5 mM; EDTA 2 mM; Saccharose 250 mM; pH 7,4), repris dans ce même tampon à la concentration de $2 \cdot 10^8$ parasites/ml et homogénéisés à la French Press à 28 kg/cm². Les parasites sont alors centrifugés à 1 200 g pendant 10 min. Le surnageant est conservé et le culot de parasites non cassés est repris par un demi-volume de TES et cassé à la French Press. Après une nouvelle centrifugation de 1 200 g pendant 10 min, le surnageant est mélangé à celui obtenu précédemment. Le lysat cellulaire est alors centrifugé en SW28 à 19 000 g pendant 20 min à 4°C (ultracentrifugeuse Beckman L8). Le culot est soigneusement repris par du tampon TES et ajusté à une concentration finale de 1,4 M de saccharose. Cette suspension est déposée sur un gradient discontinu de saccharose (figure 38) et ultracentrifugé à 83 000 g pendant une heure en SW28. Le matériel est séparé au niveau des quatre interfaces de densité 2,2 M-1,6 M/ 1,6 M-1,4 M/ 1,4 M-1 M et 1 M-0,25 M, nommées respectivement *a*, *b*, *c*, et *d*, depuis le bas vers le haut du tube (figure 38). Les quatre interfaces sont prélevées, ajustées à une concentration finale de 1 M de saccharose et ultracentrifugées à 100 000 g pendant 1h en SW40. Les culots sont finalement repris par 1 ml de TES et conservés en azote liquide.

II. 8. Microscopie électronique

Les quatre fractions, ajustées à la concentration de 1 M de saccharose sont directement fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% en tampon cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,4) pendant une nuit à 4°C. Elles sont ensuite lavées dans le même tampon, post-fixées pendant 1h par du tetroxyde d'osmium à 1 % en tampon cacodylate de sodium 0,1 M et lavées dans du tampon cacodylate 0,1 M. Les échantillons sont alors déshydratés à température ambiante par une série de bains à concentration croissantes d'alcool (alcool 70°: 2 bains de 5 min; alcool 95°: 2 bains de 15 min; alcool 100°: 3 bains de 20 min), puis dans l'oxyde de propylène (2 bains de 30 min). Les fractions sont incubées dans un mélange d'oxyde propylène et d'EPON (V/V) pendant 1h à 37°C. Trois bains d'EPON (1h, 1 nuit et 1h à 37°C) précèdent l'inclusion finale dans l'EPON dont la polymérisation dure 48h à 60°C.

Les coupes fines effectuées à l'ultramicrotome Ultracut (Reichert) sont récupérées sur des grilles de cuivre recouvertes d'une membrane de Formvar, colorées à l'acétate d'uranyle à

2% (P/V) dans l'alcool 50° (2 min, à l'obscurité), rincées, contrastées au citrate de plomb (réactif de Reynolds; 2 min, à l'abri du CO₂ en présence de KOH), rincées à l'eau distillée et séchées avant l'observation au microscope électronique Hitachi H600.

II. 9. Différenciation *in vitro* des bradyzoïtes en tachyzoïtes

Environ 5 000 bradyzoïtes purifiés de cerveau de rat sont déposés par lamelle de cellules HFF confluentes. Après 3h, 18h et 42h d'infestation, les cellules sont fixées et analysées par immunofluorescence indirecte en utilisant comme anticorps primaire le sérum polyclonal de souris anti-Hsp60 dilué au 1/10^e, et comme conjugué, le sérum de chèvre couplé à la fluorescéine et dirigé contre les Ig de souris (1/80^e, Sigma).

II. 10. Choc thermique

Des flacons de 25 cm² contenant un tapis de cellules HFF confluentes, infestées 24h plus tôt par 2,5.10⁶ tachyzoïtes (souche 76K), sont incubés à 42°C pendant 30 min. Un flacon est alors immédiatement prélevé (temps 0) alors que trois autres sont remis en conditions normales de culture (37°C, 5% CO₂) pendant 1h, 2h ou 4h. A ces différents temps (0, 1h, 2h, 4h), le tapis cellulaire est gratté et les parasites intracellulaires sont libérés par passages successifs à travers une aiguille de 27G. Les parasites libérés sont alors comptés, lavés en PBS et environ 4.10⁶ toxoplasmes sont déposés sur un gel SDS-PAGE pour l'analyse par immunoempreinte.

II. 11. Complémentation

Le clone 6 (souche RH), obtenu par mutagenèse chimique est résistant à la 4-pyridone et à l'atovaquone. Afin de déterminer le gène impliqué dans ces résistances, une banque sous-génomique est construite dans le plasmide pHPT 0,5 capable de se maintenir sous forme épisomale (Black and Boothroyd, 1998).

Environ 50 µg de la banque sous-génomique du clone 6 sont électroporés dans 2.10^7 tachyzoïtes de la souche RH HXGPRT⁻ (Donald and Roos, 1994). Les parasites sont immédiatement remis sur des cellules HFF confluentes, et 24h après l'électroporation, l'acide mycophénolique (25 µg/ml) et la xanthine (50 µg/ml) sont ajoutés. Les parasites sont régulièrement passés, en présence de ces deux drogues pendant 10 jours afin de sélectionner les parasites contenant le plasmide pHPT 0,5. La population émergente est alors incubée en présence d'atovaquone (5.10^{-6} M) ou de 4-pyridone (10^{-5} M) pendant 20 jours afin de sélectionner les tachyzoïtes dont le plasmide pHPT 0,5 contient le gène conférant la résistance à l'atovaquone ou à la 4-pyridone.

III. Techniques biochimiques

III. 1. Détection de l'activité CAT

L'enzyme CAT fonctionnelle peut acétyler son substrat, le chloramphénicol (marqué au ^{14}C), en ses formes mono- et di-acétylées. Les produits d'acétylation sont aisément séparables du substrat d'origine, par chromatographie ascendante sur gel de silice. Les différentes formes de chloramphénicol sont ensuite visualisées par une exposition autoradiographique (Gorman, *et al.*, 1982).

Les tachyzoïtes issus des transfections transitoires sont cultivés jusqu'à la lyse des cellules HFF. Environ 48h après l'électroporation, les parasites extracellulaires sont centrifugés pendant 10 min à 3 000 g et lavés dans du Tris-HCl (250 mM; pH 7,8). Le culot de parasites, repris dans du Tris-HCl (250 mM; pH 7,8), est lysé par trois cycles de congélation/décongélation (azote liquide/ bain-marie à 37°C). Les déchets cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 10 min à 13 000 g, et le surnageant est incubé à 37°C, toute la nuit, en présence de 0,3 μCi de (D-threo-[dichloroacetyl-1- ^{14}C] chloramphénicol (57,8 mCi/mmol, Amersham) et de 1 mM d'acétyl coenzyme A (Sigma). Les produits acétylés du chloramphénicol et le chloramphénicol résiduel sont extraits par de l'acétate d'éthyle, concentrés sous vide, et déposés au bas d'une couche mince de silice. Ils sont ensuite séparés par chromatographie ascendante dans une atmosphère saturée en chloroforme/méthanol (95/5). La plaque de silice est ensuite autoradiographiée contre un film Biomax (Kodak) à -80°C.

III. 2. Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS PAGE)

Les échantillons sont mis en suspension ou dilués dans du tampon de reprise (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 2%; saccharose 10%; bleu de bromophénol 0,2%). En condition réductrice, 0,1 M de dithiothréitol sont ajoutés. Les échantillons sont alors dénaturés par chauffage 5 min à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur minigel de polyacrylamide 13%, en présence de SDS, sous un courant constant de 30 mA (Laemmli,

1970). La calibration des gels est effectuée à l'aide de dépôts parallèles de marqueurs de poids moléculaires (Gibco-BRL).

Après migration dans un tampon d'électrophorèse (Tris-HCl 25 mM; glycine 200 mM; SDS 0,1%), les protéines sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie ou révélées par immunoempreinte.

III. 3. Coloration au Bleu de Coomassie

Après électrophorèse, le gel est incubé, sous agitation, dans une solution de bleu de Coomassie (Merck) à 0,02%, contenant 10% d'acide acétique et 25% d'isopropanol. Le gel est ensuite décoloré par une solution aqueuse d'acide acétique à 10%.

III. 4. Immunoempreinte

Après séparation électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher&Schuell) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (CBS Scientific Co., California), pendant 1h à 1 mA/cm², en présence de Tris-HCl 48 mM; glycine 39 mM; SDS 0,0375%; méthanol 20% (Towbin, *et al.*, 1979). Le transfert est vérifié par coloration de la membrane de nitrocellulose au Rouge Ponceau (0,2% dans une solution à 3% d'acide trichloroacétique) pendant 5 min.

L'immunodétection des protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose s'effectue sous agitation, à température ambiante. La membrane de nitrocellulose est tout d'abord saturée pendant 30 min dans du TNT (Tris-HCl 15 mM pH 8; NaCl 140 mM; 0,05% Tween 20) contenant 5% de lait écrémé (Gloria). Elle est ensuite incubée en présence d'anticorps primaire dilué dans du TNT-lait 5% pendant 1h. Après 3 lavages de 15 min en TNT, la membrane est incubée 1h dans l'anticorps secondaire dilué dans du TNT-lait 5%. Une nouvelle série de 3 lavages en TNT précède la révélation des protéines. Elle s'effectue soit par un bain de 5 min dans une solution de luminol et d'agent oxydant (Kit de révélation par chimioluminescence, Pierce), suivi d'une détection autoradiographique à température ambiante

(film X-OMAT, Kodak), soit par réaction de l'activité phosphatase alcaline en présence de NBT et BCIP (Promega).

Pour la détection de la protéine **Hsp60**, l'anticorps primaire utilisé est le sérum polyclonal anti-Hsp60 (1/1 000^e ou 1/5 000^e) obtenu chez la souris par injection de la protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60 électroéluée. Les anticorps secondaires utilisés sont:

- le sérum de chèvre couplé à la phosphatase alcaline et dirigé contre les Ig de souris (1/7 500^e, Sigma)
- ou le sérum de chèvre couplé à la peroxydase et dirigé contre les Ig de souris (1/10 000^e, Sigma)

Pour la détection de la protéine rapporteur **CAT**, les anticorps utilisés sont :

- Anticorps primaire : sérum polyclonal de lapin anti-CAT dilué au 1/300^e (5Prime, 3Prime, Inc.)
- Anticorps secondaire : sérum de chèvre couplé à la peroxydase et dirigé contre les Ig de lapin (1/10 000^e, Sigma)

Les protéines de surface **P23**, **P30** et **P36** sont détectées respectivement par l'anticorps monoclonal de souris anti-P23 dilué au 1/100^e (Couvreur, *et al.*, 1988), l'anticorps monoclonal de souris anti-P30 dilué au 1/150^e (Couvreur, *et al.*, 1988) et par l'anticorps monoclonal de souris anti-P36 dilué au 1/150^e (Tomavo, *et al.*, 1991). La révélation est effectuée par le sérum de chèvre couplé à la peroxydase et dirigé contre les Ig de souris (1/10 000^e, Sigma).

La **thioredoxine** est mise en évidence par l'anticorps monoclonal de souris anti-thioredoxine (1/3 000^e, Anti-ThioTM, Invitrogen) et le sérum de chèvre couplé à la phosphatase alcaline et dirigé contre les Ig de souris (1/7 500^e, Sigma).

III. 5. Production de la protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60

III. 5. 1. Analyse des clones recombinants

Plusieurs clones de bactéries Top10 électroporées par le vecteur His-Patch ThioFusionTM-Hsp60 et résistantes à l'ampicilline sont testés pour la production de la protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60. Les bactéries sont incubées à 37°C en milieu LB-

ampicilline (100µg/ml) jusqu'à obtenir une densité optique de 0,6 à 600 nm (phase exponentielle de croissance). L'expression de la protéine est induite par 1mM d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), pendant 3h, à 37°C. Des cultures témoins sont laissées à 37°C, sans ajout d'IPTG. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3 500 g, pendant 10 min à 4°C. Le culot de bactéries est alors repris par un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 8, 2,5 mM EDTA et 5mM Imidazole, et une quantité équivalente de bactéries induites et non induites sont analysées en gel SDS-PAGE 13% coloré au Bleu de Coomassie. Un clone positif exprimant la protéine recombinante de 45 kDa est utilisé pour sa production massive.

III. 5. 2. Production massive de la protéine recombinante

Le clone exprimant la protéine recombinante est induit dans les mêmes conditions puis centrifugé à 3 500 g, pendant 10 min à 4°C. Le culot de bactéries est repris dans un tampon phosphate (20 mM)-500 mM NaCl, pH 7,8 et cassé à la French Press. Une centrifugation de 10 min à 4°C à 14 000 g permet de séparer le matériel soluble (surnageant) du matériel insoluble (culot). Une quantité égale de matériel soluble et insoluble sont déposés sur un gel SDS-PAGE 13%. L'expression de la protéine recombinante est observée au Bleu de Coomassie et vérifiée par immunoempreinte.

III. 6. Obtention d'un sérum polyclonal anti-Hsp60

III. 6. 1. Electroélution de la protéine recombinante

Deux milligrammes de la protéine recombinante HP-thioredoxine/Hsp60, contenue dans l'extrait bactérien insoluble, sont déposés dans un grand gel SDS-PAGE préparatif à 13% (1,5 mm d'épaisseur, puits de 10,3 mm de large). Après l'électrophorèse, le gel est coloré par 0,3 M de CuCl₂ et la bande de gel correspondant à la protéine recombinante est prélevée. Cette bande de gel est découpée en petits fragments, et incubée dans une solution d'EDTA 0,25 M-Tris 0,25 M, jusqu'à décoloration complète (minimum 4 bains de 15 min sous agitation). Les fragments de gel sont alors insérés dans des cupules fermées par des membranes de dialyse. Les cupules sont introduites dans un appareil d'électroélution (ISCO, Inc.) qui est mis sous

tension (3 W) pendant 3h. L'échantillon protéique (200 µl), récupéré dans la cupule située du côté de l'anode, est vérifié en gel SDS-PAGE 13%.

III. 6. 2. Immunisation

Après prélèvement du sérum à J0, trois souris Balb/c âgées de 6 à 8 semaines, sont immunisées avec la protéine recombinante électroéluée. La première immunisation est réalisée par injection intra-péritonéale, d'environ 50 µg de protéine recombinante, en présence d'adjuvant complet de Freund (Sigma). Deux rappels sont effectués à 15 jours d'intervalle avec 50 µg de protéine électroéluée en présence d'adjuvant incomplet de Freund. A chaque injection, un prélèvement sanguin réalisé dans le sinus rétro-orbital de la souris permet de suivre la réponse anticorps. Les sérums prélevés sont testés vis-à-vis d'extraits protéiques de *T. gondii* et de la protéine recombinante électroéluée.

III. 7. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA, Pierce) puis la densité optique est mesurée à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Uvikon 960). La concentration en protéines des échantillons est calculée à l'aide de la courbe étalon réalisée avec la sérum albumine bovine (BSA).

Références Bibliographiques

- Ajioka, J. , Boothroyd, J. C. , Brunk, B. P. , Hehl, L. , Manger, I. D. , Overton, G. C. , Marra, M. , Roos, D. , Wan, K. L. , Waterson, R. and Sibley, L. D. 1998. Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res.* **8**: 18- 28.
- Alberts, B. 1994. Molecular Biology of the Cell, (Flammarion Med. Sci., ed.), New York.
- Alder, J. , Hutch, T. , Meulbroek, J. A. and Clement, J. C. 1994. Treatment of experimental *Toxoplasma gondii* infection by clarithromycin-based combination therapy with minocycline or pyrimethamine. *J. Acq. Immun. Def. Synd.* **7**: 1141-1148.
- Aldritt, S. M. , Joseph, J. T. and Wirth, D. H. 1989. Sequence identification of cytochrome b in *Plasmodium gallinaceum*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3614- 3620.
- Allison, D. S. and Schatz, G. 1986. Artificial mitochondrial presequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **83**: 9011- 9015.
- Ambroise-Thomas, P. and Pelloux, H. 1993a. La toxoplasmose et sa pathologie. *Med. Mal. Infect.* **23**: 121-128.
- Ambroise-Thomas, P. and Pelloux, H. 1993b. Toxoplasmosis-Congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol. Today* **9**: 61-63.
- Ancelle, T. , Goulet, V. , Tirard-fleury, V. , Baril, L. C. d. M. , Thulliez, P. , Weislo, M. and Carme, B. 1996. La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. *Bull. Epidémiol. Hebdom.* **51**: 227-229.
- Anderson, S. , Bankier, A. T. , Barrell, B. G. , deBruijn, M. H. L. , Coulson, A. R. , Drouin, J. , Eperon, I. C. , Nierlich, D. P. , Roe, B. A. , Sanger, F. , Schreier, P. H., et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465.
- Andersson, S. G. E. , Zomorodipour, A. , Andersson, J. O. , Sicheritz-Ponten, T. , Alsmark, U. C. M. , Podowski, R. M. , Näslund, A. K. , Eriksson, A. S. , Winkler, H. H. and Kurland, C. G. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**: 133-140.
- Araujo, F. G. , Huskinson, J. and Remington, J. S. 1991a. Remarkable *in vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphtoquinone 566C80 against tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 293- 299.
- Araujo, F. G. , Shepard, R. M. and Remington, J. S. 1991b. *In vivo* activity of the macrolide antibiotics azythromycin, roxythromycin and spiramycin against *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**: 519-524.
- Araujo, F. G. , Huskinson-Mark, J. , Gutteridge, W. E. and Remington, J. S. 1992a. *In vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphtoquinone 566C80 against the cyst form of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 326- 330.

- Araujo, F. G. , Prokocimer, P. and Remington, J. S. 1992b. Clarithromycin-minocycline is synergistic in a murine model of toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* **165**: 788.
- Araujo, F. G. , Khan, A. A. and Remington, J. S. 1996. Rifapentine is active *in vitro* and *in vivo* against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1335-1337.
- Asai, T. , O'Sullivan, W. J. and Tatibana, M. 1983. A potent nucleotide triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **258**: 6816- 6822.
- Asai, T. , Miura, S. , Sibley, D. L. , Okabayashi, H. and Takeuchi, T. 1995. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **270**: 11391- 11397.
- Attardi, G. and Schatz, G. 1988. Biogenesis of mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**: 289-333.
- Baker, A. and Schatz, G. 1987. Sequences from a prokaryotic genome or the mouse dihydrofolate reductase gene can restore the import of a truncated precursor protein into yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **84**: 3117-3121.
- Baker, K. P. and Schatz, G. 1991. Mitochondrial proteins essential for viability mediate protein import into yeast mitochondria. *Nature* **349**: 205-208.
- Basco, L. K. and Le Bras, J. 1994. *In vitro* activity of mitochondrial ATP synthetase inhibitors against *Plasmodium falciparum*. *J. Euk. Microbiol.* **41**: 179-183.
- Bermudes, D. , Ran Peck, K. , Afifi Afifi, M. , Beckers, C. J. M. and Joiner, K. A. 1994. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **269**: 29252- 29260.
- Bessho, Y. , Ohama, T. and Osawa, S. 1992. Planarian mitochondria. II. The unique genetic code as deduced from cytochrome c oxidase subunit I gene sequences. *J. Mol. Evol.* **34**: 331-335.
- Bhaduri-McIntosh, S. and Vaidya, A. B. 1998. *Plasmodium falciparum*: import of a phosphate carrier protein into heterologous mitochondria. *Exp. Parasitol.* **88**: 252-254.
- Black, M. , Seeber, F. , Soldati, D. , Kim, K. and Boothroyd, J. C. 1995. Restriction enzyme-mediated integration elevates transformation frequency and enables co-transfection of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**: 55-63.
- Black, M. W. and Boothroyd, J. C. 1998. Development of a stable episomal shuttle vector for *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **273**: 3972-3979.
- Bodmer, T. , Zürcher, G. , Imboden, P. and Telenti, A. 1995. Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence *in vitro* activity of rifampicins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**: 345-348.

- Bohne, W. , Heesemann, J. and Gross, U.** 1993. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in IFN-gamma-treated-mouse macrophages. *Infect. Immun.* **61**: 1141-1145.
- Bohne, W. , Heesemann, J. and Groos, U.** 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite- specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun.* **62**: 1761- 1767.
- Bohne, W. , Gross, U. , Ferguson, D. J. P. and Heesemann, J.** 1995. Cloning and characterization of a bradyzoite- specifically expressed gene (*hsp30/ bag1*) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat- shock proteins of plants. *Mol. Microbiol.* **16**: 1221- 1230.
- Bonnefoy, S. , Attal, G. , Langsley, G. , Tekaiia, F. and Mercereau- Pujalon, O.** 1994. Molecular characterization of the heat shock protein 90 gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**: 157- 170.
- Boothroyd, J. C. , Black, M. , Bonnefoy, S. , Hehl, A. , Knoll, L. J. , Manger, I. D. , Ortega-Barria, E. and Tomavo, S.** 1997. Genetic and biochemical analysis of development in *Toxoplasma gondii*. *Phil. Trans. R. Soc. Lon.* **352**: 1347-1354.
- Boothroyd, J. C. , Hehl, A. , Knoll, L. and Manger, I. D.** 1998. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int. J. Parasitol.* **28**: 3-9.
- Burg, J. L. , Perelman, D. , Kasper, L. H. , Ware, P. L. and Boothroyd, J. C.** 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **141**: 3584-3591.
- Burg, J. L. , Grover, C. M. , Pouletty, P. and Boothroyd, J. C.** 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1787-1792.
- Buxton, D. , Ugglä, A. , Lovgren, K. , Thomson, K. , Lunden, A. , Morein, B. and Blewett, D. A.** 1989. Trial of a novel experimental *Toxoplasma* iscom vaccine in pregnant sheep. *Br. Vet. J.* **145**: 451-457.
- Buxton, D. , Thomson, K. M. , Maley, S. , Wright, S. and Bos, H. J.** 1991. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Veterinary Record* **129**: 89-93.
- Buxton, D.** 1993. Toxoplasmosis-The first commercial vaccine. *Parasitol. Today* **9**: 335-337.
- Buxton, D. and Innes, E. A.** 1995. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* **110**: S11-S16.
- Carruthers, V. B. and Sibley, L. D.** 1997. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* **73**: 114-123.

- Carruthers, V. B. and Sibley, L. D.** 1999. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* **31**: 421-428.
- Carter, D. , Donald, R. G. K. , Roos, D. and Ullman, B.** 1997. Expression, purification, and characterization of uracil phosphoribosyltransferase from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **87**: 137-144.
- Caumes, E. , Bocquet, H. , Guermonprez, G. , Rogeaux, O. , Bricaire, F. , Katlama, C. and Gentilini, M.** 1995. Adverse cutaneous reactions to pyrimethamine/sulfadiazine and pyrimethamine/clindamycin in patients with AIDS and toxoplasmic encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* **21**: 656-658.
- Cesbron-Delauw, M.-F.** 1994. Dense- granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host- parasite relationship. *Parasitol. Today* **10**: 293- 296.
- Cesbron-Delauw, M. F. , Tomavo, S. , Beauchamps, P. , Fourmaux, M. P. , Camus, D. , Capron, A. and Dubremetz, J. F.** 1994. Similarities between the primary structure of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **269**: 16217-16222.
- Cesbron-Delauw, M. F. , Lecordier, L. and Mercier, C.** 1996. Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis, p. 59-66. *In* Gross, U. (ed.), Current Topics in Microbiology and Immunology : *Toxoplasma gondii*, Springer, Heidelberg, Germany.
- Charif, H. , Darcy, F. , Torpier, G. , Cesbron-Delauw, M. F. and Capron, A.** 1990. *Toxoplasma gondii* : characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* **71**: 114-124.
- Cheng, M. Y. , Hartl, U. F. , Martin, J. , Pollock, R. A. , Kalousek, F. , Neupert, W. , Hallberg, E. M. , Hallberg, R. L. and Horwich, A. L.** 1989. Mitochondrial Heat- Shock Protein Hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* **337**: 620- 625.
- Clough, B. , Strath, M. , Preiser, P. , Denny, P. and Wilson, R. J. M.** 1997. Thiostrepton binds to malarial plastid rRNA. *FEBS Letters* **406**: 123-125.
- Cornelissen, A. W. C. A. , Overdulve, J. P. and Hoenderboom, J. M.** 1981. Separation of *Isospora (Toxoplasma) gondii* cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density- gradient centrifugation. *Parasitology* **81**: 103- 108.
- Couvreur, G. , Sadak, A. , Fortier, B. and Dubremetz, J. F.** 1988. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **97**: 1-10.
- Couvreur, J.** 1993. Toxoplasmose congénitale. Prise en charge et devenir. *Med. Mal. Infect.* **23**: 176-182.

- Creasey, A. , Mendis, K. , Carlton, J. , Williamson, D. , Wilson, I. and Carter, R. 1994. Maternal inheritance of extrachromosomal DNA in malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **65**: 95- 98.
- Cremer, G. , Basco, L. K. , Le Bras, J. , Camus, D. and Slomianny, C. 1995. *Plasmodium falciparum* : detection of P-glycoprotein in chloroquine-susceptible and chloroquine-resistant clones and isolates. *Exp. Parasitol.* **81**: 1-8.
- Cristina, N. , Liaud, M. F. , Santoro, F. , Oury, B. and Ambroise-Thomas, P. 1991. A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis, and use in strain characterization. *Exp. Parasitol.* **73**: 73-81.
- Darcy, F. , Deslée, D. , Santoro, F. , Charif, H. , Auriault, C. , Decoster, A. , Duquesne, V. and Capron, A. 1988. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* **10**: 553-567.
- Darcy, F. , Maes, P. , Gras-Masse, H. , Auriault, C. , Bossus, M. , Deslée, D. , Godard, I. , Cesbron, M. F. , Tartar, A. and Capron, A. 1992. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J. Immunol.* **149**: 3636-3641.
- Das, A. , Syin, C. , Fujioka, H. , Zheng, H. , Goldman, N. , Aikaw, M. and Kumar, N. 1997. Molecular characterization and ultrastructural localization of *Plasmodium falciparum* Hsp60. *Mol. Biochem. Parasitol.* **88**: 95- 104.
- de Carvalho, L. and de Souza, W. 1989. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J. Protozool.* **36**: 164-170.
- de Carvalho, L. , Souto- Padron, T. and de Souza, W. 1991. Localization of lectin-binding sites and sugar-binding proteins in tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **77**: 156-161.
- deMelo, E. J. , deCarvahlo, T. U. and deSouza, W. 1992. Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Struct. Func.* **17**: 311-317.
- deMelo, E. J. T. and de Souza, W. 1997. Relationship between the host cell endoplasmic reticulum and the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii*. *Cell Struct. Funct.* **22**: 317-323.
- Denkers, E. Y. and Gazzinelli, R. T. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 569-588.
- Denton, H. , Brown, S. M. A. , Roberts, C. W. , Alexander, J. , McDonald, V. , Thong, K. W. and Coombs, G. H. 1996a. Comparison of the phosphofructokinase and pyruvate

kinase activities of *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella* and *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **76**: 23-29.

Denton, H. , Roberts, C. W. , Alexander, J. , Thong, K.-W. and Coombs, G. H. 1996b. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol. Letters* **137**: 103- 108.

Derouin, F. , Almadany, R. , Auber, P. , Gluck-Man, E. , Beauvais, H. , Garin, Y. and Larivierre, M. 1992. Toxoplasmosis in bone marrow-transplant recipients: report of seven cases and review. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 267-270.

deVries, S. and Marres, C. A. M. 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **895**: 205-239.

di Rago, J.-P. , Perea, X. and Colson, A.-M. 1986. DNA sequence analysis of diuron-resistant mutations in the mitochondrial cytochrome b gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **208**: 208- 210.

di Rago, J.-P. and Colson, A.-M. 1988. Molecular basis for resistance to antimycin and diuron, Q- cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinol- cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**: 12564- 12570.

Divo, A. A. , Geary, T. G. and Ginsburg, H. 1985. The mitochondrion of *Plasmodium falciparum* visualized by rhodamine 123 fluorescence. *J. Protozool.* **32**: 442-446.

Dobrowolski, J. M. and Sibley, L. D. 1996. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* **84**: 933-939.

Donald, R. G. K. and Roos, D. S. 1994. Homologous recombination and gene replacement at the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase locus in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **63**: 243-253.

Donald, R. G. K. and Roos, D. S. 1995. Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 5749- 5753.

Donald, R. G. K. , Carter, D. , Ullman, B. and Ross, D. S. 1996. Insertional tagging, cloning and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* **271**: 14010-14019.

Donald, R. G. K. and Roos, D. S. 1998. Gene knock-out and allelic replacement in *Toxoplasma gondii* : HXGPRT as a selectable marker for hit-and-run mutagenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**: 295-305.

Dubey, J. P. 1998. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology* **116**: 43-50.

- Dubey, J. P. , Lindsay, D. S. and Speer, C. A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 267-299.
- Dubremetz, J. F. , Achbarou, A. , Bermudes, D. and Joiner, K. A. 1993. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*-host cell interaction. *Parasitol. Res.* **79**: 402-408.
- Dubremetz, J. F., 1995. *Toxoplasma gondii*: cell biology update, p. 345-358. In Molecular approaches to parasitology,(J. C. Boothroyd and R. Komuniecki, ed.), Wiley-Liss., New York.
- Dubremetz, J. F. and Schwartzman, J. D. 1993. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.* **144**: 31-33.
- Dubremetz, J. F. 1998. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol.* **6**: 27-30.
- Dupouy-Camet, J. , Gavinet, M. F. , Paugam, A. and Tourte-Schaefer, C. 1993. Mode de contamination, incidence et prévalence de la toxoplasmose. *Med. Mal. Infect.* **23**: 139-147.
- Dyer, M. , Wong, I. H. , Jackson, M. , Huynh, P. and Mikkelsen, R. 1994. Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding an adenine nucleotide translocator from *Plasmodium falciparum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1186**: 133-136.
- Dzierszynski, F. , Popescu, O. , Toursel, C. , Slommiány, C. and Tomavo, S. 1999. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes : implications for evolutionary origin of apicomplexans. *J. Biol. Chem.* : Sous presse.
- Egea, N. and Lang- Unasch, N. 1995. Phylogeny of the large extrachromosomal DNA of organisms in the phylum Apicomplexa. *J. Euk. Microbiol.* **42**: 679- 684.
- Ellis, J. T. , Luton, K. , Braverstock, P. R. , Whitworth, G. , Tenter, A. M. and Johnson, A. M. 1995. Phylogenetic relationships between *Toxoplasma* and *Sarcocystis* deduced from a comparison of 18S rDNA sequences. *Parasitology* **110**: 521-528.
- Ellis, R. J. and van der Vies, S. 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 321-347.
- Endicott, J. A. and Ling, V. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annual Rev. Biochem.* **58**: 137-171.
- Feagin, J. E. 1992. The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 145-148.
- Feagin, J. E. , Werner, E. , Gardner, M. J. , Williamson, D. H. and Wilson, R. J. M. 1992. Homologies between the contiguous and fragmented rRNAs of the two *Plasmodium falciparum* extrachromosomal DNAs are limited to core sequences. *Nucleic Acids Res.* **20**: 879-887.

- Feagin, J. E.** 1994. The extrachromosomal DNAs of apicomplexa parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 81- 104.
- Ferguson, D. J. and Hutchison, W. M.** 1987. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* **73**: 483-491.
- Fichera, M. E. and Roos, D. S.** 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* **390**: 407- 409.
- Fortier, B. and Dubremetz, J. F.** 1993. Structure et biologie de *Toxoplasma gondii*. *Med. Mal. Infect.* **23**: 148-153.
- Fourmaux, M. N. , Achbarou, A. , Mercereau-Puijalon, O. , Biderre, C. , Briche, I. , Loyens, A. , Odberg-Ferragut, C. , Camus, D. and Dubremetz, J. F.** 1996. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**: 201-210.
- Foussard, F. , Leriche, M. A. and Dubremetz, J. F.** 1991. Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology* **3**: 367-370.
- Frenkel, J. K. , Dubey, J. P. and Miller, N. L.** 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* **167**: 893-896.
- Frenkel, J. K.** 1973. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology and immunology, p. 343-410. In M., H. D., and Long, P. L. (ed.), *The Coccidia*. University Park Press, Baltimore, Butterworth, London.
- Frenkel, J. K.** 1988. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today* **4**: 273-278.
- Fry, M. , Webb, E. and Pudney, M.** 1990. Effect of mitochondrial inhibitors on adenosinetriphosphate levels in *Plasmodium falciparum*. *Comp. Biochem. Physiol.* **96B**: 775-782.
- Fry, M.** 1991. Mitochondria of *Plasmodium*, p. 154-167. In G., C., and M., N. (ed.), *Biochemical Protozoology*. Taylor&Francis, London.
- Fry, M. and Pudney, M.** 1992. Site of action of the antimalarial hydroxynaphtoquinone, 2-(*trans*-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphtoquinone (566C80). *Biochem. Pharmacol.* **43**: 1545- 1553.
- Furtado, G. C. , Cao, Y. and Joiner, K. A.** 1992a. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the $\beta 1$ integrin receptor $\alpha 6\beta 1$ on human foreskin fibroblasts and chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* **60**: 4925-4931.

- Furtado, G. C. , Slowik, M. , Kleinman, H. K. and Joiner, K. A.** 1992b. Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. *Infect. Immun.* **60**: 2337-2342.
- Gamain, B. , Langsley, G. , Fourmaux, M. N. , Touzel, J. P. , Camus, D. , Dive, D. and Slommianny, C.** 1996. Molecular characterization of the glutathione peroxidase gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **78**: 237- 248.
- Gardner, M. J. , Bates, P. A. , Ling, I. T. , Moore, D. J. , McCready, S. , Gunasekera, M. B. R. , Wilson, R. J. M. and Williamson, D. H.** 1988. Mitochondrial DNA of the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **31**: 11- 18.
- Ginsburg, H. , Divo, A. A. , Geary, G. , Boland, M. T. and Jensen, J. B.** 1986. Effects of mitochondrial inhibitors on intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in *in vitro* cultures. *J. Protozool.* **33**: 121-125.
- Glaser, E. , Eriksson, A. C. and Sjöling, S.** 1994. Bifunctional role of the bc1 complex in plants. *FEBS Letters* **346**: 83-87.
- Glick, B. and Schatz, G.** 1991. Import of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 21- 44.
- Godard, I. , Estaquier, J. , Zenner, L. , Bossus, M. , Auriault, C. , Darcy, F. , Gras-Masse, H. and Capron, A.** 1994. Antigenicity and immunogenicity of p30- derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. *Mol. Immunol.* **31**: 1353- 1363.
- Gomez, M. S. , Piper, R. C. , Hunsaker, L. A. , Royer, R. E. , Deck, L. M. , Makler, M. T. and Van der Jagt, D. L.** 1997. Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate dehydrogenase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **90**: 235-246.
- Gorman, C. M. , Moffat, L. F. and Howard, B. H.** 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1044-1051.
- Gray, M. W.** 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Intern. Rev. Cytol.* **141**: 233-357.
- Gray, M. W. , Lang, B. F. , Cedergren, R. , Golding, G. B. , Lemieux, C. , Sankoff, D. , Turmel, M. , Brossard, N. , Delage, E. , Littlejohn, T. G. , Plante, I., et al.** 1998. Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **26**: 865-878.
- Grimwood, B. G. , Hechemy, K. and Stevens, R. W.** 1979. *Toxoplasma gondii*: Purification of trophozoites propagated in cell culture. *Exp. Parasitol.* **48**: 282-286.
- Grimwood, J. and Smith, J. E.** 1995. *Toxoplasma gondii*: redistribution of tachyzoite surface protein during host cell invasion and intracellular development. *Parasitol. Res.* **81**: 657- 661.

- Grimwood, J. , Mineo, J. R. and Kasper, L. H.** 1996. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infect. Immun.* **64**: 4099-4104.
- Guay, J. M. , Huot, A. , Gagnon, S. , Trembley, A. and Levesque, R. C.** 1992. Physical and genetic mapping of cloned ribosomal DNA from *Toxoplasma gondii*: primary and secondary structure of the 5S gene. *Gene* **114**: 165-171.
- Hackstein, J. H. P. , Mackenstedt, U. , Mehlhorn, H. , Meijerink, J. P. P. , Schubert, H. and Leunissen, J. A. M.** 1995. Parasitic apicomplexans harbor a chlorophyll a- D1 complex, the potential target for therapeutic triazines. *Parasitol. Res.* **81**: 207- 216.
- Hall, R. , Coggins, L. , McKellar, S. , Shiels, B. and Tait, A.** 1990. Characterization of an extrachromosomal DNA element from *Theileria annulata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**: 253-260.
- Hatin, I. and Jaureguiberry, G.** 1995. Molecular characterization of the ADP/ATP-transporter cDNA from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Biochem.* **228**: 86-91.
- Hehl, A. , Krieger, T. and Boothroyd, J. C.** 1997. Identification and characterization of SRS1, a *Toxoplasma gondii* surface antigen upstream of and related to SAG1. *Mol. Biochem. Parasitol.* **89**: 271-282.
- Heikkila, J. J.** 1993a. Heat shock gene expression and development. I. An overview of fungal, plant, and poikilothermic animal developmental systems. *Developmental Genetics* **14**: .
- Heikkila, K. J.** 1993b. Heat shock gene expression and development. II. An overview of mammalian and avian developmental systems. *Developmental Genetics* **14**: 87- 91.
- Heintzelman, M. B. and Schwartzman, J. D.** 1997. A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol* **271**: 139-146.
- Hendrick, J. P. and Hartl, F.-U.** 1993. Molecular chaperone functions of heat- shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 349- 384.
- Holloway, S. P. , Min, W. and Inselburg, J. W.** 1994. Isolation and characterization of a chaperonin-60 gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **64**: 25- 32.
- Howe, D. K. and Sibley, L. D.** 1994. *Toxoplasma gondii*: analysis of different laboratory stocks of RH strain reveals genetic heterogeneity. *Exp. Parasitol.* **78**: 242-245.
- Howe, D. K. and Sibley, L. D.** 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* **172**: 1561-1562.
- Howe, D. K. , Summers, B. C. and Sibley, L. D.** 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **64**: 5193-5198.

- Hudson, A. T. , Randall, A. W. , Fry, M. , Ginger, C. D. , Hill, B. , Latter, V. S. , McHardy, N. and Williams, R. B. 1985. Novel anti- malarial hydroxynaphtoquinones with potent broad spectrum anti- protozoal activity. *Parasitology* **90**: 45- 55.
- Hudson, A. T. 1993. Atovaquone-A novel broad-spectrum anti-infective drug. *Parasitol. Today* **9**: 66-68.
- Hudson, A. T. 1994. The contribution of empiricism to antiparasite drug discovery. *Parasitol. Today* **10**: 387-389.
- Hutchinson, W. M. 1965. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature (London)* **206**: 961-962.
- Iltzsch, M. H. 1993. Pyrimidine salvage pathways in *Toxoplasma gondii*. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 24-28.
- Iltzsch, M. H. and Tankbrsley, K. O. 1994. Structure-activity relationship of ligands of uracil phosphoribosyltransferase from *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 781-792.
- Israelski, D. and Remington, J. 1990. Activity of gamma interferon in combination with pyrimethamine or clindamycin in treatment of murine toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**: 358-360.
- Jambou, R. , Hatin, I. and Jaureguiberry, G. 1995. Evidence by *in situ* hybridization for stage-specific expression of the ATP/ADP translocator mRNA in *Plasmodium falciparum*. *Exp. Parasitol.* **80**: 568-571.
- Janku, J. 1923. Pathogenèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microphthalmalme avec parasitémie de la rétine. *Cas. Lek. Cesk.* **62**: 1021-1027.
- Ji, Y. , Mericle, B. L. , Rehkopf, D. H. , Anderson, J. D. and Feagin, J. E. 1996. The *Plasmodium falciparum* 6kb element is polycistronically transcribed. *Mol. Biochem. Parasitol.* **81**: 211-223.
- Johnson, A. M. , McDonald, P. J. and Illana, S. 1986. Characterization and *in vitro* translation of *Toxoplasma gondii* ribonucleic acid. *Mol. Biochem. Parasitol.* **18**: 313-320.
- Johnson, R. B. , Fearon, K. , Mason, T. and Jindal, S. 1989. Cloning and characterization of the yeast chaperonin *HSP60* gene. *Gene* **84**: 295- 302.
- Joiner, K. A. 1991. Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue. *Parasitol. Today* **7**: 226-227.
- Joseph, J. T. , Aldritt, S. M. , Unnasch, T. , Pujalon, O. and Wirth, D. F. 1989. Characterization of a conserved extrachromosomal element isolated from the avian malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3621- 3629.

- Kairo, A. , Fairlamb, A. H. , Gobright, E. and Nene, V.** 1994. A 7.1 kb linear DNA molecule of *Theileria parva* has scrambled rDNA sequences and open reading frames for mitochondrially encoded proteins. *EMBO J.* **13**: 898- 905.
- Karcz, S. and Cowman, A. F.** 1991. Similarities and differences between the multidrug resistance phenotype of mammalian tumor cells and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Exp. Parasitol.* **73**: 233-240.
- Kasper, L. H. and Ware, P. L.** 1985. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J.Clin. Invest.* **75**: 1570-7.
- Kasper, L. H.** 1987. Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* **9**: 433-445.
- Kasper, L. H. , Khan, I. A. , Ely, K. H. , Buelow, R. and Boothroyd, J. C.** 1992. Antigen-specific (p30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **148**: 1493-1498.
- Katlama, C. , Mouthon, B. , Gourdon, D. , Lapierre, D. and Rousseau, F.** 1996. Atovaquone as long-term suppressive therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS and multiple drug tolerances. *AIDS* **10**: 1107-1112.
- Kiatfuengfoo, R. , Suthiphongchai, T. , Prapunwattana, P. and Yuthavong, Y.** 1989. Mitochondria as the site of action of tetracycline on *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 109- 116.
- Kilejian, A.** 1975. Circular mitochondrial DNA from the avian malarial parasite *Plasmodium lophurae*. *Biochim. Biophys. Acta* **390**: 276- 284.
- Kim, K. , Soldati, D. and Boothroyd, J. C.** 1993. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with Chloramphenicol Acetyltransferase as selectable marker. *Science* **262**: 911- 914.
- Kim, K. and Boothroyd, J. C.** 1995. *Toxoplasma gondii*: stable complementation of *sag1* (p30) mutants using SAG1 transfection and fluorescent-activated cell sorting. *Exp. Parasitol.* **80**: 46-53.
- King, M. P. and Attardi, G.** 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* **246**: 500-503.
- Knoll, L. J. and Boothroyd, J. C.** 1998. Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and the negative selectable marker hypoxanthine- xanthine- guanine phosphoribosyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 807- 814.
- Köhler, S. , Delwiche, C. F. , Denny, P. W. , Tilney, L. G. , Webster, P. , Wilson, R. J. M. , Palmer, J. D. and Roos, D. S.** 1997. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* **275**: 1485- 1489.

- Kovacs, J. A.** 1992. Efficacy of atovaquone in treatment of toxoplasmosis in patients with AIDS. *Lancet* **340**: 637-638.
- Kozak, M.** 1989. The scanning model for translation: an update. *J. Cell. Biol.* **108**: 229-241.
- Kroemer, G. , Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M.** 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 619-642.
- Krug, E. C. , Marr, J. J. and Berens, R. L.** 1989. Purine metabolism in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **264**: 10601-10607.
- Krungskrai, J. , Cerami, A. and Henderson, G. B.** 1991. Purification and characterization of dihydroorotate dehydrogenase from the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Biochemistry* **30**: 1934-1939.
- Krungskrai, J.** 1995. Purification, characterization and localization of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum*, human malaria parasite. *Biochim. Biophys. Acta* **1243**: 351-360.
- Krungskrai, J. , Krungskrai, S. R. , Suraveratum, N. and Prapunwattana, P.** 1997. Mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase: chemotherapeutic targets in malarial parasites. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **42**: 1007-1014.
- Lacassin, F. , Schaffo, D. , Perronne, C. , Longuet, P. , Leport, C. and Vilde, J. L.** 1995. Clarithromycin-minocycline combination as salvage therapy for toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 276-277.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LaNoue, K. F. and Schoolwerth, A. C.** 1979. Metabolite transport in mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 871-922.
- Laugier, M. and Quilici, M.** 1970. Intérêt expérimental d'une souche de toxoplasme peu pathogène pour la souris. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **45**: 389-403.
- LeBlanc, S. B. and Wilson, C. M.** 1993. The dihydroorotate dehydrogenase gene homologue of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**: 349-352.
- Lecordier, L. , Mercier, C. , Torpier, G. , Tourvieille, B. , Darcy, F. , Liu, J. L. , Maes, P. , Tartar, A. , Capron, A. and Cesbron-Delauw, M. F.** 1993. Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**: 143-154.
- Lecordier, L. , Moleon-Borodowski, I. , Dubremetz, J. F. , Tourvieille, B. , Mercier, C. , Deslée, D. , Capron, A. and Cesbron-Delauw, M. F.** 1995. Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* **70**: 85-94.

- Leport, C. , Raffi, F. and Vilde, J. L.** 1988. Traitement de la toxoplasmose cérébrale au cours du SIDA. *Med. Mal. Infect.* **18**: 729-736.
- Leport, C. and Remington, J. S.** 1992. Toxoplasmose au cours du SIDA. *La Presse Med.* **21**: 1165-1171.
- Leriche, M. A. and Dubremetz, J.-F.** 1991. Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**: 249- 260.
- Levine, N. D. , Corliss, J. O. and Cox, F. E. G.** 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* **27**: 37-58.
- Lindquist, S. and Craig, E. A.** 1988. The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 631-677.
- Lindsay, D. S. , Mitschler, R. R. , Toivio-Kinnucan, M. A. , Upton, S. J. , Dubey, J. P. and Blagburn, B. L.** 1993. Association of host cell mitochondria with developing *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Am. J. Vet. Res.* **54**: 1663- 1667.
- Luft, B. J. , Naot, Y. , Araujo, F. G. , Stinson, B. and Remington, J. S.** 1983. Primary and reactivated *Toxoplasma* infection in patients with cardiac transplantation. *Ann. Inst. Med.* **99**: 27.
- Luft, B. J. and Remington, J. S.** 1988. Toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* **157**: 1- 6.
- Lycke, E. and Norrby, R.** 1966. Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultures host-cells. *Brit. J. Exp. Pathol.* **47**: 248-256.
- Lycke, E. , Carlberg, K. and Norrby, R.** 1975. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of toxoplasma. *Infect. Immun.* **11**: 853-861.
- Makioka, A. , Stavros, B. , Ellis, J. T. and Johnson, A. M.** 1993. Detection and characterization of DNA polymerase activity in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **107**: 135-139.
- Makioka, A. and Ohtomo, H.** 1995. An increased DNA polymerase activity associated with virulence of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **81**: 1021- 1022.
- Manger, I. D. , Hehl, A. , Parmley, S. , Sibley, D. L. , Marra, M. , Hillier, L. , Waterson, R. and Boothroyd, J. C.** 1998a. Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect. Immun.* **66**: 1632- 1637.

- Manger, I. D. , Hehl, A. B. and Boothroyd, J. C.** 1998b. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.* **66**: 2237-2244.
- Maniatis, T. , Fritsch, E. F. and Sambrook, J.** 1990. Molecular cloning, Cold Spring Harbor ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- May, T. , Rabaud, C. , Katlama, C. , Leport, C. , Ambroise-Thomas, P. and Canton, P.** 1993. Toxoplasmose extracérébrale au cours du SIDA : résultats d'une enquête nationale. *Med. Mal. Infect.* **23**: 190-200.
- Mc Fadden, G. I. , Reith, M. E. , Munholland, J. and Lang- Unnasch, N.** 1996. Plastid in human parasites. *Nature* **381**: 482.
- McConkey, G. A. , Rogers, M. J. and McCutchan, T. F.** 1997. Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **24**: 2046-2049.
- McFadden, D. C. , Tomavo, S. , Berry, E. A. and Boothroyd, J. C.** 1999. Atovaquone-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* contain mutations in the Q₀ domain of the cytochrome b gene. : Soumis pour publication.
- McIntosh, M. T. , Srivastava, R. and Vaidya, A. B.** 1998. Divergent evolutionary constraints on mitochondrial and nuclear genomes of malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **95**: 69-80.
- McMullin, T. W. and Hallberg, R. L.** 1987. A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli groEL* gene. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 371-380.
- Megson, A. , Inman, G. J. , Hunt, P. D. , Baylis, H. A. and Hall, R.** 1991. The gene for apocytochrome b of *Theileria annulata* resides on a small linear extrachromosomal element. *Mol. Biochem. Parasitol.* **48**: 113-116.
- Mercier, C. , Lecordier, L. , Darcy, F. , Deslée, D. , Murray, A. , Tourvieille, B. , Maes, P. , Capron, A. and Cesbron-Delauw, M. F.** 1993. Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 71-82.
- Mercier, C. , Lefebvre-Van Hende, S. , Garber, G. E. , Lecordier, L. , Capron, A. and Cesbron-Delauw, M. F.** 1996. Common *cis*-acting elements critical for the expression of several genes of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* **21**: 421-428.
- Mignotte, B. and Vayssiere, J. L.** 1998. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **252**: 1-15.
- Mineo, J. R. , McLeod, R. , Mack, D. , Smith, J. , Khan, I. A. , Ely, E. H. and Kasper, L. H.** 1993. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG1, P30) inhibit infection

of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol.* **150**: 3951-3964.

Mondragon, R. and Frixione, E. 1996. Ca²⁺-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J. Euk. Microbiol.* **43**: 120-127.

Mordue, D. G. and Sibley, L. D. 1997. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J. Immunol.* **159**: 4452-4459.

Mordue, D. G. , Hakansson, S. , Niesman, I. and Sibley, D. 1999. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp. Parasitol.* **92**: 87-99.

Mori, M. and Terada, K. 1998. Mitochondrial protein import in animals. *Biochem. Biophys. Acta* **1403**: 12-27.

Morlat, P. , Ragnaud, J. M. , Gin, H. , Lacoste, D. , Beylot, J. and Aubertin, J. 1993. La toxoplasmose cérébrale au cours du SIDA. *Med. Mal. Infect.* **23**: 183-89.

Murphy, A. D. , Doeller, J. E. , Hearn, B. and Lang-Unnasch, N. 1997. *Plasmodium falciparum*: cyanide-resistant oxygen consumption. *Exp. Parasitol.* **87**: 112-120.

Nagel, S. D. and Boothroyd, J. C. 1988. The α - and β - tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns. *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**: 261-273.

Nagel, S. D. and Boothroyd, J. C. 1989. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J. Biol. Chem.* **264**: 5569-5574.

Naguib, F. N. M. , Iltzsch, M. H. , Kouni, M. M. , Panzica, R. P. and Kouni, M. H. 1995. Structure- activity relationships for the binding of ligands to xanthine or guanine phosphoribosyl- transferase from *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 1685- 1693.

Nakaar, V. , Bermudes, D. , Ran Peck, K. and Joiner, K. 1998. Upstream elements required for expression of nucleoside triphosphate hydrolase genes of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**: 229-239.

Nakaar, V. , Samuel, B. U. , Ngo, E. O. and Joiner, K. A. 1999. Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. *J. Biol. Chem.* **274**: 5083-5087.

Nichols, B. A. and Chiappino, M. L. 1987. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* **34**: 217-226.

Nicolle, C. and Manceaux, L. 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Acad. Sci.* **147**: 763-766.

- Nosek, J. , Tomaska, L. , Fukuhara, H. , Suyama, Y. and Kovac, L. 1998. Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends Genet.* **14**: 184-188.
- Ödberg- Ferragut, C. , Soete, M. , Engels, A. , Samyn, B. , Loyens, A. , Van Beeumen, J. , Camus, D. and Dubremetz, J.-F. 1996. Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* **82**: 237- 244.
- Ödberg-Ferragut, C. , Renault, J. P. , Viscogliosi, E. , Toursel, C. , Briche, I. , Engels, A. , Lepage, G. , Morgenstern-Badarau, I. , Camus, D. , Tomavo, S. and Dive, D. 1999. Molecular cloning, expression analysis and iron metal cofactor characterization of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. : Soumis pour publication.
- Olliaro, P. , Gorini, G. , Jabes, D. , Regazzetti, A. , Rossi, R. , Marchetti, A. , Tinelli, C. and Della Bruna, C. 1994. *In vitro* and *in vivo* activity of rifabutin against *Toxoplasma gondii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**: 649-657.
- Ossorio, P. N. , Sibley, L. D. and Boothroyd, J. C. 1991. Mitochondrial-like DNA sequences flanked by direct and inverted repeats in the nuclear genome of *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* **222**: 525-536.
- Ouelette, M. and Papadopoulou, B. 1993. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitol. Today* **9**: 150-153.
- Parmley, S. F. , Yang, S. , Harth, G. , Sibley, L. D. , Sucharczuk, A. and Remington, J. S. 1994. Molecular characterization of a 65- kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**: 283- 296.
- Parmley, S. F. , Weiss, L. M. and Yang, S. 1995. Cloning of a bradyzoite- specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**: 253- 257.
- Pashley, T. V. , Volpe, F. , Pudney, M. H., J. E. , Sims, P. F. G. and Delves, C. J. 1997. Isolation and molecular characterization of the bifunctional hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **86**: 37-47.
- Paulsen, I. T. and Skurray, R. A. 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes-an analysis. *Gene* **124**: 1-11.
- Pavesio, C. E. N. , Chiappino, M. L. , Setzer, P. Y. and Nichols, B. A. 1992. *Toxoplasma gondii*: differentiation and death of bradyzoites. *Parasitol. Res.* **78**: 1-9.
- Pelmont, J. (P.U.G. ed.). 1995. Enzymes: Catalyseurs du monde vivant.
- Peng, Z. , Mansour, J. M. , Araujo, F. , Ju, J. , McKenna, C. E. and Mansour, T. E. 1995. Some phosphonic acid analogs as inhibitors of pyrophosphate-dependent

- phosphofructokinase, a novel target in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Pharmacol.* **49**: 105-113.
- Pfanner, N. and Neupert, W.** 1990. The mitochondrial protein import apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 331- 353.
- Pfefferkorn, E. R. and Pfefferkorn, L. C.** 1977a. Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J. Protozool.* **24**: 449-53.
- Pfefferkorn, E. R. and Pfefferkorn, L. C.** 1977b. *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to 5-fluorodeoxyuridine. *Exp. Parasitol.* **42**: 44-55.
- Pfefferkorn, E. R.** 1978. *Toxoplasma gondii*: the enzymatic defect of a mutant resistant to 5-fluorodeoxyuridine. *Exp. Parasitol.* **44**: 26-35.
- Pfefferkorn, E.** 1986. The cell biology of *Toxoplasma gondii*, p. 26-50. In Wyler, D. J. (ed.), *Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects*, Freeman, New York.
- Pfefferkorn, E. R. , Borotz, S. E. and Nothnagel, R. F.** 1993. Mutants of *Toxoplasma gondii* resistant to atovaquone (566C80) or decoquinate. *J. Parasitol.* **79**: 559- 564.
- Pfefferkorn, E. R. and Borotz, S. E.** 1994. *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to 6-thioxanthine. *Exp. Parasitol.* **79**: 374-382.
- Poyton, R. O.** 1996. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 563-607.
- Prapunwattana, P. , O'Sullivan, W. J. and Yuthavong, Y.** 1988. Depression of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase activity in *in vitro* culture by tetracycline. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**: 119-124.
- Prasad, T. K. and Hallberg, R. L.** 1989. Identification and metabolic characterization of the *Zea mays* mitochondrial homolog of the *Escherichia coli* groEL protein. *Plant Mol. Biol.* **12**: 609- 618.
- Prasad, T. K. and Stewart, C. R.** 1992. cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. *Plant Mol. Biol.* **18**: 873- 885.
- Preiser, P. R. , Wilson, R. J. M. , Moore, P. W. , McCready, S. , Hajibagheri, M. A. N. , Blight, K. J. , Strath, M. and Williamson, D. H.** 1996. Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA. *EMBO J.* **15**: 684- 693.
- Priest, J. W. and Hajduk, S. L.** 1994. Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Bioener. Biomem.* **26**: 179-191.

- Pudney, M. , Yeates, C. L. and Derouin, F.** 1994. 4-pyridone anti-toxoplasma compounds with activity against cyst stages, p. 63. 47th Annual Meeting. Society of Protozoologists, Cleveland, Ohio, USA.
- Pukrittayakamee, S. , Viravan, C. , Charoenlarp, P. , Yeamput, C. , Wilson, R. J. M. and White, N. J.** 1994. Antimalarial effects of rifampin in *Plasmodium vivax* malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 511-514.
- Rinder, H. , Thomschke, A. , Darde, M. L. and Loscher, T.** 1995. Specific DNA polymorphism discriminate between virulence and non- virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* **69**: 123-126.
- Roberts, F. , Roberts, C. W. , Johnson, J. J. , Kyle, D. E. , Krell, T. , Coggins, J. R. , Coombs, G. H. , Milhous, W. K. , Tzipori, S. , Ferguson, D. J. P. , Chakrabarti, D., et al.** 1998. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* **393**: 801- 805.
- Roger, A. J. , Clark, C. G. and Doolittle, W. F.** 1996. A possible mitochondrial gene in the early branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **93**: 14648-14622.
- Roger, A. J. , Svärd, S. G. , Tovar, J. , Clark, C. G. , Smith, M. W. , Gillin, F. D. and Sogin, M. L.** 1998. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **95**: 229-234.
- Rogers, M. J. , Bukhman, Y. V. , McCutchan, T. F. and Draper, D. E.** 1997. Interaction of thiostrepton with an RNA fragment derived from the plastid-encoded ribosomal RNA of the malarial parasite. *RNA* **3**: 815-820.
- Roos, D. S.** 1993. Primary structure of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **268**: 6269-6280.
- Roos, D. , Donald, R. G. K. , Morissette, N. S. , Lindsay, A. and Moulton, C.** 1994. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Meth. Cell Biol.* **45**: 27-63.
- Rousseau, F. , Leport, C. and Vildé, J. L.** 1993. Prévention de la toxoplasmose chez les immunodéprimés. *Med. Mal. Infect.* **23**: 201-210.
- Sabchareon, A. , Attanath, P. , Phanuaksook, P. , Chanthavanich, P. , Poonpanich, P. , Mookmanee, D. , Chongsuphajaisiddhi, T. , Sadler, B. M. , Hussein, Z. , Canfield, C. J. and Hutchinson, D. B. A.** 1998. Efficacy and pharmacokinetics of atovaquone and proguanil in children with multi-drug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 201-206.
- Sabin, A. B.** 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* **116**: 801-807.

- Saffer, L. D. and Schwartzman, J. D.** 1991. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J. Protozool.* **38**: 454-460.
- Saffer, L. D. , Mercereau-Puijalon, O. , Dubremetz, J. F. and Schwartzman, J. D.** 1992. Localization of *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* **39**: 526-530.
- Sam-yellow, T. Y.** 1996. Rhoptry organelles of the Apicomplexa : their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today* **12**: 308-316.
- Sanger, F. , Nicklen, S. and Coulson, A. R.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **74**: 5463-5467.
- Schatz, G.** 1987. Signals guiding proteins to their correct locations in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **165**: 1-6.
- Schoondermark-van de Ven, E. , Melchers, W. , Camps, W. , Eskes, T. , Meuwissen, J. and Galama, J.** 1994. Effectiveness of spiramycin for treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection in rhesus monkeys. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 1930-1936.
- Schwab, J. C. , Beckers, C. J. M. and Joiner, K. A.** 1994. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 509- 513.
- Schwab, J. C. , Mohammed, A. A. , Pizzorno, G. , Handschumacher, R. E. and Joiner, K. A.** 1995. *Toxoplasma gondii*: tachyzoites possess an unusual plasma membrane adenosine transporter. *Mol. Biochem. Parasitol.* **70**: 59- 69.
- Schwartzman, J. D. and Pfefferkorn, E. R.** 1982. *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp. Parasitol.* **53**: 77- 86.
- Seeber, F.** 1997. Consensus sequence of translational initiation sites from *Toxoplasma gondii* genes. *Parasitol. Res.* **83**: 309-311.
- Seeber, F. , Ferguson, D. J. P. and Gross, U.** 1998. *Toxoplasma gondii*: a paraformaldehyde-insensitive diaphorase activity acts as a specific histochemical marker for the single mitochondrion. *Exp. Parasitol.* **00**: 1- 3.
- Shukla, G. C. and Nene, V.** 1998. Telomeric features of *Theileria parva* mitochondrial DNA derived from cycle sequence data of total genomic DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **95**: 159-163.
- Sibley, L. D. , Weidner, E. and Krahenbuhl, J. L.** 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* **315**: 416-419.
- Sibley, L. D. , Lawson, R. and Weidner, E.** 1986. Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**: 83-87.

- Sibley, L. D. , Pfefferkorn, E. R. and Boothroyd, J. C. 1991. Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today* **7**: 327-328.
- Sibley, L. D. and Boothroyd, J. C. 1992a. Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**: 291-300.
- Sibley, L. D. and Boothroyd, J. C. 1992b. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* **359**: 82-85.
- Sibley, L. D. , Leblanc, A. J. , Pfefferkorn, E. R. and Boothroyd, J. C. 1992. Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics* **132**: 1003-1015.
- Sibley, L. D. 1993. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells. *Semin. in Cell Biol.* **4**: 335-344.
- Sibley, D. L. , Niesman, I. R. , Asai, T. and Takeuchi, T. 1994. *Toxoplasma gondii*: Secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* **79**: 301- 311.
- Sibley, L. D. 1995. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol.* **5**: 129-132.
- Sibley, L. D. , Niesman, I. R. , Parmley, S. F. and Cesbron-Delauw, M. F. 1995. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cells vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Science* **108**: 1669-1677.
- Sibley, L. D. , Hakansson, S. and Carruthers, V. B. 1998. Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr. Biol.* **8**: R12-R14.
- Siddall, M. E. 1992. Hohlzylinder. *Parasitol. Today* **8**: 90- 91.
- Silva, N. M. , Gazzinelli, R. T. , Silva, D. A. O. , Ferro, E. A. V. , Kasper, L. H. and Mineo, J. R. 1998. Expression of *Toxoplasma gondii*- specific heat shock protein 70 during *in vivo* conversion of bradyzoites to tachyzoites. *Infect. Immun.* **66**: 3959- 3963.
- Sinai, A. P. , Webster, P. and Joiner, K. A. 1997. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J. Cell Science* **110**: 2117- 2128.
- Sinai, A. P. and Joiner, K. A. 1999. Subversion of the host mitochondrial import machinery by the PVM localizing protein ROP2 as a mechanism of *T. gondii* PVM-mitochondrial association. Fifth Toxoplasmosis Conference, Marshall, California.
- Slomianny, C. and Prensier, G. 1986. Application of the serial sectioning and tridimensional reconstruction techniques to the morphological study of the *Plasmodium falciparum* mitochondrion. *J. Parasitol.* **72**: 595-598.

- Soète, M. , Fortier, B. , Camus, D. and Dubremetz, J.-F.** 1993. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **76**: 259- 264.
- Soète, M. , Camus, D. and Dubremetz, J.-F.** 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii in vitro*. *Exp. Parasitol.* **78**: 361- 370.
- Soète, M. and Dubremetz, J.-F.** 1996. During tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*, p. 76-80. In Gross, U. (ed.), Current Topics in Microbiology and Immunology: *Toxoplasma gondii*, Springer, Heidelberg, Germany.
- Soldati, D. and Boothroyd, J. C.** 1993. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* **260**: 349- 352.
- Soldati, D. and Boothroyd, J. C.** 1995. A selector of transcription initiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 87- 93.
- Soldati, D. , Kim, K. , Kampmeier, J. , Dubremetz, J.-F. and Boothroyd, J. C.** 1995. Complementation of a *Toxoplasma gondii* ROP1 knock-out mutant using phleomycin selection. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**: 87-97.
- Splendore, A.** 1909. Sur un nouveau parasite du lapin. Deuxième note préliminaire. *Bull. Soc. Path. Exot.* **2**: 462-465.
- Srivasta, I. K. , Rottenberg, H. and Vaidya, A. B.** 1997. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J. Biol. Chem.* **272**: 3961- 3966.
- Stern, D. B. and Lonsdale, D. M.** 1982. Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12- kilobase DNA sequence in common. *Nature* **299**: 698- 702.
- Stokkermans, T. J. W. , Schwartzman, J. D. , Keenan, K. , Morrissette, N. S. , Tilney, L. G. and Roos, D. S.** 1996. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. *Exp. Parasitol.* **84**: 355- 370.
- Stommel, E. W. , Ely, K. H. , Schwartzman, J. D. and Kasper, L. H.** 1997. *Toxoplasma gondii*: Dithiol-induced Ca²⁺ flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* **87**: 88-97.
- Strath, M. , Scott-Finnigan, T. , Gardner, M. , Williamson, D. and Wilson, I.** 1993. Antimalarial activity of rifampicin *in vitro* and in rodent models. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 211-216.
- Striepen, B. , He, C. Y. , Soldati, D. and Roos, D. S.** 1998. Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**: 325-338.

- Sullivan, M. A. , Olson, C. L. , Winqvist, A. G. and Engman, D. M.** 1994. Expression and localization of *Trypanosoma cruzi* hsp60. *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**: 197- 208.
- Suplick, K. , Akella, R. , Saul, A. and Vaidya, A. B.** 1988. Molecular cloning and partial sequence of a 5.8 kilobase pair repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**: 289-290.
- Suplick, K. , Morrissey, J. and Vaidya, A. B.** 1990. Complex transcription from the extrachromosomal DNA encoding mitochondrial functions of *Plasmodium yoelii*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6381- 6388.
- Suss-Toby, L. , Zimmerberg, J. and Ward, G. E.** 1996. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1996**: .
- Suzuki, Y. and Remington, J. S.** 1993. Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment, In "48th forum in immunology". *Res. Immunol.* **144**: 66-67.
- Syin, C. and Goldman, N. D.** 1996. Cloning of a *Plasmodium falciparum* gene related to the human 60-kDa heat shock protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**: 13- 19.
- Tanabe, K. and Murakami, K.** 1984. Reduction in the mitochondrial membrane potential of *Toxoplasma gondii* after invasion of host cells. *J. Cell Science* **70**: 73- 81.
- Taniguchi, H. , Aramaki, H. , Nikaido, Y. , Mizuguchi, Y. , Nakamura, M. , Koga, T. and Yoshida, S.** 1996. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Letters* **144**: 103-108.
- Taylor, M. and Feyereisen, R.** 1996. Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 719-734.
- Thulliez, P.** 1993. Toxoplasmose et grossesse. *Med. Mal. Infect.* **23**: 170-75.
- Tomavo, S. , Schwarz, R. T. and Dubremetz, J.-F.** 1989. Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4576- 4580.
- Tomavo, S. , Fortier, B. , Soete, M. , Ansel, C. , Camus, D. and Dubremetz, J.-F.** 1991. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **59**: 3750- 3753.
- Tomavo, S. and Boothroyd, J. C.** 1995. Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Intern. J. Parasitol.* **25**: 1293- 1299.

- Tomavo, S.** 1996. The major surface antigens of *Toxoplasma gondii*: structures and functions, p. 45-54. In Gross, U. (ed.), Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer, Heidelberg, Germany.
- Torres, R. , Weinberg, W. , Stansell, J. , Leoung, G. , Kovacs, J. , Rogers, M. and Scott, J.** 1993. Multicenter trial of atovaquone (ATQ) for salvage treatment and suppression of toxoplasmic encephalitis (TE). J. Ninth international conference on AIDS, ed. (Berlin, Germany).
- Towbin, H. , Staehelin, T. and Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 4350-4354.
- Trumpower, B. L.** 1990a. Cytochrome *bcl* complexes of microorganisms. *Microbiol. Rev.* **54**: 101-129.
- Trumpower, B. L.** 1990b. The protonmotive Q cycle. *J. Biol. Chem.* **265**: 11409-11412.
- Turrens, J. F.** 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports* **17**: 3-8.
- Ullman, B. and Carter, D.** 1995. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase as a therapeutic target in protozoal infections. *Infect. Agents Dis.* **4**: 29-40.
- Vaidya, A. B. , Akella, R. and Suplick, K.** 1989. Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6- kilobase- pair DNA of a malarial parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* **35**: 97- 108.
- Vaidya, A. B. and Arasu, P.** 1987. Tandemly arranged gene clusters of malarial parasites that are highly conserved and transcribed. *Mol. Biochem. Parasitol.* **22**: 249-257.
- Vaidya, A. B. , Lashgari, M. S. , Pologe, L. G. and Morrissey, J.** 1993. Structural feature of *Plasmodium* cytochrome b that may underlie susceptibility to 8- aminoquinolines and hydroxynaphtoquinones. *Mol. Biochem. Parasitol* **58**: 33- 42.
- Vercesi, A. E. , Rodrigues, C. O. , Uyemura, S. A. , Zhong, L. and Moreno, S. N. J.** 1998. Respiration and oxidative phosphorylation in the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **273**: 31040-31047.
- Vierling, E.** 1991. The roles of Heat Shock Proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology* **42**: 579- 620.
- Vivier, E. and Petitprez, A.** 1969. Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* **43**: 329-342.
- Von Heijne, G. , Steppuhn, J. and Herrmann, R. G.** 1989. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**: 535- 545.

- vonJagow, G. and Link, T. A. 1986. Use of specific inhibitors on the mitochondrial *bc1* complex. *Methods Enzymol.* **126**: 253-271.
- Waller, R. F. , Keeling, P. J. , Donald, R. G. K. , Striepen, B. , Handman, E. , Lang-Unnasch, N. , Cowman, A. F. , Besra, G. S. , Roos, D. S. and McFadden, G. 1998. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **95**: 12352- 12357.
- Wan, K.-L. , Blackwell, J. M. and Ajioka, J. W. 1996. *Toxoplasma gondii* expressed sequence tags: insight into tachyzoite gene expression. *Mol. Biochem. Parasitol.* **75**: 179- 186.
- Weber, G. 1978. Atypical mitochondria in an intracellular protozoan (*Theileria annulata*, Apicomplexa). *Naturwissenschaften* **65**: 601-602.
- Weil, J. H. (Masson ed.). 1987. Biochimie Générale, Paris.
- Weiss, L. M. , Fen Ma, Y. , Takvorian, P. M. , Tanowitz, H. B. and Wittner, M. 1998. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. *Infect. Immun.* **66**: 3295- 3302.
- Weiss, L. M. , Laplace, D. , Tanowitz, H. B. and Wittner, M. 1992. Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoites-specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* **166**: 213-215.
- Weiss, L. M. , Laplace, D. , Takvorian, P. , Tanowitz, H. B. and Wittner, M. 1996. The association of the stress response and *Toxoplasma gondii* bradyzoite development. *J. Euk. Microbiol.* **43**: 120S.
- Weissig, V. and Rowe, T. C. 1999. Analysis of *Plasmodium falciparum* mitochondrial six-kilobase DNA by pulse-field electrophoresis. *J. Parasitol.* **85**: 386-389.
- Werk, R. 1985. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev. Infect. Dis.* **7**: 449-457.
- Williamson, D. H. , Wilson, R. J. M. , Bates, P. A. , McCready, S. , Perler, F. and Qiang, B.-O. 1985. Nuclear and mitochondrial DNA of the primate malarial *Plasmodium knowlesi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **14**: 199- 209.
- Wilson, C. M. , Serrano, A. E. , Wasley, A. , Bogenschutz, M. P. , Shankar, A. H. and Wirth, D. F. 1989. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science* **244**: 1184-1186.
- Wilson, I. , Gardner, M. , Rangachari, K. and Williamson, D. 1993. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa, p. 51-60. In Smith, J. E. (ed.), *Toxoplasmosis*, vol. H78, Berlin: Springer-Verlag.
- Wilson, C. M. , Smith, A. B. and Baylon, R. V. 1996a. Erratum to Characterization of the δ -aminolevulinate synthase gene homologue in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **79**: 135-140.

- Wilson, R. J. M. , Denny, P. W. , Preiser, P. R. , Rangachari, K. , Roberts, K. , Roy, A. , Whyte, A. , Strath, M. , Moore, D. J. , Moore, P. W. and Williamson, D. H.** 1996b. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* **261**: 155- 172.
- Wilson, R. J. M. and Williamson, D. H.** 1997. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 1- 16.
- Windeck, T. and Gross, U.** 1996. *Toxoplasma gondii* strain-specific transcript levels of *SAG1* and their association with virulence. *Parasitol. Res.* **82**: 715-719.
- Wong, S. Y. and Remington, J. S.** 1993. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* **7**: 299-316.
- Yahiaoui, B. , Dzierszinski, F. , Slommianny, C. , Camus, D. and Tomavo, S.** 1999. Isolation and characterization of a subtractive enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**: 223-235.
- Yang, S. and Parmley, S.** 1995. A bradyzoite stage- specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**: 291- 294.
- Yang, S. and Parmley, S. F.** 1997. *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts. *Gene* **184**: 1- 12.
- Zeilstra- Ryalls, J. , Fayet, O. and Georgopoulos, C.** 1991. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 301- 325.
- Zhang, Y. W. and Smith, J. E.** 1995. *Toxoplasma gondii*: identification and characterization of a cyst molecule. *Exp. Parasitol.* **80**: 228- 233.
- Zhang, Y. , Kim, K. , Ma, Y. F. , Wittner, M. , Tanowitz, H. B. and Weiss, L. M.** 1999. Disruption of the *Toxoplasma gondii* bradyzoite-specific gene BAG1 decreases *in vivo* cyst formation. *Mol. Microbiol.* **31**: 691-701.

