Barra 629 the

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 à l'université de Lille I par

Béatrice Rauscher

Contribution à l'étude de la fonction et du trafic des protéines de granules denses, GRA5 et GRA6, de Toxoplasma gondii



Présentée le 28 juin 1999 devant la commission d'examen :

Membres du jury :

Président : Professeur R. Cacan

Rapporteurs : Docteur C. Dissous Docteur G. Langsley

Examinateurs : Docteur M. F. Cesbron-Delauw Docteur S. Tomavo A la mémoire de mon arrière grand-père, De mes grands-parents.

Je dédie cette thèse à mes parents, à ma famille, en témoignage de ma profonde affection.

"On ne voit bien qu'avec le cœur" Antoine de Saint-Exupéry. (Le petit prince)

"Connaître, ce n'est point démontrer, ni expliquer. C'est accéder à la vision. Mais, pour voir, il convient d'abord de participer. Cela est dur apprentissage...." Antoine de Saint-Exupéry. (Chap 7. Terre des hommes). Je tiens à exprimer mes vifs remerciements :

A Madame Marie-France Cesbron-Delauw de m'avoir accueillie avec bienveillance au sein de son laboratoire. Vos compétences scientifiques et votre enthousiasme ont permis d'enrichir ce travail de thèse. Je vous remercie pour votre soutien et votre disponibilité qui m'ont permis de mener à bien ce travail,

A Monsieur René Cacan d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance de thèse. Je vous en remercie,

A Madame Colette Dissous, j'exprime mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail,

A Monsieur Gordon Langsley, vous me faîtes l'honneur de bien vouloir juger ce travail. Soyez assuré de ma profonde gratitude,

A Monsieur Stanislas Tomavo, merci d'avoir accepté avec enthousiasme d'examiner ce travail,

A Monsieur Ralph Schwarz, j'exprime toute ma reconnaissance de m'avoir accueillie pendant neuf mois au sein de son laboratoire à Marburg. Ich danke Ihnen gerzlich für Ihren Gruß,

A Monsieur Jean-François Dubremetz, je le remercie pour ses conseils et ses encouragements,

A Laurence Lecordier qui m'a guidée avec beaucoup de patience et de compétences afin de m'initier à la biologie moléculaire. Je lui suis profondément reconnaissante pour ses précieux conseils et sa disponibilité,

A Corinne Mercier pour sa disponibilité et pour son engagement scientifique, je tiens à la remercier vivement pour ces excellentes conditions de travail pour mener à bien ce travail,

A Sophie Lefebvre-Van Hende, pour sa grande gentillesse et son dynamisme, pour son aide fort appréciable tout au long de cette thèse. Je la remercie pour tous ces instants complices,

A Marie-Pierre Fourmaux et Monsieur Deslée pour leurs compétences techniques et pour leurs conseils dont j'ai pu bénéficier,

A Catherine Lemaire, Claudie Verwaerde, Phil Sutton et tous les membres des groupes "toxoplasmose" pour leur collaboration amicale,

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'aboutissement de ce travail et plus particulièrement mes amis pour leur compréhension et leur soutien, les Dames de laveries pour leur gentillesse, les personnels de la bibliothèque et de la production des parasites, les thésards français (scientifiques et historiens), allemands pour leur soutien.

Ce travail a été réalisé à : l'Institut Pasteur de Lille dans l'Unité "Bases moléculaires de la Pathogenèse des Sporozoaires" sous la direction du Docteur Marie-France Cesbron-Delauw.

Université des Sciences et Technologies de Lille Flandres-Artois

Contribution à l'étude de la fonction et du trafic des protéines de granules denses, GRA5 et GRA6, de *Toxoplasma gondii* Béatrice Rauscher

Le parasite protozoaire *Toxoplasma gondii* assure son développement intracellulaire dans une vacuole dite parasitophore. La vacuole parasitophore (VP) est un compartiment spécialisé qui d'une part résiste à la fusion avec les endosomes de la cellule-hôte et d'autre part constitue une interface d'échanges métaboliques entre le parasite et la cellule parasitée. Les protéines GRA, contenues dans les granules denses du parasite, sont sécrétées sous forme soluble dans la VP où elles acquièrent une topologie membranaire. Constituants majeurs de la VP, les protéines GRA joueraient un rôle déterminant dans le développement intracellulaire du toxoplasme, cependant à ce jour la fonction de ces protéines n'est pas connue.

Les protéines GRA5 et GRA6 ont été choisies comme modèles d'étude car bien que présentant des similitudes structurales (deux domaines hydrophobes encadrés de régions hydrophiles), elles présentent un tropisme membranaire différentiel au sein de la vacuole parasitophore. La protéine GRA5 traverse la bicouche lipidique de membrane délimitante de la vacuole parasitophore alors que la protéine GRA6, s'intègre dans les membranes du réseau intravacuolaire.

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence l'existence d'un polymorphisme de taille des protéines GRA5 et GRA6 chez différentes souches de toxoplasmes. Ce polymorphisme permet de répertorier les souches parasitaires dans les trois groupes génotypiques de *Toxoplasma gondii*.

Dans un second temps, le développement de la manipulation génétique du toxoplasme, nous a permis d'aborder la fonction de la protéine GRA5 par l'invalidation de son gène. La mise en place d'un système de double sélection "positive-négative" a permis l'obtention d'un mutant nul GRA5⁻ dans la souche RH. L'analyse du phénotype du mutant nul a mis en évidence que la protéine GRA5 est une protéine non essentielle pour les toxoplasmes de la souche RH. De plus, l'absence de son expression ne perturbe ni l'ultrastructure de la vacuole parasitophore, ni la virulence chez la souris, ni la multiplication intracellulaire du toxoplasme.

Enfin, dans le cadre des études sur les mécanismes d'insertion membranaire post-sécrétoire des protéines GRA, la troisième partie de ce travail visait à appréhender l'étude du tropisme différentiel de GRA5 et GRA6 pour les membranes vacuolaires, par l'expression de protéines chimériques (GRA5-GRA6). Des lignées stables de toxoplasmes exprimant les protéines hybrides (échange des domaines N- et C- terminaux) fusionnées à leur extrémité C-terminale avec l'épitope du virus de l'influenza ont été obtenues. Les protéines chimériques N5T5C6-HA9, N6T5C5-HA9 et N6T5C6-HA9 se comportent comme des protéines membranaires dans la VP. L'analyse de leur trafic intravacuolaire, 10 minutes après l'invasion cellulaire, a révélé que seule, la protéine N6T5C6-HA9 se comporte comme GRA6 en transitant par la partie postérieure du parasite. Les protéines N5T5C6-HA9, N6T5C5-HA9 semblent se comporter comme la protéine GRA5. Ces résultats suggèrent l'intervention des domaines N-et C-terminaux de GRA6 lors de son accumulation postérieure dans la VP.

PUBLICATIONS

ARTICLES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse donnent lieu à la préparation des publications suivantes:

- 1. **B. Rauscher**, L. Lecordier, D. Deslée, U. Gross and M.-F. Cesbron-Delauw. Size polymorphism of the dense granule proteins GRA5 and GRA6 is correlated *with Toxoplasma gondii*'s genotype and pathogenicity (en préparation).
- 2. B. Rauscher, C. Mercier, L. Lecordier, D. Deslée and M-F Cesbron-Delauw. Targeted disruption of the *Toxoplasma gondii GRA5* gene does not prevent *in vivo* or *in vitro* development of tachyzoites from the RH strain (en préparation).

D'autre part, au cours d'un stage de 9 mois (avril-décembre 1999) effectué à l'Université de Marburg dans le laboratoire du Pr. R.T. Schwarz j'ai pu mettre en évidence la présence de sphyngolipides dans les formes tachyzoites de *Toxoplasma gondii*.

3. **B. Rauscher**, P. Gerold and R.T. Schwarz. Identification and detection of sphyngolipid components in tachyzoites of *Toxoplasma gondii* (en préparation).

COMMUNICATIONS

- 1. **B. Rauscher**, L. Lecordier, D. Deslée, U. Gross and M.-F. Cesbron-Delauw*. Etude du polymorphisme des gènes *GRA5* et *GRA6* chez *Toxoplasma gondii*. Journée des jeunes chercheurs. Institut Pasteur de Lille, octobre 1995.
- 2. **B. Rauscher**, L. Lecordier, D. Deslée, U. Gross and M.-F. Cesbron-Delauw^{*}. Size polymorphism of the dense granule proteins GRA5 and GRA6 is correlated with Toxoplasma gondii's genotype and pathogenicity. 4th Biennal International conference on Toxoplasmosis. Drymen, Ecosse, juillet 1996.

ABREVIATIONS

a.a. : acide aminé

ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AES : Antigène d'Excrétion Sécrétion

Amp : Ampicilline

a.n. : acide nucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

 β -gal : β -galactosidase

CAT : Chloramphénicol acétyl transférase

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPRG : Chloro red β -D-galactopyranoside

CSP : Circumsporozoite protein

D10 : DMEM contenant 10 % de sérum de veau foetal

dATP : 2' désoxyadénosine 5' triphosphate

dCTP : 2' désoxycytidine 5' triphosphate

dGTP: 2' désoxyguanosine 5' triphosphate

dTTP: 2' désoxythymidine 5' triphosphate

DHFR-TS : dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase

DMEM : Dulbecco Minimum Essential Medium

DTT : Di thio thréitol

ECL : Enhanced chimio luminescence

EDTA : Acide ethylène diamine tétraacétique

EGF : Epidermal growth factor

FITC : Fluoresceine iso-thio-cyanate

GPI : Glycosyl phosphatidyl inositol

GRA : protéines de granules denses

GSH : Gluthation-SH-transférase

GSF : sérum de chèvre foetal

HepII : cellules hépithéliales humaines

HFF : Human foreskin fibroblast

HSP : Heat Shock Protein

HXGPRT : Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoryltransferase

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IMP : Inosine monophosphate

IPTG : Isopropyl-1- thio- β -D-galactopyranoside

kb : kilobases

kDa : kiloDalton

LAK : Lymphokine activated killer

LB : Luria broth base

LDH : Lactate deshydrogenase

MIC : protéines de micronèmes

min. : minute

MUG : 4-méthylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside

NK : Neutral killer

NTPase : nucléoside triphosphate hydrolase

ORF : Open reading frame (Cadre de lecture ouvert)

P⁻ : promoteur délété

pb : paire de bases

PBS : Phosphate buffered saline (Tampon phosphate salin)

PCR : Polymerase chain reaction (Réaction d'amplification en chaîne)

PEF : Penetration enhancing factor

PM : Poids moléculaire

p.s. : peptide signal

RAPD : random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (amplification génomique aléatoire)

RFLP : Restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction)

ROP : protéines de rhoptries

SAG : protéines de surface

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS)

sec. : seconde

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SVF : Sérum de veau foetal

TNF : Tumor necrosis factor

TRAP : Thrombospondin related adhesive protein

TUB : Tubuline

UMP : uridine 5'-monophosphate

UPRT : uracil phosphoribosyltransferase

UT : Untranslated (non traduit)

VIH : Virus d'immunodéficience humaine

XMP : Xanthine monophosphate

X-gal : 5-Bromo-4-Chloro-3-indol-β-D-galactopyranoside

Code des acides aminés

A	Ala	Alanine
С	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
Μ	Met	Méthionine
Ν	Asn	Asparagine
Р	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
Т	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

<u>aa hydrophobes</u>: A (Ala); V (Val) ; L (Leu) ; I (Ile) ; P (Pro) ; F (Phe) ; M (Met) ; C (Cys) ; G (Gly) ; W (Trp)

aa neutres et hydophiles : N (Asn) ; Q (Gln) ; S (Ser) ; T (Thr) ; Y (Tyr)

aa basiques : R (Arg) ; K(Lys) ; H (His)

aa acides : D (Asp) ; E (Glu)

Sommaire

SOMMAIRE

INTRODUCTION		
I – Généralités	1	
1) Historique	1	
2) Le cycle évolutif	2	
A) Cycle sexué	3	
B) Cycle asexué	4	
II - Structure et biologie du toxoplasme	6	
1) Le zoïte	6	
A) Ultrastructure	6	
B) Le complexe apical	7	
a) Le conoïde	7	
b) Les micronèmes	8	
c) Les rhoptries	8	
d) Les granules denses	9	
2) Le tachyzoïte	9	
A) L'invasion de la cellule-hôte	9	
a) L'attachement	10	
b) L'invasion	11	
c) La formation de la vacuole parasitophore	12	
d) La multiplication intracellulaire des parasites	14	
B) Structure moléculaire des tachyzoïtes	16	
a) Les molécules de surface	16	
b) Les molécules de sécrétion	19	
b.1) Les molécules de micronèmes	19	
b.2) Les molécules de rhoptries	20	
b.3) Les molécules de granules denses	22	
3) Bradyzoïte et kyste	24	
A) L'ultrastructure du kyste	24	
B) Les gènes spécifiques	25	
C) L'inter-conversion	27	
III - Génétique de T. gondii	29	
1) L'organisation du génome	29	
2) L'ARN	30	
3) Les promoteurs	30	
4) La manipulation génétique	31	
A) La transfection transitoire	31	
B) La tranfection stable	32	
a) Les marqueurs de sélection	32	
a. 1) Les gènes de résistance à des antibiotiques	32	
a.2) Les gènes des voies métaboliques	32	
b) Applications	34	
b. 1) L'inactivation de gène	34	
b.2) Etude de la régulation des gènes	35	
b.3) Etude du trafic et/ou de l'adressage des protéines	36	

IV - La pathogenèse	37	
1) La toxoplasmose	37	
A) Mode de contamination		
B) La toxoplasmose congénitale		
C) La toxoplasmose de l'immunodéprimé	41	
a) Cas des malades du SIDA	41	
h) Cas des transplantés et des oreffés		
2) Facteurs influencant la nathogénie		
A) Facteurs liés à l'hôte		
a) Facteurs génétiques		
h) Statut immunitaire		
h 1) L'immunité humorale	44	
h 2) L'immunité cellulaire	45	
B) Facteurs liés au parasite	48	
a) Chez la souris	48	
b) Chez l'homme	50	
of enez i nonmie	50	
CONTEXTE DES TRAVAUX	52	
OBJECTIFS DES TRAVAUX	54	
RESULTATS	55	
I - Etude du polymorphisme des protéines de granules denses		
GRA5 et GRA6 de différentes souches de toxoplasmes	55	
1) Analyse du génotype des souches	55	
2) Analyse du polymorphisme des protéines	56	
3) Analyse du polymorphisme des proteines		
A) Clonage et séquencage des gènes <i>GRA5</i> et <i>GRA6</i> de différentes souches	57	
B) Analyse des séguences	58	
a) Gène $GRA5$	58	
b) Gène <i>GRA6</i>	60	
4) Expression des protéines GRA5 et GRA6		
A) Expression "ex vivo"	62	
a) Constructions GRA5HA9 et GRA6HA9	62	
b) Expression transitoire dans les toxoplasmes	63	
B) Expression <i>in vitro</i>	63	
5) Expression des protéines GRA5 et GRA6 mutées	64	
A) Mutagenèse des gènes $GRA5$ et $GRA6$	64	
B) Expression par le toxoplasme	65	
II Utilization de la génétique inverse neur l'étude des protéines CDA	60	
11 - Ounsation de la generique inverse pour l'étude des proteines GNA	08	
1) Determination du nombre de copies des genes		
2) Constructions et strategies		
A) Selection positive		
a) Strategie des grandes regions flanquantes		
a. 1) Construction GRAS	70	
a. 2) Construction GRA6	/1	
a. 3) Kecherche des clones recombinants	/ 1	

b) Stratégie du "piège à promoteur"	72
B) Stratégie de la double sélection	74
a) Construction GRA5/CAT/HXGPRT	75
b) Recherche des clones recombinants	75
c) Restauration de l'expression de GRA5 par complémentation	76
3) Caractérisation du mutant nul GRA5	77
A) Ultrastructure de la vacuole parasitophore	77
B) Virulence chez la souris	77
C) Croissance in vitro	78
D) Comportement des autres protéines GRA	79
a) Expression des protéines GRA	79
c) Distribution des proteines GRA dans la vacuole parasitophore	80
III - Contribution à l'étude du ciblage différentiel des protéines	
GRA5 et GRA6 dans la vacuole parasitophore	82
1) Réalisation des constructions chimériques-HA9	83
2) Obtention de lignées stables de toxoplasmes	84
3) Solubilité des protéines GRA dans les granules denses	85
4) Distribution des protéines de fusion dans la vacuole	86
DISCUSSION	88
I - Etude du polymorphisme des protéines de granules denses	
GRA5 et GRA6 de différentes souches de toxonlasmes	89
1) Similarité du comportement électrophorétique des protéines	•••
GRA5 et GRA6 entre les trois groupes	90
2) Marqueurs prédictifs de la nathogenèse	93
A) Marqueurs génétiques	94
B) Marqueurs antigéniques	95
II - Utilisation de la génétique inverse pour l'étude	
des protéines GRA	97
1) Obtention et Caractérisation du mutant nul GRA5	97
2) Caractárisation d'autres mutants nuls chez T gondii	08
3) Exploitation du mutant nul GRA5	100
4) Conclusions	102
III - Contribution à l'étude du ciblege différentiel	
des motémes CDA5 et CDA6 dans le menuel menuel	104
1) A nolves du compositement de matérice chimère	104
1) Analyse au comportement de proteines chimeres 2) Eastaurs influencent l'association des protéines avec les membranes	104
3) Conclusions	105
	_
CUNCLUSION	108

•

Introduction

I - Généralités

1) Historique

C'est en 1908, à l'institut Pasteur de Tunis, que Nicolle et Manceaux isolaient les premiers *Toxoplasma gondii* chez un rongeur nord africain, modèle expérimental de la leishmaniose, le gondi (Nicolle et Manceaux, 1908).

Ce nouveau protozoaire se distingue du *Pyroplasma quadrigeminum*, parasite infestant le gondi par sa forme différente, son noyau, son mode de division par bipartition, son habitat intracellulaire et les lésions qu'il provoque. Il semble pourtant présenter de grandes analogies avec les leishmania et ces auteurs le nomment, à titre provisoire, *Leishmania gondii*. Cependant, un an plus tard, des études complémentaires permettent de le différencier des leishmania par l'absence de centrosome et son inaptitude à pousser en milieu acellulaire. Ce nouveau parasite, plus éloigné des trypanosomes que des leishmania, appartient donc à un genre non décrit jusque là. A cause de sa forme arquée (arc en grec = "toxon"), il est alors nommé *Toxoplasma gondii* (Nicolle et Manceaux, 1909).

La même année, au Brésil, Splendore l'observait également chez un lapin (Splendore, 1909). Les mêmes ressemblances avec les leismania sont constatées, mais après comparaison avec le parasite tunisien, Splendore observe, en dehors de la bipartition, un mode de multiplication endogène. Il décide de le nommer *Toxoplasma cuniculi* (Splendore, 1909).

Par la suite, il s'est avéré que ces deux parasites étaient identiques (Nicolle et Manceaux, 1909). Il n'existe jusqu'à présent qu'une seule espèce : *Toxoplasma gondii*.

Depuis sa découverte en 1908, *Toxoplasma gondii* fut observé chez de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux, mais ce n'est qu'en 1923, qu'un ophtalmologue tchécoslovaque, Janku, décelait le premier cas de toxoplasmose humaine avec la présence d'organismes kystiques dans la rétine d'un enfant (Janku, 1923). La toxoplasmose allait dès lors susciter un vif intérêt, et les travaux concernant cette parasitose allaient se multiplier. Ce sont notamment ceux de Sabin, en 1939, qui mettent en évidence l'existence d'une seule et même espèce: *Toxoplasma gondii* (Sabin, 1941).

La place exacte de *Toxoplasma gondii* dans l'échelle zoologique fut longtemps discutée. En 1980, dans la classification proposée par Levine (Levine et al., 1980),

Toxoplasma gondii se trouve aux côtés d'autres parasites protozoaires, tels que Cryptosporidium, Plasmodium, Sarcocystis, Eimeria, Isospora, Hammondia et Besnoitia. Toxoplasma gondii est alors classé dans le phylum des Apicomplexa, la classe des Sporozoea, la sous-classe des Coccidia, l'ordre des Eucoccidia, le sous-ordre des Eimeriina et la famille des Eimeriidae (Rondanelli and Scaglia, 1993).

Classification taxonomique de T. gondii :

Règne	Animalia
Sous-règne	Protozoa
Phylum	Apicomplexa
Classe	Sporozoea
Sous-classe	Coccidia
Super-ordre	eucoccidea
Ordre	eucoccidida
Sous-ordre	eimeriina
Famille	eimeriidae
Genre	Toxoplasma
Espèce	Toxoplasma gondii

Les connaissances cliniques, immunologiques et anatomopathologiques sont complétées en prouvant le rôle important du **chat** (et plus généralement des félidés) en tant qu'unique **hôte définitif**. D'ailleurs, en 1970, les découvertes simultanées des équipes d'Hutchison et Work, d'une part (Hutchison, 1965), et de Frenkel et Dubey, d'autre part définissent le cycle biologique de ce parasite (Frenkel *et al.*, 1969).

2) Le cycle évolutif

T. gondii est un **parasite intracellulaire obligatoire**. Son cycle évolutif se déroule différemment en fonction de l'hôte infesté (Joyner, 1982 ; Dubey. and Beattie, 1988). En effet, ce parasite est capable d'infester une grande variété d'hôtes intermédiaires (tous les homéothermes: oiseaux, mammifères y compris l'homme) chez lesquels un cycle évolutif incomplet (phase asexuée ou schizogonique) se produit. Par contre, chez l'hôte définitif, *T. gondii* produit un cycle évolutif complet (phase sexuée ou sporogonique et phase asexuée). Le cycle évolutif parasitaire a été établi après les travaux réalisés par Frenkel (Frenkel *et al.*, 1970).

A) Cycle sexué (figure 1)

L'hôte définitif s'infeste après l'ingestion d'oocystes matures souillant la terre ou les herbes, ou le plus souvent par carnivorisme en dévorant des petits rongeurs, des oiseaux parasités par des kystes (Frenkel *et al.*, 1970).

La paroi des oocystes ou des kystes est digérée dans l'estomac et dans le petit intestin libérant ainsi les **sporozoïtes** ou les **bradyzoïtes** qui vont alors pénétrer dans l'épithélium intestinal du chat (Chobotar and Scholtyseck, 1982). Dans l'intestin de l'animal, les sporozoïtes ou les bradyzoïtes vont se transformer en trophozoïtes et plus tard en schizontes. Ces derniers vont libérer des mérozoïtes capables de réinfester les cellules de l'épithélium intestinal provoquant, soit un nouveau cycle asexuel par dissémination du parasite dans le tube digestif de l'hôte, soit l'initiation du cycle sexuel par la production de **microgamètes** mâles et de **macrogamètes** femelles. La fécondation des macrogamètes par les microgamètes donne naissance à des **oocystes immatures** qui sont libérés dans la lumière intestinale, puis éliminés dans l'environnement par millions chaque jour avec les fèces du chat. Ces oocystes apparaissent environ 4, 9 et 22 jours après l'ingestion par le chat d'oocystes, de bradyzoïtes ou de tachyzoïtes respectivement (Frenkel *et al.* 1970). Après une courte étape de maturation (sporulation) dans le milieu extérieur (1 à 5 jours), chaque oocyste produit 8 sporozoïtes infestants qui sont très résistants en milieu humide, tant aux agents physiques ou chimiques qu'aux bactéries et champignons (Dubey, *et al.*, 1970).



Figure 1 : Cycle sexué de *Toxoplasma gondii* chez le chat (D'après Nicolas and Pestre-Alexandre, 1993).

B) Cycle asexué (figure 2)

Chez les hôtes intermédiaires, l'infestation se fait essentiellement par voie orale, après l'ingestion soit d'oocystes matures provenant d'aliments souillés, soit de kystes contenus dans les viandes peu ou pas cuites. Après digestion de leur paroi dans l'estomac et le petit intestin, les formes parasitaires infestantes sporozoïtes ou bradyzoïtes sont libérées et vont très vite se différencier en tachyzoïtes. Les tachyzoïtes vont alors être disséminés dans l'organisme pendant la phase aiguë de la maladie par voie sanguine et lymphatique. Les tachyzoïtes sont capables d'infester toutes les cellules nucléées et gagnent les différents tissus tels que les muscles et le névraxe. A l'intérieur des cellules, le parasite se multiplie par endodyogénie, processus au cours duquel deux cellules filles se forment à l'intérieur de la cellule mère (Vivier and Petitprez, 1969), puis la cellule hôte va être lysée en libérant les tachyzoïtes.

Cette courte phase proliférative est rapidement contrôlée par le système immunitaire de l'hôte et aboutit à la formation de kystes localisés dans des organes peu accessibles au système immunitaire (muscles, système nerveux central, yeux...) marquant la **phase chronique** de la maladie. Ces kystes vont alors persister pour le reste de la vie de l'hôte (les premiers kystes

contenant les bradyzoïtes sont observés 10 à 15 jours après l'ingestion d'oocystes). Ce cycle asexué peut également se produire chez les félidés.



<u>Figure 2</u>: Cycle évolutif *de Toxoplasma gondii* chez les hôtes intermédiaires (D'après Fortier and Ajana, 1993).



Figure 3 : Ultrastructure en microscopie électronique d'un tachyzoïte intracellulaire de *T. gondii* (D'après Dubey and Lindsay, 1993).

Le tachyzoïte est entouré d'un complexe membranaire. Les rhoptries (R) présentent un aspect glandulaire caractéristique du stade tachyzoïte. On observe également des granules denses (DG) d'aspect compact, des micronèmes peu nombreux (MI), une mitochondrie (MT), le conoïde (C) et le noyau (N).

II - Structure et biologie du toxoplasme

Toxoplasma gondii est un parasite à développement intracellulaire strict très répandu dans le règne animal. Il est capable d'infester virtuellement toutes les cellules nucléées. La contamination de l'hôte peut résulter de la transmission du parasite sous trois formes évolutives : le tachyzoïte (forme proliférative), le bradyzoïte (forme kystique) et le sporozoïte (forme sporulée). Chacun de ces stades possède une morphologie et une biologie particulières.

La cellule du zoïte de *T. gondii* à la forme d'un croissant ou d'un arc (toxon en grec) mesurant de 6 à 8 μ m de long et de 1 à 3 μ m de large. Dépourvu d'organes locomoteurs, il présente une extrémité antérieure effilée mobile contenant le complexe apical et une extrémité postérieure arrondie (Fortier and Dubremetz, 1993).

1) Le zoïte

A) Ultrastructure

Comme tous les sporozoaires, ce parasite est entouré d'un complexe tri-membranaire original de 60 nm d'épaisseur (figure 3) (Vivier and Petitprez, 1969, 1972).

La membrane la plus externe, le **plasmalemme** est recouverte d'une couche de glycoprotéines également appelée "cell-coat", elle délimite la totalité du parasite (Rabjeau *et al.*, 1997).

Les deux autres membranes qui constituent le **complexe membranaire interne** sont formées par la juxtaposition de vésicules aplaties. Le complexe membranaire interne est interrompu dans la partie médiane du parasite par un **micropore** correspondant à une invagination de la membrane externe et disparaît au niveau apical (Porchet and Torpier, 1977; Dubremetz and Torpier, 1978; Nichols *et al.*, 1994). Il pourrait correspondre à une région spécialisée du réticulum endoplasmique (de Melo, and de Souza, 1997).

Le zoïte est une cellule hautement différenciée. Il contient les organites cellulaires classiques de toute cellule eucaryote distribués dans la moitié postérieure du cytosol parasitaire, à savoir :

- un noyau sphérique mesurant de 1 à 2 μ m de diamètre contenant une dizaine de chromosomes ;

- un appareil de golgi situé au-dessus du noyau ;

- un réticulum endoplasmique et de nombreux ribosomes ;

- une mitochondrie unique et ramifiée ;

- des substances de réserve telles que des grains d'**amylopectine** non délimités par une membrane et des globules lipidiques (Vivier and Petitprez, 1972; Fortier and Dubremetz, 1993).

B) Le complexe apical

Dans son extrémité apicale, le tachyzoïte présente une structure caractéristique de tous les zoïtes des *Apicomplexa*, le complexe apical (Nichols and Chiappino, 1987). Ce complexe constitué d'organites impliquées dans l'invasion de la cellule-hôte comprend un **conoïde**, des **rhoptries**, des **micronèmes** et des **granules denses**.

a) Le conoïde (figure 4)

Le **conoïde** a la forme d'un cylindre légèrement conique constitué de filaments de 26 à 30 nm de long enroulés en spirale. Le conoïde est limité, en avant, par deux anneaux apicaux et en arrière, par deux anneaux polaires (Dubey *et al.*, 1998).

L'anneau polaire à la base du conoïde sert d'insertion à 22 microtubules disposés à intervalles réguliers. Ces microtubules forment une sorte de gaine légèrement spiralée responsable de l'architecture cellulaire. Ils s'étendent le long de la face cytoplasmique du complexe membranaire interne (Nichols and Chiappino, 1987). Le complexe membranaire interne s'appuie sur le cytosquelette microtubulaire constitué des tubulines α et β (50-55 kDa) (Nagel and Boothroyd, 1988) et participerait avec celui-ci au maintien de la forme et de la polarité du parasite (Morrissette *et al.*, 1997).



Figure 4 : Schéma de la partie antérieure du tachyzoïte : le conoïde (D'après Dubey *et al.*, 1998).

Les mouvements de torsion observés chez le toxoplasme pourraient être créés au niveau du conoïde par l'action des microtubules (Nichols and Chiappino, 1987). Le conoïde peut, en effet, adopter deux positions lui permettant, d'une part, de se rétracter dans la gaine de microtubules, ou d'autre part, de se pointer vers l'avant (Aikawa *et al.*, 1977). Le mouvement de relâchement du conoïde impliquerait l'intervention des filaments d'actine et serait déclenché par un efflux de calcium (Mondragon and Frixione, 1996).

b) Les micronèmes

Les **micronèmes** sont les plus petites structures localisées dans la partie apicale des *Apicomplexa*. Ils sont présents en nombre variable et ont l'aspect de courts bâtonnets (Dubremetz *et al.*, 1989 ; Entzeroth *et al.*, 1992). Ces organites denses aux électrons mesurent 300 à 600 nm de long et 50 à 90 nm de large et sont délimités par une membrane.

c) Les rhoptries

Décrits pour la première fois chez *T. gondii* en 1954 par Gustafon comme des toxonèmes, ces organites sont retrouvés chez tous les *Apicomplexa* (Sam-Yellowe, 1996.; Dubremetz *et al.*, 1989). Ils ont été appelés **rhoptries** (du grec "ropalon" : massue) en 1967

par Sénaud (Sénaud. 1967).

Ces organites ont la forme de massues allongées dans le sens antéro-postérieur d'une longueur de 1 à 4 μ m (Vivier and Petitprez, 1972). Les rhoptries sont délimitées par une membrane, elles présentent une extrémité antérieure allongée et effilée en forme de canal se prolongeant vers la partie apicale du parasite par un pédoncule traversant l'intérieur du conoïde. L'extrémité postérieure plus large parait spongieuse en microscopie électronique.

Le nombre et la composition biochimique des rhoptries varient en fonction de l'espèce parasitaire. *T. gondii* contient une dizaine de rhoptries localisées dans son tiers antérieur.

Ce sont des organites de sécrétion impliqués dans les premières étapes du processus d'invasion de la cellule-hôte. Ils délivrent leur contenu, au moment de l'invasion laissant derrière eux des organites vides, mais dont la forme et l'intégrité membranaire restent identiques (Nichols *et al.*, 1983 ; Joiner, 1991 ; Perkins, 1992).

d) Les granules denses

Les granules denses sont des organites cytoplasmiques sphériques de 200 nm de diamètre distribués de chaque côté du noyau. Ces granules denses caractéristiques des *Apicomplexa* présentent un contenu homogène et très dense aux électrons.

2) Le tachyzoïte

Le terme tachyzoïte remplace l'appellation "trophozoïte" précédemment utilisée. Le tachyzoïte est la forme proliférative (ou végétative) de *T. gondii*. Il est libéré à la suite de la destruction de la membrane des formes de résistance (kyste ou oocyste) et se propage dans l'organisme qu'il infecte. Cette courte phase de dissémination (ou phase aiguë) se caractérise, d'une part, par la reconnaissance puis la pénétration du parasite dans la cellule-hôte, et d'autre part, par sa multiplication rapide à l'intérieur de la cellule infectée.

A) L'invasion de la cellule-hôte

L'invasion dans la cellule-hôte est une étape importante pour la survie de ce parasite. Le parasite **pénètre activement** dans les cellules et se trouve rapidement isolé du cytoplasme de la cellule-hôte dans un compartiment intracellulaire spécialisé, la **vacuole parasitophore**, dans lequel il va se développer.

Contrairement aux autres protozoaires, le toxoplasme ne possède, ni flagelle, ni cils, et fait pourtant preuve d'une très grande mobilité. C'est grâce à des mouvements de **glissement** (King, 1988) et de **rotation** impliquant l'intervention de molécules d'actine et de myosine qu'il pourrait ainsi se rendre jusqu'à la membrane de la cellule. (Dobrowolski *et al.*, 1997a, 1997b)

a) L'attachement

L'invasion est précédée d'une étape de reconnaissance entre le parasite et la cellulehôte. Cette reconnaissance implique des interactions de ligands parasitaires de surface avec des récepteurs à la surface de la cellule-hôte. L'efficacité de l'attachement du parasite sur la cellule-hôte semble dépendre du niveau d'expression des récepteurs cellulaires. En effet, selon la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve, celle-ci ne présente pas la même attraction pour les parasites. Des expériences utilisant des cellules synchronisées ont révélé que l'efficacité d'attachement était maximale pendant la phase S du cycle (Grinwood *et al.*, 1996). Bien que les mécanismes d'attachement restent incertains, le rôle de certaines molécules parasitaires et cellulaires dans ces processus a été mis en évidence. Ces mécanismes impliquent des **protéines de la matrice extracellulaire**, des **lectines**, des **protéines de surface parasitaire** et des **protéines de micronèmes**.

Parmi les **protéines de la matrice extracellulaire**, le rôle de **la laminine et du collagène de type IV** a été démontré (Furtado *et al.*, 1992a). La laminine recouvrant les parasites, *via* sa liaison à des récepteurs parasitaires, servirait de ligand à des récepteurs de la laminine des cellules-hôtes. Différents récepteurs cellulaires, comme le récepteur exprimé par les macrophages murins (cellules J774) et le récepteur $\alpha 6/\beta 1$ de l'intégrine $\beta 1$ sur les fibroblastes humains, ont été identifiés (Furtado *et al.*, 1992a, b). La laminine est une protéine très abondante susceptible d'être reconnue par une grande variété de cellules, elle interviendrait pour établir un pontage entre le parasite et la cellule-hôte.

L'intervention de composés lectiniques dans les processus d'attachement est également suggérée. **Des lectines** présentes à la surface des parasites ont été mises en évidence grâce à l'affinité qu'elles possèdent pour les oligosaccharides. Ainsi, lorsque la sérum albumine bovine est couplée à la glucosamine, celle-ci se fixe à la surface parasitaire (Robert *et al.*, 1991). De plus, la fixation de ce complexe sérum albumine bovine-glucosamine à la surface des parasites est capable d'inhiber, par un mécanisme compétitif, l'invasion des toxoplasmes dans des cellules fibroblastiques. Le toxoplasme utiliserait des lectines ou des protéines apparentées aux lectines pour établir cette interaction hôte-parasite. La sécrétion de composés "lectine-like" contenus dans les rhoptries au moment de l'invasion suggère leur implication dans ces mécanismes de reconnaissance (de Carvalho *et al.*, 1991).

Les **protéines de surface** du toxoplasme, et plus particulièrement l'antigène majeur de surface, **SAG1** pour les tachyzoïtes, constituent des cibles privilégiées dans ces mécanismes d'attachement avec la cellule-hôte (Kasper and Kahn, 1993 ; Kasper and Mineo, 1994 ; Grimwood and Smith, 1995). En effet, une inhibition de l'infection de fibroblastes ou de cellules épithéliales a été observée lorsque les toxoplasmes sont incubés en présence de différents anticorps dirigés contre l'antigène SAG1 (Grimwood and Smith, 1992 ; Mineo *et al.*, 1993). De même, bien que les mutants déficients pour les protéines SAG1 (le mutant B) ou SAG3 soient toujours capables d'envahir les cellules, ceux-ci présentent une capacité limitée pour se lier aux cellules par rapport à la souche parentale (Tomavo, 1996). Ces protéines de surface n'interviendraient pas dans des fonctions vitales pour le parasite. La présence de plusieurs protéines de surface permettrait au parasite de présenter une large gamme de ligands capables d'interagir avec les récepteurs cellulaires. De même, ces protéines de surface pourraient également fournir des redondances permettant au parasite d'interagir avec une grande variété de cellules-hôtes.

L'implication des **protéines de micronèmes** au cours de ce processus d'attachement est depuis peu suspectée. En effet, la protéine MIC1 possède une affinité importante avec la surface des cellules-hôtes (Achbarou *et al.*, 1991a ; Fourmaux *et al.*, 1996a). D'ailleurs, des anticorps anti-MIC1 inhibent l'infection des cellules par les toxoplasmes (Grimwood and Smith, 1996). D'autres protéines de micronèmes comme les protéines MIC2 et MIC3 pourraient également être impliquées dans ces processus d'attachement du toxoplasme sur la cellule-hôte (Dobrowolski *et al.*, 1997b ; Sibley *et al.*, 1998).

b) L'invasion (figure 5)

L'invasion de la cellule-hôte est un phénomène différent de celui induit par la phagocytose. La pénétration du parasite dans la cellule-hôte est beaucoup plus rapide (30-40 secondes contre 2-4 minutes pour la phagocytose) (Moriaski *et al.*, 1995). De plus, ce processus d'invasion commun à tous les *Apicomplexa* est un phénomène actif (Dobrowolski and Sibley, 1996). Il implique une succession d'événements chronologiques conduisant à la formation de la jonction mobile, l'exocytose séquentielle des micronèmes, des rhoptries, et des granules denses et aboutissant à la formation et à la maturation de la vacuole parasitophore.

L'invasion est initiée à la suite de l'attachement du parasite à la surface de la cellulehôte. Le parasite se réoriente et présente son extrémité apicale à la cellule-hôte. Cette zone de contact provoque une dépression locale de la membrane plasmique de la cellule-hôte (Werk, 1985 ; Joiner, 1993). La membrane va alors se déformer en s'invaginant pour former un anneau appelé **jonction mobile** encerclant le parasite (Aikawa *et al.*, 1977). Une constriction



Tachyzoïte

Figure 5 : Représentation schématique des différentes étapes de l'invasion (D'après Dubremetz *et al.*, 1998).

Après une étape de reconnaissance de la cellule-hôte (A), les micronèmes du tachyzoïte sont sécrétées et la jonction mobile se forme. Le parasite prend appui sur cette jonction mobile et se glisse à l'intérieur de la cellule-hôte. Les molécules de rhoptries sont exocytées et la formation de la vacuole parasitophore est initiée. Le contenu des micronèmes couvre la surface du zoïte et s'accumule en arrière au fur et à mesure de la progression le long de la jonction mobile (B). La jonction mobile se referme en arrière du parasite. Le tachyzoïte se trouve alors isolé du cytoplasme de la cellule-hôte dans la vacuole parasitophore. Le contenu des granules denses est sécrété dans la vacuole et va contribuer à la maturation de ce compartiment (C).



<u>Figure 6</u>: Visualisation du réseau de tubules intravacuolaires, dans la vacuole parasitophore de cellules fibroblastiques infectées par *T. gondii* en microscopie électronique (Sibley *et al.*, 1995).

Les cellules infectées par *T. gondii* sont fixées 20 minutes après l'invasion du parasite. Le réseau intravacuolaire est formé à partir de vésicules multi-lamellaires sécrétées dans la partie postérieure du parasite (flèche). Cette sécrétion est accompagnée par une invagination transitoire de la partie postérieure du parasite (pointe de flèche).

<u>Légende</u> : pv : vacuole parasitophore, er : réticulum endoplasmique, m : mitochondrie, d : granule dense, c : conoïde.

du parasite peut apparaître lorsque celui-ci progresse au travers de cette zone de contact. En glissant le long de cette jonction mobile selon un axe antéro-postérieur, T. gondii forme une vacuole parasitophore qui l'entoure progressivement. La jonction mobile est une structure particulière qui pourrait exclure la diffusion des protéines transmembranaires de la cellulehôte vers la membrane de la vacuole parasitophore (de Carvalho and de Souza, 1989). L'orientation du parasite et son glissement dans la cellule-hôte au cours de ce processus impliquent l'intervention des composants de son cytosquelette (Nichols and Chiappino, 1987). Les molécules d'actine et de myosine constituant son cytosquelette participent à l'initiation de ces mouvements (Endo et al., 1988; Yasuda et al., 1988; Dobrowolski et al., 1997a, b; Dobrowolski and Sibley, 1996, 1997a), mais le mécanisme exact mis en place par T. gondii pour se glisser dans la cellule-hôte n'est pas identifié. Il pourrait être induit à la suite du déplacement de protéines exprimées à la surface du parasite le long d'un support solide. Afin d'utiliser l'énergie mécanique fournit par le moteur actine-myosine, ce processus impliquerait l'intervention de protéines parasitaires transmembranaires interagissant, d'une part avec le cytosquelette par leur domaine cytoplasmique, et d'autre part avec un récepteur cellulaire qui jouerait le rôle d'un support solide. Les protéines de micronèmes et notamment la protéine MIC2 semblent être de bons candidats (Dobrowolski et al., 1997a ; Dubremetz, 1998 ; Sibley et al., 1998). En effet, ces protéines possèdent dans leur séquence un domaine transmembranaire, un domaine cytoplasmique et des domaines extracellulaires potentiellement impliqués dans l'adhésion (Tomley et al., 1991 ; Wan et al., 1997). D'ailleurs, la sécrétion de ces protéines près du pôle apical du parasite semble se produire immédiatement avant l'invasion (Achbarou et al., 1991a ; Carruthers and Sibley, 1997). Au cours de l'invasion, ces protéines de micronèmes vont s'accumuler au fur et à mesure en arrière de la jonction mobile et ne sont plus détectées dans la vacuole mature.

c) La formation de la vacuole parasitophore

Les mouvements de glissement le long de la jonction mobile vont progressivement entraîner le parasite à l'intérieur de la cellule-hôte. Au moment de l'invasion, les rhoptries paraissent se vider de leur contenu (Nichols and O'Connors, 1981 ; Nichols *et al.* 1983). Suite à cette exocytose, il semblerait que certaines protéines de rhoptries s'insérent dans la vacuole parasitophore en formation (Beckers *et al.*, 1994). La phospholipase A2, une enzyme dont l'activité est liée à la concentration du calcium intracellulaire, pourrait intervenir en modifiant la fluidité de la membrane de la cellule-hôte facilitant ainsi l'invasion du parasite. En effet, *in vitro*, lorsque la phospholipase A2 est active, l'invasion des tachyzoïtes est facilitée, alors que son inactivation empêche la pénétration parasitaire (Saffer *et al.*, 1989 ; Saffer and Schwartzman, 1991). Lorsque le parasite a pénétré dans la cellule-hôte, la jonction mobile se ferme derrière lui, la membrane de la vacuole entourant le parasite se pince et se détache du plasmalemme de la cellule (Suss-Toby *et al.*, 1996). Le parasite se trouve ainsi complètement isolé du cytoplasme de la cellule au sein d'une **vacuole dite "parasitophore"**. La vacuole parasitophore est un compartiment intracellulaire particulier incapable de fusionner avec les lysosomes de la cellule. Pour éviter cette fusion, la membrane de la vacuole parasitophore nouvellement formée va être modifiée. Cette modification implique, d'une part l'exclusion des molécules de la membrane plasmique de l'hôte, et d'autre part l'incorporation de protéines parasitaires.

L'exclusion des protéines de la membrane de la vacuole se produit quelques minutes après l'invasion cellulaire. Elle comprend des protéines de surface (récepteur Fc, molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II, CD44, ATPase...). Les marqueurs des compartiments lysosomiaux (LAMP1, Rab5, Rab7...) sont également absents de la membrane de la vacuole (de Carvalho and de Souza, 1989; Mordue and Sibley, 1997). La poursuite de la maturation de la vacuole parasitophore s'accompagne de la sécrétion des protéines de granules denses, de la formation d'un réseau de tubules membranaires et de l'association d'organites de la cellule-hôte avec la membrane de la vacuole. Les protéines contenues dans les granules denses ou protéines GRA sont sécrétées au niveau du pôle apical du parasite quelques instants après l'invasion, lorsque le parasite est installé dans la vacuole. Sécrétées sous forme soluble, ces protéines sont ciblées à des endroits différents de la vacuole (Charif et al., 1990; Achbarou et al., 1991b; Cesbron-Delauw, 1994; Sibley et al., 1995). Cette sécrétion se produit en continu durant tout le développement intracellulaire du toxoplasme. Parallèlement à cette sécrétion, le parasite élabore des structures membranaires intravacuolaires constituant un réseau de tubules membranaires qui va assurer la continuité entre sa membrane plasmique et celle de la vacuole parasitophore (Sibley and Krahenbuhl, 1988). La formation de ce réseau implique la sécrétion de vésicules multilamellaires se produisant dans la partie postérieure du parasite. Une invagination du pôle postérieur est, en effet, visible dix minutes après la fermeture de la vacuole (figure 6). Cependant, ce phénomène est transitoire puisque le parasite retrouve sa forme originelle après trente à soixante minutes (Sibley et al., 1995). Il semblerait également que la formation et la stabilité de ce réseau dépendent de la sécrétion de molécules contenues dans les granules denses (Charif, et al., 1990 ; Achbarou et al., 1991b). Le rôle de ce réseau n'a pas été identifié. Cependant, la connexion membranaire observée entre le réseau tubulaire et la membrane de la vacuole parasitophore suggère un contact possible de celui-ci avec le cytoplasme de la cellulehôte. Il jouerait ainsi un rôle privilégié dans la communication et les échanges trophiques entre le parasite et la cellule-hôte. De même, l'insertion des protéines de granules denses dans ce réseau pourrait participer à la formation d'un canal ou d'une pore facilitant les échanges métaboliques ou intervenant dans la transduction des signaux (Sibley et al., 1995). La vacuole pourrait se comporter comme un tamis dans lequel seraient insérés des pores ouverts en permanence et permettant une diffusion de protéines de petits poids moléculaires (inférieurs à 2000 Daltons), sans spécificité de charge (Schwab *et al.*, 1994). Ces pores faciliteraient les échanges afin d'établir un équilibre entre l'environnement cytoplasmique de la cellule-hôte et celui de la vacuole (pH, état d'oxydo-réduction, composition chimique).

Enfin, d'étroites relations entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique de la cellule-hôte et la membrane de la vacuole parasitophore sont observées (Sinai *et al.*, 1997). Les composants du réticulum endoplasmique entourant la vacuole parasitophore semblent être incorporés dans la membrane de la vacuole (de Melo *et al.*, 1992). Le parasite pourrait trouver dans cette association les produits nécessaires à son métabolisme avec des échanges facilités d'ATP et de nutriments, ainsi qu'une source potentielle de lipides. La "capture" des organites cellulaires impliquerait, dans un premier temps, une association de type ligand-récepteur entre des protéines parasitaires de la vacuole parasitophore et un récepteur cellulaire. Ce mécanisme d'ancrage ferait intervenir des protéines parasitaires s'insérant dans la membrane de la vacuole et présentant un domaine cytoplasmique du côté de la cellule-hôte (Sinai *et al.*, 1997).

Jusqu'à présent, l'origine des lipides de la membrane de la vacuole, représentés essentiellement par du cholestérol et des phospholipides, n'est pas établie. Bien que la plupart de ces lipides semblent dériver de la membrane de la cellule-hôte (Suss-Toby *et al.*, 1996), il n'est pas exclu qu'une partie d'entre eux soient d'origine parasitaire. D'ailleurs, l'analyse du contenu lipidique des rhoptries a mis en évidence un taux inhabituel de lipides (rapport lipide/protéine 0,26), avec un fort pourcentage de phosphatidylcholine (75 %), de cholestérol et l'absence de phosphatidylsérine, de sphingomyéline (Foussard *et al.*, 1991). Ces lipides pourraient être sécrétés dans la membrane de la vacuole en formation.

d) La multiplication intracellulaire des parasites

A la suite de sa pénétration à l'intérieur de la cellule-hôte, le parasite perd toute mobilité et il commence à se multiplier par endodyogénie. A l'intérieur de chaque parasite, deux cellules filles se forment à la suite d'une fission binaire. Les parasites s'organisent à l'intérieur de la vacuole parasitophore en forme de rosette (figure 7). La vitesse de multiplication est variable selon la souche parasitaire et dure de 5 à 10 heures (Jones and Hirsch, 1972). Les souches virulentes se multiplient plus rapidement, *in vitro*, que les souches non virulentes (Makioka and Ohtomo, 1995). Tous les parasites d'une même vacuole se divisent de manière synchrone. Au fur et mesure des cycles de division, le volume occupé par la vacuole parasitophore s'accroît. L'origine de cette augmentation de surface de la membrane est encore inconnue. Après six à huit cycles d'endodyogénie, 64 à 256 tachyzoïtes vont sortir de la cellule-hôte et sont capables d'infecter les cellules environnantes. Juste avant la rupture de la membrane de la vacuole parasitophore, les parasites alors immobiles s'activent et sont libérés hors de la cellule. La reprise des mouvements parasitaires semble liée aux variations de la teneur en calcium intracellulaire (Endo *et al.*, 1982 ; Stommel *et al.*, 1997). Le parasite traverse successivement la membrane de la vacuole, le cytoplasme puis le plasmalemme de la cellule-hôte provoquant des lésions irrémédiables au niveau de la membrane cellulaire.



Figure 7 : Coupe ultrafine d'une cellule Véro contenant une vacuole parasitophore au stade de huit tachyzoïtes (migrographie de J. F. Dubremetz).

Les tachyzoïtes (TK) apparaissent bien délimités au sein de la vacuole parasitophore. La membrane délimitante (M) de cette dernière est facilement reconnaissable. Les membranes du réseau intravacuolaire (R) peuvent être apercçues entre certains tachyzoïtes.

Au cours de chaque cycle de multiplication, la synthèse de l'ADN s'accompagne d'une production importante d'adénosine tri-phosphatase (ATPase). Cette activité fournirait l'ATP nécessaire au parasite dans la production de ses nucléotides puriques. En effet, bien que capable de synthétiser *de novo* les pyrimidines, *T. gondii* présente une déficience pour la synthèse des purines (Schwartzman and Pfefferkorn, 1981; Asai *et al.*, 1983). A la suite de l'acquisition de l'uracile, de la thymidine et de la cytidine de la cellule-hôte, des enzymes parasitaires spécifiques convertissent ceux-ci sous forme assimilable dans son métabolisme. Ainsi, l'uracil phosphoribosyltransférase (UPRT) est une enzyme impliquée dans la conversion de l'uracile en uridine 5'-monophosphate (UMP) (Carter *et al.*, 1997). L'ATP, principale source des bases puriques, serait dégradé en adénosine puis il serait rephosphorylé fournissant ainsi les nucléotides puriques nécessaires à la synthèse d'ADN (Schwartzman and Pfefferkorn, 1982). Plusieurs enzymes impliquées dans ces processus ont été identifiées. Ainsi, l'adénosine kinase intervient dans le transport de l'adénosine dans le parasite (Schwab *et al.*, 1995). Les NTPases sont également impliquées dans la voie de sauvetage des purines en fournissant une importante source de nucléosides phosphates. Les NTPases sont, en effet, responsables de l'hydrolyse de l'ATP en monophosphate (Sibley *et al.*, 1994a ; Asai *et al.*, 1995). De même, l'hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HXGPRT) est impliquée dans la conversion de l'hypoxanthine en inosine monophosphate (IMP) (Pfefferkorn and Borotz, 1994).

B) Structure moléculaire des tachyzoïtes

La structure moléculaire des tachyzoïtes est désormais mieux connue depuis le clonage d'un certain nombre de gènes parasitaires. En 1991, une nomenclature a été proposée à la suite des travaux réalisés par Sibley et collaborateurs (Sibley *et al.*, 1991a). Cette nomenclature utilise un code génétique de trois lettres décrivant, soit la localisation subcellulaire de la protéine, soit la fonction du produit du gène. Ainsi, les gènes codant pour les protéines de surface sont regroupés sous le terme *SAG*, les gènes codant pour les protéines de granules denses sous le terme *GRA*, les gènes codant pour les protéines de rhoptries et de micronèmes sous les termes *ROP* et *MIC* respectivement. La même nomenclature est utilisée lorsque les gènes codent pour des protéines dont la fonction est connue. C'est, par exemple, le cas pour les gènes *TUB* codant pour les protéines de tubulines ou pour le gène *NTP* codant pour la nucléotide triphosphate hydrolase.

L'identification et la caractérisation parmi les molécules parasitaires des molécules antigéniques sont importantes à la fois dans la mise au point d'un diagnostic et d'un traitement contre la toxoplasmose. Dans cette optique, les recherches concernant deux grandes classes d'antigènes, les antigènes de surface et les antigènes de sécrétion, se sont intensifiées.

a) Les molécules de surface

Actuellement, cinq protéines majeures de surface ont été décrites chez le tachyzoïte. Il s'agit des protéines SAG1 ou P30, SAG2 ou P22, SAG3 ou P43, P23 et P35. Certaines

d'entre elles sont communes aux différents stades (tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte), c'est le cas, par exemple, de SAG3.

Caractéristiques communes

Toutes les molécules de surface identifiées à ce jour contiennent deux régions hydrophobes. La première, située dans la partie N-terminale de la protéine est caractéristique d'une séquence signal (nécessaire à leur entrée dans le lumen du réticulum endoplasmique). La seconde, située dans sa partie C-terminale, présente les caractéristiques d'une séquence signal GPI. C'est par l'intermédiaire de ce groupement glycosylphosphatidyl inositol (GPI) que ces protéines sont ancrées dans la membrane plasmique du parasite. Cette structure est composée d'un groupement inositol, d'une glycosamine et d'une éthanolamine (Couvreur et al., 1988; Nagel and Boothroyd, 1989; Tomavo et al., 1989; Schwarz and Tomavo, 1993).

Ces protéines de surface sont également l'objet de modifications post-traductionnelles. Ces modifications impliquent la phosphorylation de résidus sérine présents dans les protéines SAG1 et SAG2 (Tomavo *et al.*, 1992). Par contre, bien que ces protéines possèdent des structures glycosylables, la glycosylation n'est pas une modification post-traductionnelle courante (Burg *et al.*, 1988). Seule la protéine P23 semble glycosylée (N-glycosylation, Schwarz and Tomavo, 1993).

De plus, certaines protéines de surface présentant des profils d'hydrophobicité similaires ont été groupées par familles. Une de ces familles est constituée par des protéines **apparentées à SAG1**. Elle comprend les protéines **SAG1**, **SAG3 et SRS** (Manger *et al.*, 1998

La famille SAG1/SAG3/SRS

La protéine SAG1 (ou P30) est l'antigène majeur de surface de *T. gondii*. SAG1 est uniquement exprimée au stade tachyzoïte (Kasper *et al.*, 1983, 1984 ; Burg *et al.*, 1988). Elle est uniformément répartie à la surface du parasite et représente de 3 à 5 % des protéines parasitaires (Dubremetz *et al.*, 1985 ; Grinwood and Smith, 1995). Décrite pour la première fois en 1980 par Handman et Remington (Handman and Remington, 1980), cette protéine a été à l'origine de nombreuses études du fait de son caractère très immunogène (Rodriguez *et al.*, 1985). Cette protéine est très souvent utilisée comme un antigène de référence dans les tests de diagnostic sérologiques (Santoro *et al.*, 1985, 1986 ; Decoster *et al.*, 1988) et dans les stratégies vaccinales contre la toxoplasmose (Büllow and Boothroyd, 1991 ; Darcy *et al.*, 1992).

La protéine SAG1 pourrait jouer un rôle dans l'invasion. En effet, l'invasion cellulaire par les toxoplasmes est diminuée en présence de divers anticorps monoclonaux anti-SAG1 (Grinwood and Smith, 1992, 1996; Mineo and Kasper, 1994). Cette protéine de surface semblerait jouer un rôle important dans la reconnaissance de la cellule-hôte (Boothroyd *et al.*, 1998). Cependant, un mutant chimique n'exprimant plus la protéine SAG1 (mutant B) n'a pas révélé de différence dans la capacité d'invasion et de multiplication des parasites **en** comparaison avec la souche sauvage (Kasper, 1987). Enfin, un allèle spécifique au locus du gène SAG1 (allèle 1) est corrélé avec la virulence chez la souris suggérant l'intervention de SAG1 en tant que marqueur de virulence (Sibley and Boothroyd, 1992c).

La protéine SAG3 (ou P43) est une protéine présente à tous les stades parasitaires (tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte). Bien que l'homologie globale soit faible (24 % d'homologie), elle présente les mêmes caractéristiques structurales que celles identifiées sur la protéine SAG1, avec un profil d'hydrophobicité identique (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994). De plus, la similarité entre ces deux protéines est renforcée par la conservation des 12 résidus cystéines et de leur position, ce qui suggère une conservation des ponts disulfure de ces deux protéines.

Un mutant nul SAG3⁻ a été obtenu par double recombinaison homologue. *In vitro*, le mutant SAG3⁻ présente une nette réduction (40-60%) dans sa capacité d'envahir les cellules et une diminution de sa virulence in *vivo* (Tomavo, 1996).

La protéine SRS1 (SAG1-related sequence 1), moins abondante que SAG1, est une protéine de 46 kDa dont le gène se situe en amont de celui de SAG1 (Hehl *et al.*, 1997).

Les similitudes des séquences primaires et la conservation de structures identiques (profil d'hydrophobicité, résidus cystéine) parmi les trois membres de cette famille de protéines de surface suggèrent une fonction commune. SAG1 a été identifiée comme un acteur important dans l'attachement cellulaire. La présence d'autres protéines telles que SAG3 et SRS1 pourrait expliquer pourquoi les mutants déficients pour la protéine SAG1 (mutant B) ou SAG3 sont viables et encore capables d'envahir les cellules et de s'y multiplier. Ces protéines de surface pourraient également fournir des redondances permettant au parasite d'interagir avec une grande variété de ligands, présents à la fois à la surface de différents types cellulaires et dans différentes espèces. L'identification du rôle précis par chaque membre de cette famille au cours de l'infection est devenue un axe de recherche important.

La protéine SAG2 (ou P22) est exclusivement exprimée au stade tachyzoïte (Couvreur *et al.*, 1988 ; Prince *et al.*, 1990). Cette protéine initialement décrite comme une protéine de 14 kDa (Handman, *et al.*, 1980). est uniformément répartie à la surface du parasite (Grimwood and Smith, 1995). Tout comme les autres protéines de surface, elle possède deux régions hydrophobes dans sa partie N-terminale et dans sa partie C-terminale avec une séquence d'ancrage GPI. Cependant, elle se distingue de la famille liée à SAG1 par une

distribution différente de ses résidus cystéines au sein de sa séquence (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994). La protéine SAG2 jouerait un rôle dans l'orientation du parasite lors de la pénétration dans la cellule-hôte (Smith, 1995 ; Grimwood and Smith, 1996). Les parasites pré-incubés avec des anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine sont incapables d'envahir la cellule-hôte et s'accumulent sur la membrane de l'hôte. Par contre, la neutralisation des anticorps restaure la mobilité et la réorientation des parasites.

b) Les molécules de sécrétion

b.1) Les molécules de micronèmes

Chez T. gondii, les protéines de micronèmes ont été peu étudiées. Jusqu'à présent, trois protéines ont été caractérisées, MIC1 (60 kDa), MIC2 (120 kDa) et MIC3 (90 kDa) (Achbarou *et al.*, 1991a ; Fourmaux *et al.*, 1996a ; Wan *et al.*, 1997). Ces protéines sont détectées à tous les stades parasitaires.

Caractéristiques communes

Les protéines MIC sont sécrétées avant l'invasion cellulaire (Carruthers and Sibley, 1997). Le rôle précis de ces molécules n'a pas été déterminé. Cependant, les protéines de micronèmes des *Apicomplexa* présentent des caractéristiques communes vraisemblablement liées à une fonction biologique similaire. L'analyse des séquences protéiques primaires a révélé l'existence de domaines potentiellement impliqués dans des phénomènes d'adhésion, suggérant leur intervention, très tôt, lors de l'invasion cellulaire, dans les mécanismes de reconnaissance et d'attachement à la cellule-hôte (Fourmaux *et al.*, 1996b).

La protéine MIC1 contient une séquence caractéristique d'un peptide signal (Fourmaux et al., 1996a). L'analyse des séquences d'ADNc de MIC1 a révélé l'existence de deux domaines répétés, en tandem, dans lesquels la position et le nombre des résidus cystéine sont bien conservés. Ces domaines présentent une homologie intéressante avec ceux décrits dans les protéines TRAP (Thrombospondin Related Adhesive Protein) et CSP (Circumsporozoïte Protein) de *Plasmodium* où de tels domaines interviennent dans les processus d'attachement et d'invasion avec les hépatocytes (Robson et al., 1988; Cerami et al., 1992). Cependant, bien que la protéine MIC1 possède une affinité pour la surface des cellules hôtes, elle n'a jamais été détectée à la surface du parasite ou de la cellule-hôte lors de l'invasion (Fourmaux et al., 1996a).

La protéine MIC2 est une protéine de 120 kDa. Elle présente également des homologies avec les protéines TRAP. Lorsque le contact entre le parasite et la cellule-hôte
s'établit, cette protéine est détectée à la surface apicale du parasite (Carruthers and Sibley, 1997). Puis, au cours de l'invasion, elle va progressivement gagner l'extrémité postérieure avant d'être relarguée dans le milieu extérieur. Son rôle est encore incertain, toutefois, elle pourrait intervenir dans le phénomène d'attachement avec la cellule-hôte en se liant aux sucres sulfatés de l'hôte (Sibley *et al.*, 1998). La protéine MIC2 semble contenir deux domaines différents impliqués dans le processus d'adhésion de diverses molécules cellulaires. De plus, lorsque la sécrétion de MIC2 est bloquée en présence d'un inhibiteur de la myosine, la capacité d'invasion des parasites est réduite (Dobrowolski *et al.*, 1997a ; Sibley *et al.*, 1998). Cette protéine pourrait jouer un rôle lors de l'invasion cellulaire.

La protéine MIC3 (90 kDa) est un hétérodimère composé de deux sous-unités de 38 kDa, liés par des ponts disulfures (Achbarou *et al.*, 1991a). Cette protéine riche en résidus cystéine possède un peptide signal dans sa région N-terminale et un domaine transmembranaire (Garcia-Réguet and Dubremetz, non publié). La protéine MIC3 possède également cinq motifs homologues à des domaines du facteur de croissance épidermique, EGF (Epidermal Growth Factor) ainsi qu'un domaine apparenté aux lectines. La présence de ces domaines suggère leur probable intervention dans des interactions protéine-protéine ou protéine-glycane impliquées dans les phénomènes de reconnaissance ligand-récepteur.

b.2) Les molécules de rhoptries

Jusqu'à présent, **une dizaine de protéines de rhoptries** (ROP1...ROP11) a été décrite chez *T. gondii* (Dubremetz *et al.*, 1987 ; Kimata and Tanabe, 1987 ; Sadak *et al.*, 1988 ; Schwartzman and Krug, 1989 ; Leriche and Dubremetz, 1991).

Caractéristiques communes

Les molécules contenues dans les rhoptries ou protéines ROP sont sécrétées au moment de l'invasion dans l'espace vacuolaire en formation. Ces protéines, détectées seulement pendant quelques minutes après l'invasion, vont alors s'insérer dans la membrane de la vacuole parasitophore (Nichols *et al.*, 1983 ; Saffer *et al.*, 1992 ; Dubremetz *et al.*, 1993). Bien qu'aucune fonction n'ait été attribuée à ces protéines, les protéines de rhoptries d'autres *Apicomplexa (Plasmodium, Sarcocystis...)* seraient impliquées dans les mécanismes d'attachement et d'invasion cellulaire (Perkins, 1992 ; Sam-Yellowe, 1996). Certaines d'entre elles (ROP2-5) sont des protéines basiques. Le rôle des protéines basiques a d'ailleurs été proposé lors des mécanismes de pénétration dans la cellule-hôte (Leriche and Dubremetz, 1991). Les protéines de rhoptries de *T. gondii* semblent intervenir à la fois lors de l'invasion et dans la formation initiale de la vacuole parasitophore (Dubremetz, 1998).

proposé lors des mécanismes de pénétration dans la cellule-hôte (Leriche and Dubremetz, 1991). Les protéines de rhoptries de *T. gondii* semblent intervenir à la fois lors de l'invasion et dans la formation initiale de la vacuole parasitophore (Dubremetz, 1998).

La protéine ROP1 est présente à tous les stades parasitaires. Il s'agit d'une protéine hydrophile de 60.5 kDa, riche en résidus proline dans sa partie N-terminale. La protéine possède un peptide signal à son extrémité N-terminale, mais elle est dépourvue d'une séquence caractéristique d'une région transmembranaire. L'analyse de sa séquence en acides aminés révèle une extrémité N-terminale acide et une extrémité C-terminale basique. L'assymétrie de sa charge pourrait intervenir dans l'interaction de ROP1 avec les phospholipides ou des molécules transmembranaires expliquant sa localisation membranaire (Ossorio et al., 1992). Elle est décrite pour la première fois en 1966 comme un facteur protéique, le PEF (Penetration Enhancing Factor) capable d'augmenter la pénétration des parasites dans la cellule-hôte (Lycke and Norrby, 1966; Norrby and Lycke, 1967; Lycke et al., 1975). La protéine ROP1 est sécrétée au moment de la pénétration et se trouve à la fois associée à la membrane de la cellule et à la membrane de la vacuole parasitophore en formation. Quelques heures après l'invasion, la protéine disparaît rapidement de la membrane de la vacuole 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. Son interaction avec d'autres protéines, afin d'augmenter la pénétration du parasite dans la cellule-hôte, est suspectée bien qu'aucun phénotype particulier n'apparaisse pour le mutant nul ROP1. En effet, ce mutant ne présente pas de différence significative avec la souche parentale dans sa virulence chez la souris, dans sa capacité à envahir la cellule-hôte et à s'y multiplier. La protéine ROP1 n'est pas essentielle à la survie des parasites (Soldati et al., 1995).

La famille ROP2, 3, 4, 7 et 8

La protéine ROP2 appartient à une famille de protéines basiques dont le poids moléculaire est compris entre 55 et 60 kDa. La protéine ROP2 (54 kDa) est riche en proline et subit une maturation à la suite du clivage de son produit de 70 à 80 kDa. La protéine mature contient une séquence interne transmembranaire qui lui permet de s'intégrer dans la membrane de la vacuole. Cette famille est composée des protéines (ROP2, 3, 4, 7 et 8) localisées dans la membrane de la vacuole et possédant des déterminants antigéniques communs (Sadak *et al.*, 1988 ; Leriche and Dubremetz, 1991 ; Beckers *et al.*, 1997). Ces protéines sont exprimées à tous les stades du parasite (tachyzoïte, bradyzoïte et plus faiblement au stade sporozoïte). Les molécules ROP2 (55 kDa) et ROP4 (60 kDa) constituent les protéines majeures de cette famille. Toutes les deux sont insérées dans la membrane de la vacuole au moment de l'invasion et sont exposées du côté du cytoplasme de la cellule (Beckers *et al.*, 1994).

de la vacuole (Sadak *et al.*, 1988 ; Leriche and Dubremetz, 1991). Les protéines **ROP8** (52 kDa), **ROP9** (220 kDa), **ROP10** (120 kDa) et **ROP11** (168 kDa) ont été localisées dans le pédoncule des rhoptries par microscopie électronique (Leriche and Dubremetz, 1991).

b.3) Les molécules de granules denses (Cesbron-Delauw, 1994 ; Cesbron-Delauw et al., 1996)

Les protéines GRA constituent une famille de molécules de petit poids moléculaire (entre 20 et 40 kDa). Jusqu'à présent 9 protéines de granules denses de la forme tachyzoïte ont été caractérisées. Il s'agit des protéines GRA1 (23 kDa), GRA2 (28 kDa), GRA3 (30 kDa), GRA4 (40 kDa), GRA5 (21 kDa), GRA6 (32 kDa), GRA7 (30 kDa) et de la NTPase 1 (240 kDa) et NTPase 2 (270 kDa) (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989 ; Mercier *et al.*, 1993 ; Bermudes *et al.*, 1994a ; Mévelec *et al.*, 1992 ; Lecordier *et al.*, 1995 ; Jacobs *et al.*, 1998 ; Sibley *et al.*, 1994a ; Asai *et al.*, 1995). Bien que la topologie de ces protéines dans la vacuole parasitophore soit connue, aucune fonction biologique n'a pu leur être attribuée, à l'exception des NTPases.

Caractéristiques communes

L'analyse de leur séquence protéique primaire a révélé également la présence d'une séquence hydrophobe caractéristique d'un peptide signal, dans leur partie N-terminale. De plus, la plupart d'entre elles possèdent des domaines hydrophobes présentant les caractéristiques d'une région transmembranaire. Ces protéines sont cependant stockées sous forme soluble dans les granules denses et sont sécrétées dans la vacuole parasitophore après l'invasion du parasite dans la cellule-hôte. Cette sécrétion est maximale une vingtaine de minutes après l'invasion de la cellule-hôte (Carruthers and Sibley, 1997). Les protéines exocytées vont être ciblées différentiellement au sein de la vacuole parasitophore (Charif et al., 1990; Achbarou et al., 1991b; Cesbron-Delauw, 1994; Sibley et al., 1995). Sur la base de leur localisation dans la vacuole parasitophore, trois classes de protéines ont été distinguées. Alors que les protéines de la première classe, représentée par la protéine GRA1 et les NTPases sont des protéines solubles qui diffusent dans l'espace intravacuolaire, les protéines de la seconde classe, GRA2, GRA4 et GRA6 vont s'associer avec les membranes du réseau intravacuolaire. Enfin, les protéines de la troisième classse, comprenant les protéines GRA3, GRA5 et GRA7 vont s'associer avec la membrane délimitante de la vacuole parasitophore (figure 8).



<u>Figure 8 :</u> Schéma représentant les différentes protéines GRA et leur localisation au sein de la vacuole parasitophore.

Légende :

VP: vacuole parasitophore ; GD: granules denses ; MVP: membrane de la vacuole parasitophore ; S: soluble ; M: membranaire ; $Ca^{++}:$ domaine de liaison au $Ca^{++}; \alpha:$ hélice alpha amphipathique ; H: domaine hydrophobe ; T: domaine transmembranaire.

🔄 : séquence signal

Les protéines de la première classe

La première classe de protéines GRA est constituée de la protéine GRA1 et des NTPases (NTPase1 et NTPase2). La protéine GRA1 (23 kDa) présente deux domaines de structure secondaire en "hélice boucle hélice" connue pour fixer le calcium. Cette protéine pourrait agir comme un modulateur de la concentration de calcium permettant de stabiliser le réseau de la vacuole parasitophore (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989 ; Charif *et al.*, 1990). Elle pourrait également intervenir dans le conditionnement des produits de sécrétion (Cesbron-Delauw, 1994). Les NTPase1 et 2 représentent environ 8 % des protéines totales du tachyzoïte. Elles sont composées de quatre sous-unités identiques (de 66 à 67 kDa) (Asai *et al.*, 1987 ; Sibley *et al.*, 1994a ; Bermudes *et al.*, 1994b). Leur localisation vacuolaire devrait leur permettre d'accéder directement à l'ATP cellulaire, présent en grandes quantités.

Les protéines de la seconde classe

Les protéines GRA2, GRA4 et GRA6 sont détectées dans l'espace vacuolaire en association avec le réseau de tubules membranaires et dans la paroi des kystes (Charif *et al.*, 1990; Torpier *et al.*, 1993). Très rapidement après leur sécrétion, les protéines GRA2 (figure 9) et GRA6 s'accumulent au pôle postérieur du parasite où elles participeraient à la formation du réseau en s'associant aux vésicules multi-lamellaires (Sibley *et al.*, 1995).

La protéine GRA2 (28 kDa) est une protéine O-glycosylée sur ses résidus sérine et thréonine (Charif *et al.*, 1990 ; Schwarz and Tomavo, 1993). L'analyse de sa séquence en acides aminés a révélé la présence de deux motifs répétés pouvant s'organiser en hélices amphiphiles (Prince *et al.*, 1989 ; Mercier *et al.*, 1993). L'implication de ces hélices amphiphiles dans l'association de GRA2 avec les membranes du réseau intravacuolaire a été récemment démontrée (Mercier *et al.*, 1998a).

La protéine GRA4 (40 kDa) est une protéine riche en résidus proline, sérine et thréonine. Elle possède une région interne hydrophobe potentiellement transmembranaire (Achbarou *et al.*, 1991b; Mévelec *et al.*, 1992).

La protéine GRA6 (ou P32, 32 kDa) est caractérisée par deux séquences hydrophibes (N- et C-terminale) encadrant un domaine central hydrophobe potentiellement transmembranaire (Lecordier *et al.*, 1995). L'analyse de sa séquence protéique primaire a révèlé, d'une part que sa région C-terminale hydrophile est une région riche en résidus glycine, et d'autre part certaines similitudes avec celle de la protéine GRA5 (24 % d'homologie). Cette protéine présente une certaine similarité avec des protéines de structure fibreuse, ce qui suggère son implication dans le maintien de la structure du réseau membranaire.



Figure 9 : Visualisation en microscopie électronique de l'immunomarquage à l'or colloïdal de la protéine GRA2 réalisé à l'aide de l'anticorps monoclonal TG17-179 (Charif *et al.*, 1990b) (D'après Sibley *et al.*, 1995).

A la suite de l'exocytose des granules denses qui suit l'invasion du parasite dans la cellule-hôte, le marquage à l'or colloïdal de GRA2 montre que cette protéine est détectée en association avec les vésicules multilamellaires libérées au niveau de l'invagination postérieure du toxoplasme (flèche). GRA2 est également localisée dans le complexe membranaire interne, au pôle postérieur du parasite (pointe de flèche).

Légende : pv : vacuole parasitophore, n : réseau intravacuolaire.

Les protéines de la trosième classe

Les protéines GRA3, GRA5 et GRA7 sont détectées dans la membrane de la vacuole parasitophore. Presque exclusivement associées à la membrane de la vacuole, ces protéines peuvent également être détectées dans des extensions de la membrane de la vacuole parasitophore dans le cytoplasme de la cellule hôte (Dubremetz *et al.*, 1993).

La protéine GRA3 (30 kDa) possède de courts domaines hydrophobes (Bermudes *et al.*, 1994a). Suite à sa sécrétion dans la vacuole parasitophore, la protéine GRA3 forme des oligomères qui s'associent de façon stable avec la membrane de la vacuole par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes (Ossorioet al., 1994).

La protéine GRA5 (ou P21, 21 kDa) est caractérisée, comme la protéine GRA6, par deux régions hydrophiles flanquant un domaine central hydrophobe (Lecordier *et al.*, 1993). Les travaux récents de Lecordier et ses collaborateurs ont montré que la protéine GRA5 est une protéine transmembranaire de la membrane de la vacuole parasitophore. La région N-terminale de la protéine est détectée dans le cytosol de la cellule-hôte alors que sa région C-terminale est localisée dans l'espace vacuolaire (Lecordier *et al.*, 1999).

La protéine GRA7 (30 kDa) présente la même architecture structurale que GRA5. Elle contient une région interne hydrophobe potentiellement transmembranaire encadrée par des régions hydrophiles (Jacobs *et al.*, 1998 ; Fischer *et al.*, 1998).

3) Bradyzoïte et kyste

A) L'ultrastructure du kyste

Le kyste (figure 10) est une forme de latence dans l'organisme qui persiste durant toute le vie de l'hôte. Ces formes parasitaires sont associées à la phase chronique de la maladie et sont détectables à partir du huitième jour de l'infection. Les kystes sont essentiellement localisés dans les tissus nerveux sous une forme sphérique et dans les tissus musculaires sous une forme ovoïde.

Ces formes parasitaires présentent une dimension variable de 15 à 200 µm de diamètre ou de grand axe. Elles se développent progressivement dans le cytoplasme de la cellule hôte et se trouvent délimitées par une paroi. Cette paroi d'origine parasitaire et cellulaire confère une propriété de résistance importante aux kystes (Sims *et al.*,1988). La paroi est constituée d'une membrane intérieurement doublée d'un matériel granulaire condensé en couches homogènes.



<u>Figure 10</u>: Visualisation d'un kyste de *T. gondii* provenant d'un cerveau de rat en microscopie optique.

Ce kyste contient plus de mille bradyzoïtes de la souche VEG. La paroi du kyste est indiquée par une flèche (D'après Dubey *et al.*, 1998).

A l'intérieur des kystes se situent des centaines de **bradyzoïtes** (figure 11) tassés les uns contre les autres. Les bradyzoïtes sont des formes évolutives présentant une structure proche de celle du tachyzoïtes. Les kystes sont des formes de résistance dans le milieu intérieur. Ils se caractérisent par une multiplication très lente ("brady" : lent en grec). Ces formes parasitaires se distinguent des tachyzoïtes par une taille légèrement plus petite, un noyau décalé dans la partie postérieure. Le cytoplasme des bradyzoïtes contient également de nombreux micronèmes et des grains d'amylopectine abondants constituant une réserve d'énergie.

B) Les gènes spécifiques

En plus des différences morphologiques observées, les bradyzoïtes se différencient des tachyzoïtes par l'expression de marqueurs antigéniques qui leur sont propres. Ces études ont révélé l'absence des antigènes de surface SAG1 et SAG2 qui sont les plus exprimés par les tachyzoïtes (Kasper, 1989 ; Omata *et al.*, 1989). Par contre, plusieurs antigènes spécifiques du stade bradyzoïte ont été identifiés par des anticorps monoclonaux ou polyclonaux (Omata *et al.*, 1989 ; Woodison and Smith, 1990 ; Weiss *et al.*, 1992 ; Smith *et al.*, 1996).



Figure 11 : Ultrastructure en microscopie électronique d'un bradyzoïte de la souche 76K de *T. gondii* (D'après Dubey *et al.*, 1998).

Le stade bradyzoïte est caractérisé par de très nombreux micronèmes (Mn), des rhoptries très denses (Rh), des grains d'amylopectine (Am) et des granules denses (Gd). On observe également le plasmalemme du toxoplasme (Pm), le noyau (Nu), la mitochondrie (Mi), l'appareil de Golgi (Go), l'apicoplaste (Ga), le complexe membranaire interne (Im), les centrioles (Ce) et le conoïde (Co).

A ce jour, plusieurs antigènes spécifiques du stade bradyzoïte ont été identifiés, parmi lesquels se trouvent les protéines de surface (SAG4 ou P18, P21, P34, P36, BSR4/P36), les protéines de la paroi du kyste (MAG1) et les protéines du cytoplasme (BAG1, Hsp70 et LDH2) (Parmley *et al.*, 1994b ; Yang and Parmley, 1995 ; Bohne *et al.*, 1995, 1996).

Les protéines de surface

Cinq protéines de surface spécifiquement exprimées au stade bradyzoïte ont été observées (SAG4 ou P18, P21, P34, P36, BSR4/P36) (Tomavo *et al.*, 1991). Seule la protéine SAG4 (ou P18) a été caractérisée au niveau moléculaire (Ödberg-Ferragut *et al.*, 1996). Cette protéine présente également deux régions hydrophobes. La première située dans la partie N-terminale de la protéine est caractéristique d'un peptide signal. La seconde, en C-terminal, présente un signal pour une ancre GPI. Aucune fonction n'a été identifiée.

Les protéines de la paroi du kyste : MAG1, la protéine de 116 kDa

Le gène codant pour la protéine MAG1 a été isolé à partir de kystes matures (Parmley et al., 1994b). MAG1 est un antigène majeur du kyste. Cette protéine de 65 kDa est abondamment détectée dans la matrice des kystes et plus faiblement dans la paroi kystique. La séquence en acides aminés contient dans sa partie N-terminale les caractéristiques d'un peptide signal en accord avec la sécrétion probable de MAG1 dans la matrice. La fonction reste encore inconnue (Parmley et al., 1995).

D'autres protéines ont été détectées dans la paroi des kystes comme la protéine de 116 kDa, mais son gène n'a pas encore été isolé (Weiss *et al.*, 1992).

Les protéines du cytoplasme : BAG1, Hsp70 et LDH2

La protéine BAG1 (ou HSP30) est un antigène de 28-30 kDa uniquement exprimée au stade bradyzoïte. Le gène correspondant a été isolé dans le même temps à partir d'une banque d'expression, à la fois par Bohne et collaborateurs (le désignant comme le gène *BAG1*), et par l'équipe de Parmley (référencé alors comme le gène *BAG5*) (Bohne *et al.*, 1995; Parmley *et al.*, 1995). Dans le futur, afin d'éviter toute confusion, l'appellation BAG1 a été adoptée. La protéine BAG1 est exclusivement exprimée dans le cytoplasme des bradyzoïtes. Sa séquence en acides aminés révèle des homologies de sa région C-terminale avec la famille des petites protéines de choc thermiques de plantes (HSP, Heat Shock Proteins). Ces homologies reflètent probablement l'implication de cette protéine en réponse à un stress dans le phénomène de conversion tachyzoïte-bradyzoïte. Cependant, sa détection dans les kystes matures suggère également son importance dans les bradyzoïtes matures.

Une autre protéine apparentée à la famille des protéines HSP, la protéine Hsp70 a été identifiée dans le stade bradyzoïte (Weiss *et al.*, 1998). Cette protéine pourrait également intervenir lors de la différenciation tachyzoïte-bradyzoïte.

La protéine LDH2 (Lactate deshydrogenase) est une protéine de 35 kDa uniquement exprimée au stade bradyzoïte et qui présente plus de 71 % d'homologie avec la protéines LDH1 du stade tachyzoïte (Yang and Parmley, 1995). Cette protéine présente également une homologie importante avec une LDH de *Plasmodium falciparum*. La LDH2 intervient dans le métabolisme énergétique du bradyzoïte en transformant l'amylopectine en lactate (Denton *et al.*, 1996). Elle participerait ainsi à l'adaptation du bradyzoïte à son microenvironnement puisque les bradyzoïtes sont plus résistants que les tachyzoïtes à des pH acides.

Par contre, la plupart des **protéines GRA**, à l'exception de la protéine GRA4 et des NTPases, sont aussi détectées au stade **bradyzoïte** (Torpier *et al.*, 1993 ; Cesbron-Delauw, 1994). Ces protéines présentent dans la paroi des kystes une topologie similaire à celle observée dans la vacuole parasitophore. En effet, alors qu'au stade tachyzoïte, **les protéines GRA3**, **GRA5 et GRA7** sont détectées dans la membrane de la vacuole parasitophore, dans les bradyzoïtes, elles sont associées avec la membrane de la paroi kystique (Torpier *et al.*, 1993; Lane *et al.*, 1996 ; Fischer *et al.*, 1998). Les protéines **GRA1**, **GRA2 et GRA6**, présentes dans le réseau de tubules membranaires au stade tachyzoïte, sont, quant à elles, associées à la matrice des kystes (Lecordier *et al.*, 1995).

C) L'inter-conversion

Le processus de **conversion entre la forme réplicative, tachyzoïte et la forme à division lente, bradyzoïte** est une étape importante dans la pathogenèse et la persistance de la toxoplasmose. La différenciation nécessite un décision initiale qui permet le début de la conversion suivie de l'expression régulée des gènes. Les tachyzoïtes contenus dans la vacuole parasitophore réduisent leur métabolisme et leur réplication pour se différencier en bradyzoïtes. Parallèlement, la vacuole est modifiée, le réseau de tubules membranaires se désorganise et les protéines GRA se redistribuent pour former la membrane externe de la paroi du kyste. La formation de la paroi kystique se produit bien avant que le processus de conversion soit terminé. A l'intérieur des bradyzoïtes, le nombre des micronèmes et des grains d'amylopectine augmente.

La formation spontanée de kystes est observée dans des souches de toxoplasme à croissance plus lente (souches kysthènes). Par contre, pour les souches à croissance rapide, telles que la souche virulente RH, la formation des kystes est très rarement observée (Soête *et*

al., 1993a). Enfin, très récemment, sous certaines conditions de stress, l'induction de la transformation des tachyzoites en bradyzoïtes a pu être obtenue *in vitro* (Bohne *et al.*, 1993, 1994; Soête *et al.*, 1993a, 1994; Tomavo and Boothroyd, 1995; Weiss *et al.*, 1995).

La transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes ne se produit pas de façon synchrone au sein d'une population parasitaire clonée (Soête *et al.*, 1993a). Il s'agit d'un **phénomène progressif** au cours duquel les parasites vont passer par une série d'intermédiaires jusqu'au kyste mature contenant les bradyzoïtes. Les bradyzoïtes contenus dans un même kystes peuvent présenter des degrés de différenciation différents (Soête *et al.*, 1993a ; Odaert *et al.*, 1996 ; Lane *et al.*, 1996). La différenciation en bradyzoïtes s'accompagne d'une diminution progressive de l'expression de l'antigène SAG1, spécifique du stade tachyzoïte et d'une augmentation de l'expression des antigènes spécifiques du stade bradyzoïte tels que la protéine BAG1 (29 kDa), les antigènes de surface (18 kDa, 36 kDa) et la protéine de 116 kDa de la paroi du kyste (Soête *et al.*, 1993b ; Gross *et al.*, 1996 ; Soête and Dubremetz, 1996). La dernière protéine à apparaître est l'antigène de surface P21 qui est détecté uniquement lorsque la conversion est complète c'est-à-dire dans les kystes matures (Gross *et al.*, 1996 ; Ödberg-Ferragut *et al.*, 1996).

III - Génétique de T. gondii

1) L'organisation du génome

A l'exception de sa division sexuée dans l'intestin du chat et juste avant la division binaire en deux cellules filles, le génome de *T. gondii* est **haploïde** pendant la plus grande partie de son cycle (Cornelissen *et al.*, 1984 ; McLeod *et al.*, 1991). Il contient environ **8.10⁷ paires de bases** et posséderait **onze chromosomes** dont la taille, estimée en électrophorèse en champs pulsé, est comprise entre 2 Mb et plus de 10 Mb (Sibley and Boothroyd, 1992a). Bien que la taille des chromosomes soit relativement stable d'une souche à l'autre, un polymorphisme de taille (de 100 à 200 kb) a néanmoins été observé pour les chromosomes III, V et VI des souches RH (groupe I), P (groupe II) et C (groupe III). La raison d'une telle différence de taille est encore inconnue et pourrait impliquer des réarrangements chromosomiques comme chez *P. falciparum* (Corcoran *et al.*, 1988). *T. gondii* contient également deux génomes extra-chromosomiques, un génome mitochondrial (Borst *et al.*, 1984) ainsi qu'un génome circulaire, l'apicoplaste (Fichera and Roos, 1997).

L'ADN génomique de *T. gondii* n'est pas méthylé et contient de nombreuses répétitions en bases GC (Johnson *et al.*, 1986). Sur la base de la taille du génome et en considérant, d'une part que la plupart des protéines exprimées par *T. gondii* n'excèdent pas 100 kDa, et d'autre part que la majorité des gènes ne contient pas d'introns, le nombre des gènes parasitaires a été estimé à environ 20 000. Jusqu'à présent, de nombreux gènes ont été caractérisés. La plupart d'entre eux sont présents dans le noyau en **simple copie**. D'autres, par contre, sont répétés plusieurs fois dans le génome comme le gène B1 répété trente cinq fois (Burg *et al.*, 1989), le gène de l'ARN ribosomal 18S répété cent fois (Ellis *et al.*, 1995), le gène de l'ARNr 5S (Guay *et al.*, 1992) et la séquence anonyme TGR1E (Cristina *et al.*, 1992).

Une activité ADN polymérase a été identifiée chez *T. gondii*. Cependant, cette activité n'est pas la même selon la souche de toxoplasme et semble liée à la virulence des souches. En effet, l'activité de l'ADN polymérase est plus élevée dans les souches virulentes chez la souris comme la souche RH que dans celles dont la virulence est plus faible comme la souche ME49. L'augmentation de cette activité enzymatique est corrélée à une multiplication plus rapide pour les souches virulentes (Makioka *et al.*, 1993 ; Makioka and Ohtomo, 1995).

2) L'ARN

Le parasite semble posséder la machinerie nécessaire pour sa propre synthèse d'ARN, avec notamment la présence de nombreuses petites molécules caractéristiques des ARN ribosomaux (Guay *et al.*, 1992) ainsi qu'une activité ARN polymérase. La présence en grandes quantités d'**uridine phosphorylase** intervenant dans l'incorporation spécifique d'uridine dans les acides nucléiques a d'ailleurs été décrite (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1977a). Cette enzyme est présente en quantité cent fois plus importante que dans la cellulehôte.

Néanmoins, jusqu'à présent, très peu d'études concernant l'ARN de *T. gondii* ont été réalisées. Contrairement aux autres eucaryotes, la plupart des gènes de *T. gondii* ne sont pas interrompus par des introns. Cependant, la présence de deux ou plus de deux introns a été observée dans plusieurs gènes parasitaires *clonés (GRA2, GRA4, BAG1, LDH1,2 MAG1, DHFR-TS,* α et β tubulines). Les ARN de ces gènes doivent donc subir une maturation impliquant à la fois une opération d'épissage où les introns seront excisés.De plus, la polyadénylation de l'ARN joue un rôle important dans l'efficacité de la traduction en stabilisant les messagers. D'ailleurs, la traduction d'ARN messager possédant une extrémité polyadénylée peut être réalisée, *in vitro*, dans différents systèmes de traduction hétérologues comme la traduction en lysat de réticulocytes de lapin (Prince *et al.*, 1985 ; Johnson *et al.*, 1986).

3) Les promoteurs

Les mécanismes contrôlant l'expression des gènes chez les protozoaires parasites, en particulier chez ceux appartenant au phylum *Apicomplexa* sont peu connus. Cependant, les progrès réalisés ces dernières années dans la manipulation génétique des toxoplasmes ont permis d'appréhender ces mécanismes (Mercier *et al*, 1996). En effet, l'analyse des éléments promoteurs par comparaison de séquences n'avait pas rendu possible l'identification de motifs consensus classiques initiateurs de la transcription comme la TATA- ou la CAAT- box observés chez les cellules eucaryotes.

Les travaux réalisés dans le laboratoire sur les protéines de granules denses GRA1, GRA2, GRA5 et GRA6 indiquaient que ces protéines présentaient un profil d'expression et de sécrétion similaire (Cesbron-Delauw, 1994 ; Cesbron-Delauw *et al.*, 1996). Les résultats obtenus à la suite de l'étude des régions promotrices des gènes *GRA* (Mercier *et al*, 1996) combinés à ceux obtenus pour le promoteur du gène *SAG1* (Soldati and Boothroyd, 1995) par transfection de toxoplasmes ont permis d'identifier une **région promotrice minimale**. Cette

région est située en amont du site de démarrage de la transcription. De plus, les promoteurs des gènes GRA présentent une activité différentielle. Celle-ci est la plus élevée pour le gène GRA1 puis pour GRA5, GRA2, GRA6 et SAG1. L'analyse de ces séquences a révélé l'existence d'un motif heptanucléotidique "A/TGAGACG". Ce motif est répété un nombre variable de fois et agit de façon additionnelle indépendamment de son orientation.

D'autres éléments régulateurs semblent également impliqués dans le contrôle de l'activité promotrice. C'est notamment le cas pour le contrôle du gène *NTP3* codant pour la NTPase (également stockée dans les granules denses) (Nakaar *et al.*, 1998). Cependant, le manque d'informations concernant les régions en amont des gènes de *T. gondii* ne permet pas, à l'heure actuelle, d'estimer une quelconque implication du motif présent dans les gènes *GRA* ou de celui du gène *NTP3* dans le contrôle de l'expression d'autres gènes.

4) La manipulation génétique

Le développement récent des technologies de transfection de l'ADN dans les parasites protozoaires permet une approche originale dans l'étude des différents aspects de leur biologie. De plus, *T. gondii* représente un bon modèle expérimental de parasitisme intracellulaire. En effet, ce parasite se cultive facilement et massivement *in vitro* et permet différentes approches génétiques.

T. gondii a été le premier membre du phylum des *Apicomplexa* à être manipulé génétiquement (Soldati and Boothroyd, 1993). A partir de cette date, les manipulations génétiques du toxoplasme se sont développées. Toutes ces techniques sont basées sur la possibilité de transfecter le toxoplasme par électroporation, c'est-à-dire d'introduire et de faire exprimer de façon transitoire ou stable, un gène exogène ou endogène par le parasite.

A) La transfection transitoire

La transfection transitoire est une technique permettant d'étudier rapidement *in vivo* l'expression de l'ADN. Elle est utilisée pour étudier soit l'expression de protéines soit le rôle des éléments importants dans la régulation des gènes. Dans ce dernier cas, les séquences d'intérêts sont clonées de façon à encadrer le cadre de lecture ouvert d'un gène indicateur. L'efficacité de la transfection transitoire correspond au pourcentage de toxoplasmes ayant reçu le gène d'intérêt véhiculé par un plasmide. Cette efficacité varie de 30 à 50 % (Soldati, 1996).

L'analyse de l'expression du gène d'intérêt est diverse. Elle se fait soit par la détection

directe de la protéine à la suite de sa reconnaissance par des anticorps spécifiques, soit par la mesure de son activité. Deux gènes indicateurs responsables d'une activité enzymatique sont souvent employés lors de la transfection transitoire des toxoplasmes. Il s'agit, d'une part, du gène codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (CAT), et d'autre part, de celui codant pour la β -galactosidase (β -gal).

Le gène *CAT* a été le premier gène indicateur utilisé chez le toxoplasme (Soldati and Boothroyd, 1993). Ce gène induit l'expression de l'enzyme CAT dont l'activité enzymatique peut être estimée en mesurant la quantité de chloramphénicol acetylé et marqué au [¹⁴C]. De plus, l'analyse des produits exprimés par chromatographie sur couche mince permet de séparer les différentes formes du chloramphénicol (non-, mono-, diacetylé) (Seed and Sheen, 1988).

Le gène β -gal permet l'expression d'une protéine dont l'activité peut être révélée par des substrats colorimétriques, tels que le 5-Bromo-4-Chloro-3-indol- β -D-galactopyranoside (BCIP) ou le chloro red β -D-galactopyranoside (CPRG) (Seeber and Boothroyd, 1996) ou par un substrat fluorescent comme le 4-méthylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MUG).

B) La tranfection stable

La transfection stable permet d'exprimer de manière permanente l'ADN exogène introduit dans le toxoplasme puisque celui-ci s'intègre dans le génome du parasite. Les toxoplasmes sont transfectés par un gène de sélection codant pour une protéine apportant un phénotype particulier aux parasites ayant intégré cet ADN de façon stable. Les parasites exprimant cette protéine sont sélectionnés grâce à la résistance à une drogue conférée par cette protéine. L'intégration du gène de sélection se fait, en général, au hasard dans le génome et à plusieurs endroits. Cependant, dans le but d'obtenir une souche de toxoplasme déficiente pour une protéine, l'intégration de ce marqueur de sélection doit s'effectuer au niveau du locus du gène étudié par recombinaison homologue. Il s'agit alors d'une manipulation génétique très précise permettant l'échange du gène d'intérêt par des séquences d'ADN exogène à la suite d'un événement de double recombinaison homologue.

3 <u>1</u>1

a) Les marqueurs de sélection

Afin de sélectionner les parasites ayant intégré le gène indicateur, six marqueurs de sélection sont actuellement utilisés chez *T. gondii*.

a.1) Les gènes de résistance à des antibiotiques

* Le gène CAT, codant pour la chloramphénicol acétyl transférase confère la résistance au chloramphénicol aux parasites transfectés (Kim *et al.*, 1993). En effet, le chloramphénicol possède une action anti-parasitaire démontrée (Pfefferkorn *et al.*, 1992), mais son effet n'est sensible qu'au bout de 7 à 8 jours de sélection. La sélection des toxoplasmes transfectés de façon stable et résistants au chloramphénicol nécessite deux à trois cycles d'infection, de croissance et de lyse du tapis cellulaire en présence de l'antibiotique.

* L'expression du gène ble codant pour la bléomycine permet de sélectionner les parasites ayant ce gène sur la base de leur résistance à la phléomycine (Soldati *et al.*, 1995; Messina *et al.*, 1995). La phléomycine est un antibiotique qui s'intercale dans l'ADN et inhibe la croissance de nombreux organismes procaryotes et eucaryotes. Cette drogue n'est active que sur des parasites extracellulaires.

a.2) Les gènes des voies métaboliques

* L'hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HXGPRT) est une enzyme multifonctionnelle, non essentielle, qui est impliquée dans la synthèse des purines (Krug *et al.*, 1989). L'existence d'une souche de toxoplasmes déficients pour cette enzyme (Pfefferkorn and Borotz, 1994 ; Donald *et al.*, 1996) permet d'utiliser deux systèmes de sélection positif/négatif (figure 12).

La <u>sélection positive</u> nécessite l'action de l'acide mycophénolique en présence de xanthine. L'acide mycophénolique va bloquer la seule voie de synthèse des purines utilisée chez les toxoplasmes HXGPRT⁻. Par contre, les parasites HXGPRT⁻ ayant intégrés le plasmide pmini/HXGPRT (Roos *et al.*, 1994) codant pour cette enzyme survivent en synthétisant leurs purines à partir de la xanthine.

La <u>sélection négative</u> est réalisée en présence de 6-thioxanthine. La 6-thioxanthine est un analogue létal de la xanthine et de l'hypoxanthine. L'absence du gène *HXGPRT* codant pour l'enzyme confère aux toxoplasmes HXGPRT⁻ un phénotype résistant



Figure 12 : Voie métabolique des purines chez Toxoplasma gondii. (D'après Krug et al., 1989).

Légende :AMP : Adénosine MonophosphateATP : Adénosine TriphosphateIMP : Inosine MonophosphateXMP : Xanthine MonophosphateGMP : Guanosine MonophosphateHXGPRT : Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase

L'existence d'une souche de toxoplasmes déficients en HXGPRT permet l'utilisation d'un double système de sélection positif/négatif basé sur l'intégration du plasmide *p*miniHXGPRT codant pour cette enzyme (Roos *et al.*, 1994).

(+) Sélection positive par l'acide mycophénolique en présence de xanthine. L'acide mycophénolique bloque la seule voie métabolique permettant la synthèse des purines chez les parasites HXGPRT⁻. Les parasites ayant intégré le gène de sélection survivent en synthétisant leurs purines à partir de la xanthine.

(-) Sélection négative par la 6-thioxanthine. La 6-thioxanthine est un analogue léthal de la xanthine et de l'hypoxanthine. Ce composé est incorporé *via* l'enzyme HXGPRT dans la voie de biosynthèse des purines du parasite. En perturbant cette voie, il élimine les parasites ayant intégré le plasmide de sélection, alors que les parasites HXGPRT-survivent.

 (Thx^R) à la 6-Thioxanthine. Par contre, l'intégration du gène *HXGPRT* dans le génome des toxoplasmes HXGPRT⁻ génère des parasites sensibles (Thx^S) à la 6-Thioxanthine.

* L'uracil phosphorybosyltransférase (UPRT) est une enzyme non essentielle impliquée dans la voie de synthèse des pyrimidines. Cette enzyme catalyse la conversion de l'uracile en UMP chez *T. gondii* (Iltzsch, 1993). La mutation du gène codant pour cette enzyme confère la résistance à la fluorodéoxyuridine (Schwartzman and Pfefferkorn, 1981; Carter *et al.* 1997). En effet, la transformation de la fluorodéoxyuridine par l'UPRT étant létale pour les parasites, seuls les parasites déficients pour cette enzyme survivent. Ce système a permis d'isoler un mutant n'exprimant plus l'UPRT (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1977b ; Donald and Roos, 1995).

* Le gène *trpB* d'*E. coli* codant pour la sous-unité β de la tryptophane synthétase est utilisé comme marqueur de sélection (Sibley *et al.*, 1994b). Ce système de sélection est basé sur la **déficience** naturelle du toxoplasme **pour la synthèse du tryptophane** (Pfefferkorn *et al.*, 1986).

* La dihydrofolate réductase (DHFR) est une enzyme non essentielle impliquée dans la synthèse des folates. La mutation du gène codant pour cette enzyme confère la résistance à la pyriméthamine (Donald and Ross, 1994 ; Beckers *et al.*, 1997). Ce système de sélection a permis d'isoler un mutant n'exprimant plus cette enzyme (Roos, 1993 ; Roos *et al.*, 1994). Cependant, l'utilisation d'un mutant résistant à la pyriméthamine, agent thérapeutique contre la toxoplasmose, pose des problèmes de sécurité pour le manipulateur et l'environnement.

b) Applications

Afin d'obtenir des lignées de toxoplasmes exprimant de manière stable le gène exogène transfecté, différentes stratégies sont couramment utilisées : la résistance à une drogue, la complémentation de mutants... Les progrès réalisés dans la transfection stable du toxoplasme permettent d'envisager différentes manipulations génétiques : remplacement de gène par recombinaison homologue, complémentation de mutants et identification de gènes par l'introduction de mutations.

b.1) L'inactivation de gène

L'inactivation de gène par un double événement de recombinaison homologue est la stratégie la plus simple pour étudier la fonction d'une protéine. Contrairement à d'autres parasites, comme le *Plasmodium* ou le *Trypanosome* chez lesquels l'intégration de gènes exogènes se fait exclusivement par recombinaison homologue (Cruz *et al.*, 1991 ; Wu *et al.*, 1996). La recombinaison homologue est un événement au cours duquel les séquences d'un fragment exogène viennent remplacer les séquences endogènes avec lesquelles elles présentent une homologie. Afin d'induire cet événement, le gène exogène doit être encadré de régions identiques à celles encadrant le gène cible et suffisamment longues (plusieurs kilo bases) pour permettre un bon appariement entre les séquences de l'ADN exogène et celles de l'ADN génomique (Donald and Roos, 1994).

Cependant, la recombinaison homologue un événement rare chez *T. gondii*. Afin de favoriser le développement des parasites ayant été l'objet d'un double événement de recombinaison homologue, une stratégie de double sélection ou "Hit and run" peut être utilisée (Donald and Roos, 1998). Cette technique est basée sur une **double sélection** positive/négative utilisant le gène *HXGPRT*, codant pour l'enzyme hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transférase, comme marqueur de sélection positif/négatif. L'expression du gène *HXGPRT* confère aux parasites un phénotype résistant à l'acide mycophénolique en présence de xanthine, alors que l'absence de cette protéine confère un phénotype résistant à la 6-thioxanthine.

La restauration du phénotype sauvage dans le mutant nul par complémentation permet de vérifier que le phénotype éventuel observé pour le mutant nul serait dû à l'absence du gène d'intérêt. Un plasmide contenant la région codante du gène d'intérêt est alors introduit par électroporation dans le mutant nul et va s'intégrer au hasard dans le génome restaurant ainsi le phénotype sauvage.

b.2) Etude de la régulation des gènes

L'étude des gènes impliqués lors de la différenciation tachyzoïte-bradyzoïte peut également être abordée par la transfection stable de toxoplasmes. L'identification de gènes qui sont sur-exprimés lors de la différenciation tachyzoïte-bradyzoïte a été réalisée par la technique de "gene trap". Cette technique exploite le système de double sélection utilisant le gène *HXGPRT*. Cette sélection se déroule en deux étapes. Au cours de la première étape de sélection, les tachyzoïtes exprimant le gène *HXGPRT* sont éliminés par une sélection négative puis la différenciation est induite tachyzoïte-bradyzoïte. Les bradyzoïtes ayant intégrés le gène *HXGPRT* en aval d'un gène spécifique du stade bradyzoïte sont alors sélectionnés, au cours d'une seconde étape, par une sélection positive (Roos *et al.*, 1997 ; Knoll and Boothroyd, 1998).

b.3) Etude du trafic et/ou de l'adressage des protéines

L'étude du trafic et/ou de l'adressage d'une protéine peuvent être étudiés à la suite de l'obtention de lignées stables de toxoplasmes exprimant cette protéine. Afin de faciliter la recherche des parasites exprimant la protéine d'intérêt, le plasmide codant pour cette protéine et co-transfecté avec un marqueur de sélection dans des toxoplasmes. Les deux plasmides vont alors s'intégrer au hasard dans le génome des parasites permettant l'expression du marqueur de sélection ainsi que celle de la protéine d'intérêt.

Les différentes approches expérimentales utilisant la manipulation génétique du toxoplasme sont en plein essor. Les différentes applications permettront de mieus comprendre la biologie de ce parasite et les mécanismes de survie intracellulaire qu'il développe.

IV - La pathogenèse

1) La toxoplasmose

La toxoplasmose est une affection cosmopolite. Elle est très répandue chez l'homme (25 à 30 % de la population mondiale a une sérologie positive) et chez de nombreuses espèces animales (ovins, bovins, porcins, volailles...).

Cependant, chez l'homme, sa prévalence (qui est basée sur la détection des IgG ou des immunoglobulines spécifiques) est très variable selon les zones géographiques, les habitudes alimentaires, l'âge des individus (figure 13) (Dupouy-Camet *et al.*, 1993 ; Fortier et Ajana, 1993).



Figure 13 : Prévalence de la toxoplasmose dans le monde (D'après Dupouy-Camet *et al.*, 1993).

Bien que de nombreuses zones géographiques aient été peu ou pas étudiées, la prévalence sérologique mondiale est très contrastée selon les pays avec une prévalence de 20 à 87 % des adultes âgés de 30 ans. Alors que la prévalence est élevée dans les pays chauds et humides comme le Salvador (dans lesquels une grande concentration de félidés est constatée), elle est très faible dans les pays froids (Alaska). Dans tous les pays, la prévalence augmente

avec l'âge et varie surtout avec les coutumes alimentaires (Ashburn, 1992). En France, où la viande est souvent consommée saignante, la prévalence chez les femmes enceintes atteint plus de 50 % (Ancelle *et al.*, 1996).

L'infection toxoplasmique **animale** atteint de nombreuses espèces d'élevage dans différents pays, elle est particulièrement préoccupante à deux niveaux :

C'est un problème majeur en médecine vétérinaire. Les cas d'**avortements spontanés** sont observés en particulier dans les élevages de moutons (50 % des avortements sont dus à la toxoplasmose congénitale) (Buxton, 1993), de porcs et de volailles. Ces toxoplasmoses congénitales animales ne sont pas à négliger d'un point de vue économique.

Les animaux infestés vont rapidement mettre en place une immunité antitoxoplasmique conduisant à l'enkystement des parasites. Les toxoplasmes vont persister chez ces animaux qui constituent donc un important réservoir parasitaire responsable d'un sévère problème de santé publique, par la **contamination humaine** qu'il provoque.

A) Mode de contamination

L'homme peut s'infecter après l'ingestion de formes parasitaires contaminantes. Il existe trois formes contaminantes : l'oocyste, le kyste (renfermant des bradyzoïtes) ou le tachyzoïte (Nicolas and Pestre-Alexandre, 1993).

La contamination par les **oocystes** présents dans le milieu extérieur explique pourquoi des cas de toxoplasmose acquise ont été observés chez des sujets végétariens stricts. Les oocystes immatures sont émis dans le milieu extérieur par le chat ou les félidés. Ces oocystes deviennent infectants après quelques jours de maturation (24 à 48 heures à 22°C en milieu humide et aéré). L'homme peut s'infester par la consommation d'eau ou de végétaux souillés d'oocystes.

En France, l'ingestion d'oocystes ne joue qu'un rôle mineur dans la contamination humaine. Le mode de transmission le plus courant, dans les pays à haut niveau de vie, se produit par **carnivorisme**. La contamination se fait après l'ingestion de **kystes** contenus dans les viandes parasitées (ovins, bovins, volailles...) consommées crues ou saignantes. Les formes latentes du toxoplasme (bradyzoïtes) présentes dans les kystes sont néanmoins sensibles à la congélation, à la salaison et à une température de 67°C pendant 3 minutes (Dubey and Beattie, 1988).

Une troisième source de contamination est la transmission materno-foetale dite transmission verticale. Les tachyzoïtes présents pendant la période initiale de l'infection sont

capables de passer la barrière placentaire et sont ainsi responsables de la contamination foetale.

A la suite de la transmission des parasites dans l'organisme, l'infection se manifeste différemment en fonction du statut immunologique de l'hôte infesté.

Chez des **sujets immunocompétents**, la primo-infection conduit à des formes **bégnines** souvent **asymptomatiques**. L'efficacité de la réponse immune et le rapide enkystement des parasites dans les tissus nerveux et musculaires empêchent le développement d'une pathologie. Les parasites persistent dans l'organisme sous la forme de kystes durant toute la vie de l'hôte (Ambroise-Thomas et Garin, 1984).

Cette parasitose peut cependant s'avérer particulièrement dramatique, d'une part, lors de la **toxoplasmose congénitale**, et d'autre part, chez les **sujets immunodéficients** (Ambroise-Thomas et Pelloux, 1993a).

B) La toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale est consécutive au passage transplacentaire du parasite au cours d'une primo-infection pendant la grossesse. En France 45,7 % des femmes enceintes examinées ont une sérologie négative pour la toxoplasmose (Ancelle *et al.*, 1996). Une femme sur deux est susceptible de faire une séroconversion au cours de sa grossesse. La transmission maternofoetale du toxoplasme n'est pas systématique. Elle se produit dans 45 % des cas de séroconversion et représenterait de un à trois cas pour 1000 naissances (Dupouy-Camet *et al.*, 1993).

Les parasites se disséminent dans l'organisme et peuvent atteindre le placenta. Le développement des parasites dans le placenta va conduire à la fragilisation progressive de la barrière placentaire (Berrebi *et al.*, 1992 ; Couvreur, 1993 ; Mirlesse *et al*, 1993). A la suite de sa rupture, les toxoplasmes vont atteindre le fœtus.

La gravité de l'atteinte et la fréquence de la contamination dépendent essentiellement de la date de l'infection maternelle et du traitement mis en oeuvre (figure 14) (Thulliez, 1993).



<u>Figure 14 :</u> Gravité de l'atteinte fœtale en fonction de la date de primo-infection pendant la grossesse (D'après Remington and Desmonts, 1983).

L'atteinte est peu fréquente, mais d'autant plus sévère que la grossesse est peu avancée au moment de la contamination. La période dangereuse se situe au cours du premier trimestre. Pendant cette période, l'atteinte du fœtus conduit à des lésions et à des malformations neurologiques ou viscérales graves (tropisme cérébral, calcifications intracrâniennes...) (Fortier and Ajana, 1992). L'infection précoce du fœtus peut dans les cas extrêmes conduire à l'avortement spontané.

Alors que la fréquence de contamination augmente avec l'âge du fœtus, les atteintes qu'elle provoque sont cependant moins sévères avec le temps. En effet, plus tard dans la grossesse (au cours des deuxième et troisième trimestres), l'affection conduit rarement à des atteintes graves au niveau oculaire (choriorétine) et viscéral (foie, rate). Ces atteintes peuvent se manifester *in utero* par un retard de croissance ou parfois des années après la naissance pour les cas de choriorétinite (Marx-Chemla *et al.*, 1993 ; Bloch-Michel *et al.*, 1992)

C) La toxoplasmose de l'immunodéprimé

Cette parasitose peut également prendre des formes particulièrement dramatiques chez des **sujets immunodéprimés** atteints d'une toxoplasmose acquise à la suite de la rupture des kystes (Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993b).

La toxoplasmose de "l'immunodéprimé" se produit à la suite de l'altération des défenses immunitaires contre le toxoplasme. Le déficit de l'immunité anti-toxoplasmique entraîne une reprise de la multiplication des parasites. La toxoplasmose de "l'immunodéprimé" est souvent associée à une infection concomitante à virus à ADN (Cyto-mégalovirus) ou à ARN (tel que VIH pour virus d'immunodéficience humaine responsable du SIDA, syndrome d'immunodéficience acquise). On la rencontre aussi dans les cas de transplantation d'organes et de greffes de moelle osseuse.

a) Cas des malades du SIDA

Les toxoplasmoses liées à une infection à VIH se déclarent après une réactivation endogène des kystes tissulaires concomitante d'un effondrement de l'immunité cellulaire.

Chez les sujets sidéens, la **toxoplasmose cérébrale** est l'infection toxoplasmique la plus fréquemment développée (Jones *et al.*, 1996 ; Holliman and Greig, 1997). Des toxoplasmoses extra-cérébrales (rétiniennes, pulmonaires, gastriques...) ont été observées, mais celles-ci sont très rares au cours du SIDA (May *et al.*, 1993).

Les conséquences sont particulièrement graves, voire même mortelles dans le cas du SIDA (Luft and Remington, 1992). En effet, l'encéphalite toxoplasmique est la seconde maladie opportuniste liée à l'infection par le VIH (Ragnaud *et al.*, 1993). La fréquence d'apparition de la maladie est variable et dépend de la séroprévalence toxoplasmique des patients. L'encéphalite toxoplasmique concerne 20 à 47 % des patients infectés par le VIH (environ 30 % en France) en l'absence d'un traitement prophylactique efficace (Leport and Remington, 1992; Morlat *et al.*, 1993). En l'absence de traitement, la toxoplasmose cérébrale évolue vers une encéphalite toxoplasmique mortelle.

La mise en place d'un traitement prophylactique est donc basé sur un diagnostic rapide et efficace. Ce traitement doit être spécifique et maintenu afin d'éviter toute réactivation toxoplasmique.

b) Cas des transplantés et des greffés

Chez ces sujets immunodéprimés, la pathologie peut se développer soit lors d'une primo-infection consécutive à une transplantation cardiaque ou cardio-pulmonaire, soit lors d'une réactivation d'une toxoplasmose acquise lors de greffe d'organes.

Le risque de transmission parasitaire est de 57 % lors d'une **transplantation** cardiaque (Luft *et al.*, 1983 ; Wreghitt *et al.*, 1989).

Dans le cas de **greffes d'organes**, les patients recevant le greffon d'un sujet séropositif pour *T. gondii* sont exposés au risque de toxoplasmose grave. La réactivation des kystes présents dans l'organe greffé est, de plus, amplifiée par les immunosuppresseurs administrés pour prévenir le rejet de la greffe.

Le risque de réactivation existe également lors de la transplantation d'organes d'un donneur séronégatif pour la toxoplasmose à un receveur séropositif. La greffe de moelle osseuse chez un sujet séropositif pour *T. gondii*, est responsable d'une toxoplasmose viscérale dans 80 % des cas (Derouin *et al.*, 1992). Il peut se produire, au cours de la transfusion de leucocytes provenant d'un donneur non immunisé, une réactivation des kystes tissulaires chez le receveur. D'ailleurs, le traitement d'irradiation auquel est soumis le receveur avant la greffe provoque un déficit d'immunitaire du sujet favorisant cette réactivation (Derouin *et al.*, 1990). Les manifestations sont alors graves, disséminées dans l'organisme et la mise en place d'un traitement thérapeutique anti-toxoplasmique spécifique est difficile

2) Facteurs influençant la pathogénie

La gravité des manifestations cliniques développées au cours de la toxoplasmose dépend de caractères multiples. Ces caractères trouvent à la fois leur origine chez l'hôte infecté (en fonction de l'espèce infectée et au sein d'une même espèce en fonction des facteurs génétiques et de son statut immunologique) et chez le parasite (selon la souche, la taille de l'inoculum, la voie d'infection).

A) Facteurs liés à l'hôte

a) Facteurs génétiques

Chez la souris

Le modèle murin est un bon modèle pour étudier le rôle des facteurs génétiques de l'hôte sur la pathogenèse puisque la sensibilité des souris selon les lignées est très variable (Araujo *et al.*, 1976). En effet, alors que l'inoculation de la souche ME49 (non virulente) par voie intrapéritonéale provoque soit, la mort, soit, la présence de kystes cérébraux chez les souris BALB/c, les souris CBA/Ca survivent à l'infection aiguë, mais meurent de toxoplasmose cérébrale deux mois après l'infection. Les mécanismes de résistance impliqués dans les phases aiguë et chronique de l'infection sont différents. Les différences de sensibilité de l'infection aiguë chez la souris impliquent plusieurs gènes. Un de ces gènes est lié au locus H-2 qui code pour les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Suzuki *et al.*, 1993). La résistance à la phase chronique de l'infection toxoplasmique est liée à la présence d'un ou plusieurs gènes localisés dans la région H-2D du CMH. Les souris portant l'allèle H-2D^d survivent à l'infection chronique par *T. gondii*, alors que les souris possédant les allèles H2-D^b ou H2-D^k sont sensibles (Suzuki *et al.*, 1991).

Chez l'homme

Bien que la prévalence à la toxoplasmose augmente, dans tous les pays, avec l'âge des personnes, il n'existe aucune prédisposition génétique évidente (Ashburn, 1992). Cette prévalence plus élevée reflèterait plus d'un problème d'exposition que de susceptibilité.

b) Statut immunitaire

La pathologie liée à l'infection par *T. gondii* varie également dans son expression et sa gravité en fonction du statut immunologique de l'hôte infecté. La susceptibilité est plus grande chez des jeunes animaux que chez les adultes (Dubey and Beattie, 1988). Cette caractéristique est particulièrement prononcée chez les nouveaux nés et explique en partie la sévérité de la pathologie qui peut se produire lors des infections congénitales. De même, la défaillance du système immunitaire de l'hôte, entraîne la recrudescence d'une infection acquise et se caractérise par la réactivation des parasites enkystés.

Chez un **individu immunocompétent**, l'immunité anti-toxoplasmique contrôle rapidement la phase aiguë de la maladie et une éventuelle réinfection. Bien que la réponse immune permette d'éliminer la majorité des parasites, leur enkystement dans les tissus nerveux et musculaires lors de la phase chronique les rend inaccessibles aux mécanismes effecteurs de l'immunité. L'immunité acquise lors de la primo-infection est dite de **prémunition** (Capron and Dessaint, 1988). Elle permet, en effet, le contrôle de la réactivation ultérieure des parasites enkystés ainsi que la mise en place d'une protection totale durable et spécifique contre toute réinfection (Remington and Krahenbuhl, 1982).

Cette immunité implique, à la fois, une réponse immune humorale et cellulaire, mais il est vraisemblable que la réponse à médiation cellulaire soit prépondérante (Johnson, 1990).

b.1) L'immunité humorale

La transmission et la multiplication intracellulaire du parasite s'accompagne progressivement d'une augmentation du taux des anticorps. Ces anticorps circulants constitueraient une première barrière de défense de l'organisme. Le rôle protecteur des anticorps anti-*T. gondii* a été étudié dans de nombreux modèles animaux (Ridel *et al.*, 1988 ; Mineo *et al.*, 1993). Ces anticorps circulants permettent un suivi sérologique de l'infection et leur détection est à l'origine de l'élaboration de nombreux tests de diagnostic de la toxoplasmose.

Chez l'homme, la cinétique de la réponse humorale lors de la primo-infection implique l'apparition de différentes classes d'immunoglobulines. L'homme se contamine généralement par voie orale, les immunoglobulines de type IgA, IgE et IgM sont les premières à apparaître et sont le signe de l'infection aiguë (Chardès *et al.*, 1993 ; Pinon *et al.*, 1990). Les IgA et IgE sont très tôt détectées au cours de la première semaine d'infection puis elles disparaissent progressivement après trois à quatre mois. Ces deux classes d'immunoglobulines constituent d'excellents marqueurs de la phase aiguë de la maladie (Huskinson *et al.*, 1990 ; Decoster *et al.*, 1992).

Les anticorps anti-*T. gondii* interviennent dans la destruction des parasites extracellulaires par un mécanisme de lyse complément-dépendante (Sabin and Feldman, 1948). Ils sont également impliqués dans les mécanismes d'ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) : les anticorps fixés à la surface parasitaire facilitent la pénétration des toxoplasmes par phagocytose dans les cellules (Joiner *et al.*, 1990 ; Mordue and Sibley, 1997). Au cours de cette phagocytose par les macrophages, la vacuole créée lors de l'internalisation du parasite s'acidifie et fusionne avec les lysosomes (Sibley *et al.*, 1985). Ces mécanismes facilitent l'activité cytotoxique des macrophages lors de l'opsonisation des parasites (Ridel *et al.*, 1988).

Les anticorps circulants peuvent également inhiber la pénétration du parasite dans la

cellule-hôte. Ils pourraient, en effet, se fixer sur les antigènes impliqués dans l'invasion cellulaire bloquant la pénétration du parasite (Mineo *et al.*, 1993).

b.2) L'immunité cellulaire

Bien que l'immunité humorale joue un rôle important dans la défense de l'organisme, elle n'est pas suffisante pour enrayer l'évolution de la maladie. Un contrôle efficace de l'infection nécessite une intervention majeure de **la réponse cellulaire** (Johnson, 1990). La réponse cellulaire implique la participation de nombreuses cellules immunitaires (figure 15).

* Les macrophages

La pénétration dans les **macrophages** peut se faire soit **par pénétration active**, soit par **phagocytose**. Lorsque le parasite pénètre activement dans le macrophage, il se trouve dans une vacuole parasitophore évitant ainsi la fusion avec les lysosomes et peut s'y multiplier comme dans n'importe quelle autre cellule (Nichols and O'Connor, 1981 ; Sibley *et al.*, 1985 ; Morisaki *et al.*, 1995 ; Mordue and Sibley, 1997). Par contre, lorsque le parasite est **phagocyté**, **les macrophages sont activés** et sont capables d'éliminer les parasites ou d'inhiber leur multiplication. La phagocytose des macrophages est processus plus lent (120 secondes) que la pénétration active (30-40 secondes) (Werk, 1985). Ce processus ne nécessite pas une orientation particulière du parasite par rapport à la cellule et se produit via les récepteurs Fc de la cellule-hôte (Joiner *et al.*, 1990 ; Joiner and Dubremetz, 1993). Au cours de cette opsonisation, aucune sécrétion de protéines parasitaires contenues dans les organites de sécrétion (micronèmes, rhoptries et ganules denses) n'a été observé (Joiner, 1993). Le parasite est alors entouré d'un phagosome qui va fusionner avec les lysosomes provoquant sa destruction (Sibley *et al.*, 1993).

Au cours de la réponse développée contre le parasite, l'activation de la fonction cytotoxique des macrophages est une étape importante. Les facteurs intervenant dans cette activation ne sont pas clairement déterminés. L'interféron- γ (IFN γ) est la principale cytokines impliquée dans l'activation des macrophages murins *in vitro* et *in vivo* ainsi que des macrophages humains *in vitro* (Murray *et al.*, 1985a, b).Cependant, il semblerait que l'IFN γ agisse en collaboration avec un second signal, tel que le TNF α ("Tumor Necrosis Factor") ou l'IFN β afin de développer d'une activité anti-toxoplasmique (Sibley *et al.*, 1991b ; Schmitz *et al.*, 1989).

Les mécanismes développés par les macrophages pour détruire ou ralentir la multiplication de *T. gondii* sont multiples. Ils mettent en oeuvre, -i) des **mécanismes** oxydatifs responsables de la production des dérivés de l'oxygène (H_2O_2 , O_2 ...) (Nathan, 1983)



<u>Figure 15</u>: Schéma des interactions établies entre les différents types cellulaires intervenant dans les mécanismes à médiation cellulaire au cours de l'infection par *T. gondii* (D'après Sher *et al.*, 1992).

; Sibley *et al.*, 1993) mais également -ii) des mécanismes **non oxydatifs**. L'un de ces mécanismes non oxydatif implique la **dégradation du tryptophane** de la cellule hôte (qui est un acide aminé indispensable dans la survie intracellulaire du parasite (Pfefferkorn, 1984; Murray *et al.*, 1989).

L'activité anti-toxoplasmique des macrophages impliquerait un autre mécanisme non oxydatif associé à un dérivé de la lipoxygénase (Yong *et al.*, 1994). Dans ce cas, la lyse des parasites est induite par le produit majeur de la lipoxygénase, le **leukotriène** (LTB4).

* Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺

+ Chez la souris

L'importance des lymphocytes T dans la réponse à médiation cellulaire a été appréhendée dans le modèle **murin**.

Dans ce modèle, les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ interviendraient de façon synergique dans la protection contre *T. gondii* tant dans le contrôle de la phase aiguë que dans l'immnunité à la réinfection. Il semblerait néanmoins que les $CD8^+$ joueraient un rôle prépondérant. Le rôle prépondérant des lymphocytes T $CD8^+$ a été mis en évidence après le transfert de cellules spléniques issues, d'une part, de souris immunisées avec la souche thermosensible Ts4 (Suzuki and Remington, 1988) ou avec l'antigène SAG1 (Khan *et al.*, 1991), et d'autre part, issues de souris infectées (Parker *et al.*, 1991).

Les **lymphocytes T CD8**⁺ interviendraient en induisant une activité cytotoxique soit directement sur les parasites extracellulaires (Khan *et al.*, 1988 ; 1990) soit sur les cellules infectées telles que les monocytes ou les macrophages (Hakim *et al.*, 1991 ; Kasper *et al.*, 1992).

Les lymphocytes CD4⁺ sont constitués des sous-populations Th1 et Th2. Ces deux sous-populations se différencient par leur production de cytokines et par leurs propriétés fonctionnelles.

Les lymphocytes **Th1** jouent un rôle important dans la réponse à médiation cellulaire. Ils interviennent notamment dans la différenciation et la prolifération des lymphocytes T et dans l'activation des macrophages et des cellules LAK ("Lymphokine Activated Killer"). Les lymphocytes Th1 entraînent la production d'IFN γ et de l'interleukine-2 (IL-2).

Les lymphocytes **Th2** interviendraient dans la production d'anticorps. Ils induisent la production de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-10.

Dans le cas de l'infection toxoplasmique chez la souris, la résistance développée

contre le parasite est associée à une réponse Th1 (Gazzinelli et al., 1991, 1992a, 1993b).

En effet, les lymphocytes T provenant de souris immunisées avec la souche thermosensible Ts4 (stimulées in vitro avec des antigènes parasitaires) produisent de l'IFN γ , de l'IL-2, de l'IL-5 et peu d'IL-4(Gazzinelli *et al.*, 1991).

De même, l'infection de souris avec des kystes (de la souche ME49 par voie intrapéritonéale) conduit une induction des cytokines produites par les Th1 au niveau de la rate (Gazzinelli *et al.*, 1992a).

Le rôle protecteur exercé par les lymphocytes $T CD4^+$ et $CD8^+$ dans le contrôle du nombre de kystes a également été observé lors de déplétions sélectives *in vivo*. En effet, la déplétion des lymphocytes CD4⁺ (Araujo, 1991) ou des lymphocytes CD8⁺ (Brown and Mc Leod, 1990) transforme des souris résistantes (c'est-à-dire contenant peu de kystes dans le cerveau) en des souris sensibles (contenant de nombreux kystes).

+ Chez l'homme

L'homme contrairement au modèle murin est très résistant à l'infection par *T. gondii*. En effet, les souris sont très sensibles lors de l'infection aiguë et meurent dans les dix jours qui suivent l'infection par *T. gondii*. Par contre, la réponse immune développée chez l'homme contrôle rapidement la phase aiguë de l'infection. Quelque soit la virulence de la souche parasitaire, les sujets survivent à la primo-infection et développent une toxoplasmose chronique asymptomatique. Cependant, les mécanismes immunitaires mis en oeuvre chez l'homme sont peu connus. Il semblerait que chez l'homme, il existe une prépondérance des lymphocytes T CD4⁺. D'ailleurs, ces lymphocytes T CD4⁺ montrent une activité cytotoxique (Yang *et al.*, 1995).

* Les cellules LAK ("Lymphokine Activated Killer")

Les cellules LAK font partie d'une famille hétérogène. Cette famille comprend à la fois des cellules NK ("Neutral Killer" telles que les CD3-, CD5-) et des cellules T $\gamma\delta$. Ces lymphocytes T $\gamma\delta$ pourraient induire, via leur cytokines (TNF α et IFN γ) l'expression d'une "Heat Shock Protein" de 65 kDa (Hsp65) à la surface des macrophages activés (Kaufmann and Kabelitz, 1991 ; Nagasawa *et al.*, 1994 ; Hisaeda *et al.*, 1995). Le rôle de cette protéine dans les mécanismes de protection contre *T. gondii* n'est pas bien connu. Sa présence à la surface des macrophages stimulerait le système immunitaire (Nagasawa *et al.*, 1992). Elle pourrait également stimuler l'activité anti-toxoplasmique des macrophages par la production de TNF α et d'IL6 (Peetermans *et al.*, 1995) et inhiber l'apoptose des cellules infectées par une souche avirulente (Hisaeda *et al.*, 1997).

* Les cytokines

Différentes cytokines sont impliquées dans la réponse immune contre le parasite. Cependant, parmi les cytokines, l'IFN γ joue un rôle primordial dans cette protection (Pfefferkorn, 1984 ; Suzuki *et al.*, 1988 ; Suzuki and Remington, 1990 ; Dimier and Bout, 1997).

L'IL-12 est une cytokine majeure dans la régulation de la réponse anti-*T. gondii*. Cette cytokine sécrétée par les macrophages activés par les antigènes parasitaires est responsable de la production d'IFN γ par les cellules T (CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$) et les cellules NK (Gazzinelli *et al.*, 1994 ; Schartonkersten, 1995 ; Schartonkersten *et al.*, 1995).

L'IFN γ serait essentiellement produit par les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ pendant la phase aiguë de l'infection (Gazzinelli *et al.*, 1991 ; Sher *et al.*, 1993). D'autres cellules comme les lymphocytes T CD4⁺ ou les cellules T $\gamma\delta$ sont également capables de produire cette cytokine (Yang *et al.*, 1995). Le rôle présumé de cette cytokine serait d'activer un grand nombre de cellules dont les macrophages et de faciliter l'activité cytotoxique de ces cellules (Gazzinelli *et al.*, 1993a).

D'autres cytokines telles que l'IL-2, l'IL-7, l'IL-15, IL-1 β (Hunter *et al.*, 1995) interviendraient dans la réponse immune mise en oeuvre contre le parasite en favorisant notamment la production de l'IFN γ (Hunter *et al.*, 1994 ; Khan and Kasper, 1996).

Parallèlement à cette activité stimulatrice induite par les différentes cytokines sur la production d'IFN γ , IL-12, une activité immunorégulatrice des macrophages est observée. Cette activité impliquerait l'intervention de cytokines telles que **l'IL-10** (Gazzinelli *et al.*, 1992b). L'IL-10 est, en effet, capable d'abolir la production d'IFN γ en inhibant la synthèse d'IL-12 par les macrophages (D'Andrea *et al.*, 1993). Cette action immunorégulatrice semble nécessaire pour éviter un certain déséquilibre de la réponse immunitaire qui provoquerait des réactions inflammatoires excessives (Gazzinelli *et al.*, 1996).

B) Facteurs liés au parasite

a) Chez la souris

Les différentes études réalisées chez la souris ont permis de différencier les souches de *T. gondii* en fonction de leur virulence. En effet, selon les manifestations pathologiques induites chez la souris, deux phénotypes (virulent et non virulent) se sont distingués. La virulence d'une souche de toxoplasme chez la souris est basée sur sa capacité à provoquer sa mort après un challenge par voie intra-péritonéale avec des tachyzoïtes. Ainsi, une souche est définie comme virulente, lorsque 100 % des souris infectées meurent dans les 6 à 10 jours suivant l'infection intra-pérotonéale d'un inoculum < 10 parasites (DL 100 <10). L'infection des souris avec une souche virulente, ne permet pas l'enkystement des toxoplasmes dans les différents tissus. La souche virulente la plus utilisée en laboratoire est la souche RH (Sabin, 1941 ; Roos *et al.*, 1994). Par contre, l'infection aiguë qui est rapidement contrôlée par un système immunitaire vigoureux (Sumyuen *et al.*, 1995). La mort des souris provoquée par une souche non virulente est observée 10 à 20 jours après l'infection de 10^2 à 10^5 tachyzoïtes (Howe and Sibley, 1994).

Les progrès réalisés dans l'étude de la génétique moléculaire des toxoplasmes ont permis de mettre en évidence une bonne corrélation entre la virulence chez la souris et les analyses du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP : "restriction fragment lengh polymorphism"). Ainsi, le locus du gène SAGI est un bon marqueur pour étudier la virulence des souches. Deux allèles ont été identifiés. Alors que l'un de ces allèles est uniquement présent dans les souches virulentes, l'autre est trouvé dans les souches non virulentes (Sibley and Boothroyd, 1992c). L'analyse des régions 5' et 3' du gène SAGI a également révélé un polymorphisme entre les souches virulentes et non virulentes (Rinder et al., 1995 ; Windeck and Gross, 1996). D'ailleurs, l'expression plus élevée de l'ARNm SAGI dans les souches virulentes. De plus, l'analyse RFLP du locus de différents gènes codant, soit pour des protéines connues, comme la protéine de surface SAG2 (Parmley et al., 1994a), la protéine de rhoptrie, ROP1 (Howe and Sibley, 1994) et la protéine de granules denses, GRA4 (Meisel et al., 1996). soit pour le locus 850 (Sibley et al., 1992b, 1992c) a confirmé la corrélation entre la virulence chez la souris et les profils RFLP obtenus.

Enfin, la combinaison des études immunologiques (recherche des différences antigéniques) (Ware and Kasper, 1987 ; Weiss *et al.*, 1988 ; Gross *et al.*, 1991), biochimiques (iso-enzymatiques) (Dardé *et al.*, 1992.; Dardé, 1996) et génétiques (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction ou RFLP et par amplification génomique aléatoire ou RAPD) (Cristina *et al.*, 1991 ; Sibley *et al.*, 1992b, 1992c ; Guo and Johnson, 1995) a permis de caractériser les souches de toxoplasmes en fonction de leur virulence chez la souris. L'ensemble de ces analyses a révélé que la structure génétique de la population de *T. gondii* est de type clonal. *T. gondii* comprend trois lignées clonales prédominantes (Howe and Sibley, 1995 ; Sibley and Howe, 1996) et de manière étonnante plus de 95 % des isolats peuvent être répertoriés dans l'une de ces trois lignées. Une corrélation frappante est observée entre les lignées parasitaires et la virulence. En effet, alors que les souches du premier groupe

(groupe I), sont très virulentes chez la souris et sont responsables d'une parasitémie élevée, les souches des groupes II et III, sont non virulentes chez la souris. D'ailleurs, ces parasites s'enkystent rapidement et sont responsables d'infections chroniques chez la souris.

b) Chez l'homme

L'infection par *T. gondii* ne conduit pas toujours au développement d'une pathologie. En effet, 45 % des femmes enceintes qui ont été infectées par le toxoplasme au cours de leur grossesse vont transmettre le parasite au fœtus. La contamination du fœtus provoquent soit, *in utero*, des lésions neurologiques ou viscérales graves, soit, après la naissance, à la suite de réactivation de kystes, des atteintes au niveau oculaire (choriorétine) (Bloch-Michel *et al.*, 1992). De même, chez les sujets atteints de SIDA, seul 30 % des patients infectés de façon chronique vont développer une pathologie sévère au niveau du système nerveux central liée à la réactivation des foyers kystiques (Luft and Remington, 1992).

Les différences marquées de la sévérité de la maladie suggèrent l'influence probable du génotype des souches dans la pathogénicité. D'ailleurs, une corrélation a été observée entre le génotype parasitaire et la maladie (figure 16) (Howe and Sibley, 1995). En effet, la plupart des **toxoplasmoses humaines** (toxoplasmoses congénitales et dans le cas de patients atteints de SIDA) sont causées par des souches du **groupe I** et **du groupe II** alors que les souches **du groupe III** sont plus souvent associées aux **toxoplasmoses animales** qu'aux toxoplasmoses humaines. Cependant, une relation entre la susceptibilité de l'hôte à l'infection et le pouvoir pathogène d'une souche n'a pas été clairement établie dans la toxoplasmose humaine. Ceci est en partie lié à l'impossibilité de déterminer le génotype des souches lors d'infections chroniques asymptomatiques.


Groupe de souche

Figure 16 : Fréquence des trois groupes de souches de *T. gondii* dans les infections humaines et animales (D'après Howe and Sibley, 1995).

Les souches du groupe I sont plus souvent associées aux toxoplasmoses congénitales humaines que animales. La plupart des cas de toxoplasmose chez l'homme sont causés par des souches du groupe II. Ces souches sont plus présentes dans les cas de patients atteints de SIDA que chez les animaux. Par contre, les souches du groupe III sont plus souvent associées aux toxoplasmoses animales.

Contexte des travaux

La base du succès du parasitisme intracellulaire strict de *T. gondii* est de se développer au sein d'une vacuole parasitophore, néoformation essentiellement parasitaire dont une caractéristique majeure est d'être isolée du trafic vésiculaire de la cellule hôte. Parmi les trois organites sécrétoires du toxoplasme (micronèmes, rhoptries, granules denses) impliqués dans l'invasion et l'installation des parasites dans la cellule hôte, le rôle des granules denses serait d'assurer la maturation finale de la vacuole en un compartiment métabolique fonctionnel. C'est dans ce contexte que notre laboratoire a concentré depuis plusieurs années son activité de recherche sur l'analyse du trafic intracellulaire et intra-vacuolaire des protéines de granules denses (protéines GRA), la recherche des signaux qui régulent leur sécrétion et enfin, sur l'étude de leur rôle sur les fonctions cellulaires (développement intracellulaire, fonctions immunitaires et physiopathologie de l'hôte infecté). Certaines de ces questions ont pu être abordées par la mise en place des outils de transgénose des toxoplasmes, tout récemment développés (Kim *et al.*, 1993; Soldati *et al.*, 1995 ; Donald and Roos, 1998).

Ces travaux ont permis de montrer que les protéines GRA sont stockées et stabilisées dans les granules denses à la fois sous forme soluble et dans des agrégats hydrophobes (Sibley *et al. 1995*, Lecordier *et al.*, 1999 ; Labruyère-Dadaglio *et al., sous presse*).

Suite à leur sécrétion sous forme soluble dans la vacuole, les protéines GRA sont ciblées de façon spécifique vers des domaines distincts du compartiment vacuolaire (revue Cesbron-Delauw, 1994). Certaines comme GRA1 demeurent solubles dans la matrice de la vacuole mais la plupart se retrouvent étroitement associées, soit à la membrane délimitante de la vacuole (GRA3, GRA5 et GRA7), soit aux membranes du réseau intravacuolaire (GRA2, GRA4 et GRA6). L'étude du trafic et de l'association membranaire des protéines GRA2 et GRA5 a permis de démontrer chez le Toxoplasme, l'existence d'un système de sécrétion particulier permettant au parasite d'exporter sous forme soluble des protéines membranaires, dont des protéines transmembranaires. Une fois sécrétées sous forme soluble dans la vacuole parasitophore, ces protéines subissent un changement de conformation qui leur permet de s'associer aux membranes vacuolaires (Mercier *et al., 1998a*, Lecordier *et al., 1999*).

Les travaux publiés ces dernières années par le laboratoire au sujet des protéines GRA ont permis une étude descriptive détaillée de leur gène (revue Cesbron-Delauw; 1994; Lecordier *et al., 1995*) et de leur promoteur (Lefebvre-Van Hende, Mercier *et al., 1996*) ainsi que de leur route de sécrétion et de leur trafic dans la vacuole. Mais à ce jour leur fonction biologique demeure inconnue. De par leur localisation et leur cinétique d'apparition dans la vacuole ainsi que par leur persistance lors de la formation du kyste (Lecordier *et al., 1995*), ces protéines pourraient jouer un rôle majeur dans les échanges établis entre le toxoplasme et sa cellule-hôte et de ce fait, participeraient au développement de la pathogénicité des toxoplasmes.

Objectifs des travaux

Dans ce cadre, la première partie de mes travaux de thèse avait pour objectif d'appréhender le rôle de deux protéines de granules denses, GRA5 et GRA6, dans la virulence parasitaire par :

- l'étude de leur expression et leur polymorphisme dans des souches de toxoplasmes virulentes et non virulentes
- l'obtention de mutants déficients pour l'expression de GRA5 et GRA6 par l'invalidation de leur gène et l'étude de leur phénotype *in vitro* et *in vivo*.

Dans une seconde partie, mes travaux concernaient la poursuite des recherches du laboratoire sur les mécanismes d'insertion membranaire post-sécrétoire des protéines GRA dans la vacuole parasitophore. Ils se sont orientés vers l'étude du ciblage membranaire différentiel des protéines de granules denses GRA5 et GRA6 au sein de la vacuole parasitophore.

Mes travaux visaient à l'identification du (ou des) domaine(s) protéique(s) impliqués dans ce tropisme membranaire spécifique par l'étude de la localisation membranaire de constructions chimériques GRA5- GRA6- (c'est-à-dire des constructions où les domaines hydrophiles N et C-terminaux et/ou des régions transmembranaires étaient échangés).

Résultats

I - Etude du polymorphisme des protéines de granules denses GRA5 et GRA6 de différentes souches de toxoplasmes

Afin d'appréhender le rôle des protéines de granules denses GRA5 et GRA6 dans la virulence parasitaire, nous avons, dans un premier temps, recherché s'il existait un **polymorphisme** pour ces protéines dans différentes souches parasitaires.

La plupart de ces souches provenaient d'isolats humains (13 souches/18) recueillis principalement en Amérique du Nord et en Europe. Sur la base de données génétiques (RFLP), biochimiques (zymodème) et phénotypiques (virulence chez la souris), elles ont pu être répertoriées dans les trois groupes de génotype décrits (Howe and Sibley, 1995). Le groupe I est représenté par un échantillon de 7 souches virulentes chez la souris (RH-Lille, RH-Stockholm, RH 88, BK, FAJI, MOR, HIV Vienne). Les groupes II et III qui rassemblent les souches dites non-virulentes sont représentés par 6 souches pour le groupe II (Prugniaud, 76K, NTE, DX Bonn, ALT Berlin, 177 Berlin) et de 3 souches (C, C56, NED) pour le groupe III (tableau I).

Deux souches (PMR et KB Vienne) n'étaient pas classifiées. De plus, pour certaines souches l'analyse RFLP était incomplète. La première étape de ce travail a donc consisté en l'analyse du génotype de plusieurs de ces souches disponibles au laboratoire.

1) Analyse du génotype des souches.

Le génotype des souches PMR, KB Vienne, RH, 76K, Prugniaud, C et C56 a été réalisé par l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP : "Restriction Fragment Length Polymorphism"). Cette technique permet une analyse des profils de restriction engendrés à la suite de la digestion de l'ADN. Les profils sont révélés en utilisant des marqueurs spécifiques. Dans notre étude, les loci SAGI et 850 ont été utilisés comme marqueurs du polymorphisme pour analyser le génotype des souches (Sibley and Boothroyd, 1992b, 1992c). Dans un premier temps, les locus des gènes SAGI et 850 ont été amplifiés par PCR ("Polymerase Chain Reaction": réaction d'amplification en chaîne) à partir de l'ADN génomique isolé de chacune des souches à l'aide d'oligonucléotides spécifiques (section Matériels et Méthodes I.3). Les fragments d'ADN amplifiés ont ensuite été digérés par des enzymes de restriction spécifiques, *Rsa*I et *Sau*96I pour le gène 850 ou *Dde*I et *Sau*96I pour le gène *SAG1*. Les fragments polymorphiques d'intérêt ont été révélés par Southern Blot après l'hybridation des membranes contenant les fragments d'ADN digérés avec les sondes *SAG1* ou 850.

Les ADN génomiques utilisés proviennent des souches RH (groupe I), Prugniaud et 76K (groupe II), C et C56 (groupe III) ainsi que celui des souches KB et PMR non classifiées. Les loci *SAG1* et *850* ont ensuite été amplifiés à l'aide des couples d'oligonucléotides P30.3/P30.5 pour le locus *SAG1* et P850.1/P850.2 pour locus *850* (Sibley and Boothroyd, 1992b, 1992c). Les profils de restriction des produits d'amplification PCR ont été analysés par les enzymes *DdeI*, *Sau*96I (locus *SAG1*) et *RsaI*, *Sau*96I (locus *850*) (figures 17a et 17b). Les souches RH. C, C56 (contrôles) présentent des profils RFLP attendus (figures 17a et 17b, pistes 1, 6 et 7). Dans le cas des souches 76K et Prugniaud, les profils RFLP de type II attendus au locus *SAG1* sont confirmés (figure 17a, pistes 4 et 5) et les profils RFLP obtenus pour le locus *850* (figure 17b, pistes 4 et 5) sont également de type II. Ceci confirme l'appartenance de ces souches au groupe II.

Les profils RFLP (locus 850 et SAGI) obtenus pour les souches KB et PMR, non encore classifiées, sont de type I (figures 17a et 17b, pistes 2 et 3). Ce résultat ainsi que la réactivité avec l'anticorps monoclonal anti-P22 (tableau 1) confirme l'appartenance de ces deux souches au groupe I.

2) Analyse du polymorphisme des protéines

Des études précédentes réalisées dans le laboratoire ont permis le clonage et la caractérisation moléculaire de quatre protéines GRA (GRA1, GRA2, GRA5 et GRA6) (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989 ; Mercier *et al.*, 1993 ; Lecordier *et al.*, 1993, 1995). L'étude de l'expression de ces protéines GRA dans chacune des souches a été réalisée par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques dont nous disposions dans le laboratoire. Les protéines de granules denses GRA1, GRA2, GRA5 et GRA6 sont bien détectées dans chacun des trois groupes (résultats non présentés). Cependant, alors que le profil de migration des protéines GRA1 et GRA2 était identique, les protéines GRA5 et GRA6 présentaient un polymorphisme de taille entre les trois groupes (figure 18).

De manière frappante, les deux protéines présentaient des caractéristiques de migration communes. Leur poids moléculaire restait inchangé dans les souches appartenant à un même groupe. De plus, les profils de variation de leur taille entre les trois groupes étaient similaires : en effet, alors que dans le groupe I, les protéines GRA5 et GRA6 migraient à un poids moléculaire apparent de 21 kDa et 32 kDa respectivement, elles présentaient toutes les deux dans le groupe II un poids moléculaire plus élevé (22 kDa pour GRA5 et 34 kDa pour GRA6). Dans le groupe III, elles migraient à une taille plus basse avec 20 kDa pour GRA5 et 31 kDa pour GRA6.



Figure 17a: RFLP locus gène SAG1, digestions par RsaI et Sau961



Figure 17b: RFLP locus gène 850, digestions par Rsal et Sau961

<u>Figure 17</u>: Profils de la taille des fragments à la suite du polymorphisme de restriction au locus des gènes 850 et SAG1 de 7 souches de *T. gondii*.

Le locus du gène a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique d'une souche virulente (la souche RH), de quatre souches non virulentes (Prugniaud, les souches 76K, C et C56) et de deux souches dont la virulence n'est pas déterminée (les souches KB Vienne et PMR). L'ADN amplifié a été digéré par les enzymes de restriction *DdeI* et *Sau96*I pour l'étude du locus *SAG1* (Figure 17a) et par *Rsa*I et *Sau96*I pour le locus *850* (Figure 17b). L'ADN digéré a été séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose puis tranféré sur une membrane de nylon. Les membranes ont été incubées avec des sondes marquées au \Box [³²P] provenant soit de l'insert amplifié et purifié du gène *850* (RH) soit de celui du gène *SAG1* (RH). La taille des fragments polymorphiques a été indiquée en paires de bases.

Les profils de restriction attendus pour chaque enzyme au locus des gènes *SAG1* et *850* dans les trois types de souches ont été représentés à la gauche de chaque blot.

Souches	virulence	SAG1	850	P22	Zymodème
RH (F) RH (N) BK (A) FAJI (F) RH 88 (USA) MOR (F) HIV (A)	V V V V V V V	1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 ND	+ + + + + +	1 1 1 1 1 1
Prugniaud (F) DX (All) NTE (All) 177 (All) ALT (All) 76K (F)	NV NV NV NV NV NV	2 2 2 2 2 2 2	ND 2 2 ND ND ND		2 2 2 ND 2 2
C56 (USA) NED (F) C (USA)	NV NV NV	2 2 2	3(1?) 3 3	+ + +	3 3 3
KB (A) PMR (F)	ND ND	ND ND	ND ND	+ +	ND ND

Tableau 1 : Résumé des données immunologiques et génétiques pour 18 souches de T. gondii.

L'ensemble de ces données a permis de classifier les souches en trois groupes génotypiquement distincts. Le groupe I est représenté par sept souches (RH Lille, RH Stockholm, BK, FAJI, RH88,MOR, HIV, NED et PMR), le groupe II par six souches (Prugniaud Lille, DX Bonn, NTE, 177 Berlin, ALT Berlin, 76K) et le groupe III par trois souches (C56, NED, C USA). De plus, malgré les données de réactivité avec P22, deux des souches de notre étude (KB Vienne et PMR) n'ont pu être répertoriées dans l'un des trois groupes.

Les souches virulentes chez la souris sont désignées par "V" et les souches non virulentes par "NV".

Le "+" indique que chacun des quatre anticorps réagissaient avec la protéine de surface P22 (ou SAG2) des lysats des souches par immunoblot (Parmley *et al.*, 1994a). Les allèles ont été répertoriés sur la base des caractères RFLPs détectés à partir de l'ADN amplifié pour chacun des loci des gènes *SAG1*et 850 (Sibley and Boothroyd, 1992). Les caractères phénotypiques ont été représentés par les zymodèmes (Dardé *et al.*, 1992). Lorsque des données sont absentes, celles-ci ont été indiquées par la notation "ND".



Figure 18 : Analyse par immunoblot de l'expression des protéines GRA5 et GRA6 de souches de *T. gondii* provenant des trois groupes génotypiques.

Les lysats des souches du groupe I (KB Vienne, PMR, RH Lille, RH Stockholm, BK, FAJI, RH88, MOR et HIV), du groupe II (Prugniaud Lille, DX Bonn, NTE, 177 Berlin, ALT Berlin et 76K) et du groupe III (C56, NED et C USA) ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions réduites puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 3000^{ème}, soit avec le sérum de souris anti-GRA6 recombinante dilué au 1500^{ème} puis avec l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris dilué 1000^{ème}. Les signaux ont été révélés par chimioluminescence.

Le polymorphisme de taille observé pour les protéines GRA5 et GRA6, associé au polymorphisme génique aux locus *SAG1* et *850*, a donc permis d'ajouter un nouveau marqueur polymorphique au tableau de classification (**Tableau 2**). Ce marqueur corrèle avec les autres marqueurs utilisés et permet de distinguer les trois groupes génotypiques précédemment décrits.

3) Analyse du polymorphisme génétique

Des études précédentes réalisées dans le laboratoire avaient permis la caractérisation moléculaire des gènes de granules denses GRA5 (Lecordier *et al.*, 1993) et GRA6 (Lecordier *et al.*, 1995) de la souche RH européenne appartenant au groupe I. Ces données nous ont permis de cloner et séquencer les gènes GRA5 et GRA6 de souches type II et III.

A) Clonage et séquençage des gènes GRA5 et GRA6 de différentes souches.

Les gènes GRA5 et GRA6 des souches des groupes II et III ont été isolés suivant la stratégie de clonage décrite en figure 19. Les gènes clonés provenaient des souches 76K et Prugniaud pour le groupe II et des souches C et C56 pour le groupe III. Ces constructions possèdent la région 5' non traduite (notée 5' UT pour "untranslated" : non traduite), le cadre de lecture ouvert et la région 3' non traduite (3' UT) du gène. Elles ont été obtenues après amplification de l'ADN génomique des toxoplasmes à l'aide des oligonucléotides créant aux extrémités 5' et 3' des régions environnantes, le site de restriction XhoI pour GRA5 et le site de restriction EcoRI pour GRA6 pour une manipulation ultérieure plus facile de ces gènes. Les couples d'oligonucléotides utilisés pour les amplifications sont les suivant : P21.19 et P21.20 pour le gène GRA5 et P32.11 et P32.12 pour le gène GRA6 (section Matériels et Méthodes I.3). La taille des fragments issus de cette amplification a été vérifiée sur un gel d'agarose. Ces produits d'amplification présentaient des extrémités franches qui ont permis leur clonage dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+) digéré par SfrI. Les gènes clonés ont ensuite été séquencés dans les deux sens en utilisant des oligonucléotides qui permettaient de parcourir de proche en proche la séquence des gènes. Les séquences obtenues ont été alignées puis comparées grâce à un programme d'analyse informatique à la séquence connue de la souche RH européenne du groupe I (logiciels DNA Star et Omiga).



Figure 19 : Stratégie de clonage des gènes *GRA5* et *GRA6* de *T. gondii* dans le vecteur plasmidique pPCR Amp Script SK(+).

La région 5' non traduite (5' UT), le cadre de lecture ouvert (ORF : open reading frame) et la région 3' non traduite (3' UT) des gènes GRA5 et GRA6 ont été amplifiés à partir de l'ADN génomique des souches 76K et Prugniaud pour le groupe II et des souches C et C56 pour le groupe III. L'amplification a été réalisée à l'aide des oligonucléotides P21.19 et P21.20 pour le gène GRA5 et P32.11 et P32.12 pour le gène GRA6. Ces oligonucléotides ont été choisis pour créer aux extrémités 5' et 3' des régions environnantes, le site de restriction XhoI pour GRA5 et le site de restriction EcoRI pour GRA6 pour une manipulation ultérieure plus facile de ces gènes. Les produits d'amplification présentaient des extrémités franches qui ont permis leur clonage dans le vecteur pPCR Amp Script SK(+) préalablement digéré par SfrI. Les constructions obtenues ont été appelées GRA5 (ou GRA6)- nom de la souche (du site de démarrage de la transcription au poly A) dans pPCR Amp Script SK(+).

B) Analyse des séquences

a) Gène GRA5 (figures 20, 21 ; tableaux 4a, 4b)

La séquence du gène GRA5 de la souche RH (groupe I) (Lecordier et al., 1993 ; GenBank numéro d'accession : L06091) a été comparée aux séquences obtenues pour les souches 76K et Prugniaud du groupe II et à celles des souches du groupe III C et C56 (figure 20). L'analyse des séquences GRA5 a révélé que les cadres de lecture ouverts étaient identiques (363 pb) dans les souches des trois groupes. L'alignement des séquences nucléotidiques a révélé une très grande conservation de la séquence à l'intérieur d'un même groupe avec 99,72 % d'homologie entre les souches 76K et Prugniaud pour le groupe II et 100 % d'homologie entre les souches C et C56 pour le groupe III (tableau 4a). La comparaison des séquences entre les trois groupes a également mis en évidence une grande conservation. En effet, lorsque la séquence de la souche RH (groupe I) est prise comme référence, une homologie de plus de 97 % et 99 % est observée avec les souches du groupe II et avec les souches du groupe III, respectivement. L'homologie est plus importante entre les souches des groupes I et III (supérieure à 99 %) qu'entre les souches des groupes I et II (environ 98 %). Les groupes II et III sont plus divergents (environ 97 % d'homologie). Ainsi, alors que les bases modifiées sont les mêmes à l'intérieur d'un groupe à l'exception d'une thymidine dans la souche 76K, les substitutions observées entre les groupes II et III sont à chaque fois différentes. Cette différence a également été observée lorsque celle-ci se produit en une même position, c'est le cas, par exemple, en position 124 où l'adénine (de la séquence RH) est remplacée par une thymidine dans le groupe II et par une guanine le groupe III. La séquence du gène GRA5 présente 9 bases substituées dans la souche 76K (groupe II) et 3 dans les souches du groupe III. Dans la plupart des cas, une adénine est remplacée par une guanine (44,4 % et 66,7 % pour les groupes II et III respectivement

La recherche de sites de restriction différentiels entre les trois groupes a révélé (tableau 3).

Groupe	Souche	RH	Souche 76K	Prugniaud	Souche C	Souche C56
Groupe I	RH	100,00	2,20	1,93	0,83	0,83
Creating II	Souche 76K	97,80	100,00	0,28	2,75	2,75
Groupe II	Prugniaud	98,07	99,72	100,00	2,50	2,50
Carry III	Souche C	99,17	97,25	97,50	100,00	100,00
Groupe III	Souche C56	99,17	97,25	97,50	100,00	100,00

Tableau 4a : Pourcentage d'homologie des séquences ADN du gène GRA5.

La principale substitution correspond au remplacement d'un A par une G dans :

- 44,44 % des cas pour les souches 76K et Prugniaud/RH.

- 66,67 % des cas pour les souches C et C56/ RH.

Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	ATGGCGTCTGTAAAACGCGTCGTTGTGGCGGTAATGATCGTGAACGTGCTGGCTTTAATTTTTGT
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud Souche C : Souche C56 :	GGGCGTTGCCGGTTCAACGCGTGACGTGACGTAGGGGGCCAGGCGGGGATGACTCCGAAGGTGCTAGGGGGGC T
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	GTGAACAACAAGGTACAACAACACGAACAAAATGAAGACCGATCGTTATTCGAAAGGGGAAGA GGGG
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	GCAGCGGTGACTGGACATCCAGTGAGGACTGCAGTGGGACTTGCTGCAGCTGTGGTGGCCGTTGT
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	GTCACTACTGCGATTGTTGAAAAAGGAGGAGAAGAAGACGCGCGATTCAAGAAGAAGAGAGCAAGGAGTCTG GGGG
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	CAACCGCGGGAAGAGGGAAGAAGTTGCCGAGGAAGAGTAA 363 bases 363 bases

<u>Figure 20 :</u> Comparaison des séquences ADN du gène *GRA5* chez cinq souches de *T. gondii* réparties dans les trois groupes.

Les séquences ADN du gène *GRA5* obtenues chez les souches 76K et Prugniaud pour le groupe II et chez les souches C et C56 pour le groupe III ont été alignées à celle déjà publiée de la souche RH du groupe I (Lecordier *et al.*, 1993). Les bases qui sont identiques par rapport à celles de la souche RH prise comme référence ont été notées "-".

Enzymes	Position par rapport à l'ATG, en pb				
Lizymes	Groupe I	Groupe II	Groupe III		
BpuAl	174, 298	174	174, 298		
Cfol	299	299	104, 299		
Mae1	123	/	/		
Mae11	45, 90	45, 83 (Souche 76 K)	45, 90		
MluI	16, 83	16, 83 (Souche 76 K)	16, 83		
$\lambda \Lambda val$	18, 85, 297, 299,	18, 85 (Souche 76	18, 85, 104, 297,		
1/1///1	332	к), 297, 299, 332	299, 332		

<u>Tableau 3 :</u> Analyse des sites de restriction différentiels dans le gène *GRA5* entre les trois groupes.

Toutes les substitutions à l'exception de la dernière guanine pour les souches du groupe II conduisent à une modification de la séquence protéique primaire avec six acides aminés différents dans la souche Prugniaud (groupe II) et trois dans les souches du groupe III. Afin, de rechercher l'existence de différences de la taille de la région codante, l'analyse de la région 5' non traduite n'a pas révélé la présence d'un codon d'initiation (ATG) supplémentaire. De même, les substitutions nucléotidiques ne créent pas un codon de terminaison entraînant ainsi une terminaison prématurée de la synthèse protéique. La longueur de la séquence primaire de la protéine GRA5 est donc identique (120 aa) pour chacune des souches (figure 21). La plupart des acides aminés substitués est présente dans la région N terminale de la protéine, à l'exception d'une substitution dans les souches du groupe II, où la lysine (K_{94}) a été remplacée par une arginine (R), qui se trouve après la région transmembranaire. Comme pour les substitutions nucléotidiques, les acides aminés substitués sont dans tous les cas différents entre les groupes II et III. Les substitutions en acides aminés ne provoquent pas une forte divergence de la séquence protéique primaire puisqu'une homologie supérieure à 94 % et de 97,50 % a été observée avec les souches du groupe II et avec les souches du groupe III respectivement (tableau 4b). La séquence est très conservée à l'intérieur d'un même groupe, par contre de faibles divergences sont constatées entre les trois groupes. L'homologie est la plus grande entre les souches des groupes I et III avec 97,50 % d'homologie contre plus de 92 % entre les souches des groupes II et III.

D'un point de vue fonctionnel, on note d'une part l'absence de substitutions dans les deux régions hydrophobes et d'autre part, la présence d'une région polymorphique dans la région N-terminale, après le site de clivage potentiel du peptide signal. En comparaison avec la séquence de type I, on remarque que sur les six substitutions observées dans la séquence

Site de clivage potentiel



<u>Figure 21 :</u> Comparaison des séquences en acides aminés déduites du cadre de lecture ouvert du gène *GRA5* chez cinq souches de *T. gondii* réparties dans les trois groupes.

Les séquences protéiques primaires déduites du gène *GRA5* obtenues chez les souches 76K et Prugniaud pour le groupe II et chez les souches C et C56 pour le groupe III ont été alignées à celle de la souche RH du groupe I. Les acides aminés identiques à ceux de la souche RH prise comme référence ont été notés "-". Les acides aminés substitués conservatifs ont été indiqués en couleur, alors que les substitutions non conservatives sont représentées en couleur.

des protéines GRA5 de type II, trois sont conservatives. Les trois autres concernent des acides aminés chargés remplacés par des acides aminés hydrophobes dans la séquence de type II (R_{42} / W_{42} ; R_{44} / G_{44} ; E_{53} / G_{53}). Pour la séquence de type III, sur trois substitutions, deux sont conservatives, la troisième correspond également au remplacement un acide aminé chargé par un hydrophobe (R_{42} / G_{42}).

Groupe	Souche	RH	Souche 76K	Prugniaud	Souche C	Souche C56
Groupe I	RH	100,00	5,83	5,00	2,50	2,50
Comment	Souche 76K	94,17	100,00	0,83	7,50	7,50
Groupe II	Prugniaud	95,00	99,17	100,00	6,67	6,67
Comuna III	Souche C	97,50	92,50	93,33	100,00	100,00
Groupe III	Souche C56	97,50	92,50	93,33	100,00	100,00

<u>Tableau 4b</u>: Pourcentage d'homologie des séquences en acides aminés de la protéine GRA5.

b) Gène GRA6 (figures 22, 23 ; tableaux 5a, 5b)

Le séquençage du gène *GRA6* a tout d'abord révélé la présence de deux erreurs de séquences au niveau de la séquence *GRA6* de la souche RH (groupe I) publiée (Lecordier *et al.*, 1995, GenBank numéro d'accession : L33814). La séquence *GRA6* corrigée a ensuite été comparée aux séquences obtenues pour les souches 76K et Prugniaud du groupe II et à celles des souches C et C56 du groupe III (**figure 22**). La situation est plus polymorphique que pour le gène *GRA5* puisque dans un même groupe, certaines bases sont substituées dans une souche et pas dans l'autre. La comparaison des séquences nucléotiques des souches des groupes I et III a révélé 8 et 9 substitutions (souche C et C56), ce qui se traduit par plus de 98 % d'homologie (**Tableau 5a**). Par contre, pour le gène *GRA6* de type II, la présence à la fois de 10 et 11 substitutions (76K, Prugniaud) et de délétions sont responsables d'une plus grande divergence des séquences de type II avec les types I et III (**tableau 5a**). Ainsi, bien que la taille de la région codante (693 pb) soit identique dans les souches des groupes I et III, celle-ci est plus courte de 18 nucléotides dans la région 3' terminale pour les souches du groupe II.

La recherche de sites de restriction différentiels entre les trois groupes a également révélé un polymorphisme plus important que celui observé pour le gène *GRA5*. Ceci a été mis en mis en évidence par la présence de sites uniquement dans un groupe de souches, comme ceux reconnus par les enzymes *Sma*I et *Xma*CI pour le groupe II et par *BssH*II pour le groupe III. De plus, certains sites de restriction permettent de différencier les groupes sur la base de leur existence ou de leur localisation différentielle dans le gène *GRA6* (tableau 6).

Type I Type II Type III Type I	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 : Souche RH :	ATGGCACACGGTGGCATCCATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCCTGTAACTGTCTCCACAGTTGCTGTGGTCTTTGTAGTCTTC
Type II Type III	Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	G
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	AGCGGTGGACAGCAAGAAGCAGTGGGGGACCACTGAAGACTATGTCAACTCTTCGGCGATGGGCGGTGGCCAAGGCGACTCGTTAGCT
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	GAAGATGATACAACCTCCGAAGCGGCGAGGGGGGGCGACGTTGACCCTTTTCCCGTGCTGGCGAATGAGGGGGAAGTCGGAGGCGCGTGGC T T T
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	CCGTCGCTCGAGGAAAGAATCGAAGAACAGGGGCACAAGACGACGTTACTCCTCTGTTCAAGAACCACAAGCGAAGGTGCCTAGCAAAC GGG
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	GAACACAGAAACGCCACAGACTCATTGGTGCTGTGGTGTTGGCAGTATCTGTGGCAATGCTTACCGCTTTCTTCTTCGAAGGACTGG
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	ACGACGCTCTCCCCAAGAACCATCTGGGGATGGTGGTGGGAATGATGCAGGCAG
Type I Type II Type III	Souche RH : Souche 76K : Souche Prugniaud : Souche C : Souche C56 :	TACGGAGGCAGAGGTGAAGGAGGAGGAGGAGGATGACAGGCGCCCGTTGCACCCGGAACGTGTGAATGTGTTTGATTATTAA 693 bases

Figure 22 : Comparaison des séquences ADN du gène *GRA6* chez cinq souches de *T. gondii* réparties dans les trois groupes.

Les séquences ADN du gène *GRA6* obtenues chez les souches 76K et Prugniaud pour le groupe II et chez les souches C et C56 pour le groupe III ont été alignées à celle déjà publiée de la souche RH du groupe I (Lecordier *et al.*,1995). Les bases qui sont identiques par rapport à celle de la souche RH prise comme référence ont été notées "-".

Une région de délétion a été observée dans l'extrémité 3' terminale du gène des souche 76K et Prugniaud (groupe II). Les bases délétées ont été représentées par l'absence de notation dans cette région.

% de divergence

Groupe	Souche	RH	Souche 76K	Prugniaud	Souche C	Souche C56
Groupe I	RH	100,00	4,04	4,18	1,15	1,30
Correct II	Souche 76K	95,96	100,00	0,43	4,47	4,62
Groupe II	Prugniaud	95,82	99,57	100,00	4,62	4,76
C III	Souche C	98,85	95,53	95,38	100,00	0,14
Groupe III	Souche C56	98,70	95,38	95,24	99,86	100,00

% d'homologie

Tableau 5a : Pourcentage d'homologie des séquences ADN du gène GRA6.

% de divergence

Groupe	Souche	RH	Souche 76K	Prugniaud	Souche C	Souche C56
Groupe I	RH	100,00	7,39	7,83	2,61	3,04
Constant	Souche 76K	92,61	100,00	1,30	7,39	7,83
Groupe II	Prugniaud	92,17	98,70	100,00	7,83	8,26
с ш	Souche C	97,39	92,61	92,17	100,00	0,43
Groupe III	Souche C56	96,96	92,17	91,74	99,57	100,00

% d'homologie

Tableau 5b : Pourcentage d'homologie des séquences en acides aminés de la protéine GRA6.

Enzymes	Position par rapport à l'ATG, en pb					
Enzymes	Groupe I	Groupe II	Groupe III			
AcyI	652	634	/			
AflIII	670	/	670			
AvaI	356	356, 646	356			
<i>BssH</i> II	/	/	652			
FokI	566, 656	638	566, 656			
MaeIII	35, 49, 392, 611	35, 392	35, 392, 611			
NarI	652	634	/			
SmaI	/	648	/			
XmaCI	/	646	/			

<u>Tableau 6 :</u> Analyse des sites de restriction différentiels dans le gène *GRA6* entre les trois groupes.

La protéine GRA6 est composée de 230 acides aminés pour les souches des groupes I et III et de 224 acides aminés pour les souches du groupe II. De la même manière que pour GRA5, à l'exception de la deuxième thymidine en position 84 dans les souches du groupe II qui remplace une cytosine (groupe I), toutes les substitutions nucléotidiques sont responsables d'un changement de la composition en acides aminés (figure 23).

D'un point de vue fonctionnel, la séquence des deux régions hydrophobes n'est pas modifiée. La région N- terminale (en amont du domaine transmembranaire) est peu polymorphe. Par contre la région C- terminale constitue une région très polymorphe dans la protéine GRA6. Dans les séquences type II, ce polymorphisme est particulièrement marqué avec notamment deux délétions (de 5 et 1 acides aminés) et d'autre part une importante modification à l'extrémité carboxy-terminale avec 4 substitutions non conservatives sur les 8 derniers acides aminés.

L'ensemble des résultats concernant l'étude génétique des gènes *GRA5* et *GRA6* a, d'une part, confirmé que le génome des toxoplasmes est peu polymorphe (Sibley and Boothroyd, 1992c ; Howe and Sibley, 1995 ; Sibley and Howe, 1996) et a, d'autre part, révélé un degré de divergence plus élevé pour les souches du groupe II.

Par contre, l'analyse des séquences, et en particulier celle concernant les séquences primaires, ne semble pas corréler avec le polymorphisme de taille observé. Ceci est particulièrement évident pour GRA6 dont le poids moléculaire augmente alors que le cadre de



Figure 23 : Comparaison des séquences en acides aminés déduites du cadre de lecture ouvert du gène *GRA6* chez cinq souches de *T. gondii* réparties dans les trois groupes.

Les séquences protéiques primaires déduites du gène *GRA6* obtenues chez les souches 76K et Prugniaud pour le groupe II et chez les souches C et C56 pour le groupe III ont été alignées à celle de la souche RH du groupe I. Les acides aminés identiques à ceux de la souche RH prise comme référence ont été notés "-". Les acides aminés substitués qui sont conservatifs ont été indiqués en couleur, alors que les substitutions non conservatives sont représentées en noir. Deux régions contenant 5 et 1 acides aminés délétés dans la partie C-terminale des souches 76K et Prugniaud du groupe II ont été représentées par l'absence de notation.

particulièrement évident pour GRA6 dont le poids moléculaire augmente alors que le cadre de lecture ouvert est plus court dans les souches du groupe II. Ces observations ainsi que la similitude de comportement électrophorétique des deux protéines suggéraient l'intervention de modifications post-traductionnelles différentielles.

4) Expression des protéines GRA5 et GRA6

Pour tester l'hypothèse d'une possible implication de modifications posttraductionnelles sur les variations de taille des protéines GRA5 et GRA6, les gènes GRA5 et GRA6 ont été exprimés *ex vivo* dans différentes souches de toxoplasme et *in vitro* dans un lysat de réticulocytes de lapin.

A) Expression "ex vivo"

L'étude de la taille des protéines GRA5 et GRA6 (type I et II) en fonction de la souche parasitaire ou ultérieurement après mutagenèse a été réalisée par transfection de toxoplasmes par diverses constructions. Cette étude a nécessité la construction de vecteurs d'expression permettant l'expression de la protéine d'intérêt en fusion avec un marqueur épitopique hétérologue, de façon à pouvoir la distinguer de son homologue sauvage exprimé de façon endogène dans les toxoplasmes transfectés.

Les travaux réalisés au laboratoire ayant validé l'utilisation du marqueur épitopique HA9 du virus de l'influenza (Wilson *et al.*, 1984 ; Mercier *et al.*, 1998a ; Lecordier *et al.*, 1999) chez le toxoplasme, nous avons poursuivi cette approche.

a) Constructions GRA5HA9 et GRA6HA9

Toutes les constructions plasmidiques utilisées dans cette étude ont été dérivées à partir de la construction GRA5HA9-RH (Lecordier *et al.*, 1999). Dans cette construction, le cadre de lecture ouvert du gène *GRA5* de la souche sauvage RH (type I) est flanqué en 5' du promoteur *GRA5* et de la région 5' UT *GRA5* et en 3', de la région 3' UT du gène *GRA2*. La région 5'*GRA5* (promoteur + 5' UT) permet un haut niveau d'expression en transfection transitoire (Mercier, Lefebvre-Van Hende *et al.*, 1996 ; Lefebvre-Van Hende, 1998).

Les constructions GRA5HA9-Prugniaud, GRA6HA9-RH et GRA6HA9-Prugniaud ont été dérivées à partir de GRA5HA9-RH. Ces trois constructions ont été obtenues par remplacement du cadre de lecture du gène *GRA5*-RH par celui des gènes d'intérêt (c'est-à-dire *GRA5*-Prugniaud, *GRA6*-RH ou *GRA6*-Prugniaud) (figure 24). Les cadres de lecture des



<u>Figure 24 :</u> Stratégie de clonage du cadre de lecture ouvert des gènes *GRA6*-RH, *GRA6*-Prugniaud et GRA5-Prugniaud dans le vecteur KS(+)-HA9.

UT : région transcrite et non traduite ; ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert) ; Prom. : promoteur.

différents gènes ont été obtenus par amplification par PCR à partir de l'ADN génomique des tachyzoïtes des souches RH (groupe I) ou Prugniaud (groupe II). Les oligonucléotides utilisés pour cette amplification ont été choisis pour créer en 5', au niveau du codon ATG, un site *BstE*II et en 3', au niveau du stop, un site *Nhe*I (section Matériels et Méthodes I.5). La taille des fragments amplifiés a été vérifiée sur un gel d'agarose. Les fragments PCR ont ensuite été sous clonés dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+) puis la séquence des gènes a été vérifiée par séquençage automatique. Les fragments *BstE*II-*Nhe*I générés ont été clonés dans le vecteur δ 6-GRA5HA9-RH à la place de la région codante du gène *GRA5*. Ce vecteur a été obtenu par mutagenèse à partir de la construction GRA5HA9-RH créant au niveau de l'ATG un site de restriction *BstE*II. Les profils de restriction des constructions (GRA5HA9-Prugniaud, GRA6HA9-RH et GRA6HA9-Prugniaud) ont alors été vérifiés par différentes digestions enzymatiques sur un gel d'agarose.

b) Expression transitoire dans les toxoplasmes

Les constructions GRA5HA9-RH et GRA6HA9-RH ont été transfectées transitoirement dans trois souches de toxoplasmes : la souche RH (groupe I), 76K (groupe II) et C (groupe III). L'expression de la protéine GRA6HA9-RH n'a pas pu être détectée par western blot en transfection transitoire. Ces expériences ont été répétées plusieurs fois dans la souche RH sans résultats. Il ne s'agissait pas d'un problème de construction mais plutôt d'un problème de sensibilité : en effet, l'expression transitoire de la protéine GRA6HA9-RH a pu être détectée par immunofluorescence (résultats non montrés). Par contre, l'expression des protéines GRA5HA9-RH et GRA5HA9-Prugniaud a pu être détectée par immunoblot après transfection transitoire dans la souche RH (figure 25a). Les deux protéines présentent la même variation de taille que celle observée pour les protéines sauvages. Ainsi, dans le contexte d'expression type I, la protéine GRA5 (groupe II) se comporte comme dans un contexte type II. De plus, la protéine GRA5HA9-RH a été exprimée dans des toxoplasmes de souche soit du groupe I ou du groupe II. Dans ces conditions la protéine a la même migration électrophorétique dans les deux souches (figure 25b). L'ensemble de ces résultats indique que les protéines GRA5 ne peuvent être modifiées différentiellement en fonction de la souche qui les exprime.

B) Expression in vitro

Afin de s'affranchir des problèmes de modifications post-traductionnelles, les protéines GRA5 (RH et Prugniaud) et GRA6 (RH et Prugniaud) ont été exprimées dans un système d'expression hétérologue *in vitro*.

L'expression des protéines GRA5 et GRA6 a été réalisée en utilisant le système de

63



<u>Figure 25a</u> : Analyse par immunoblot de l'expression transitoire de G5HA9-RH dans les souches RH (groupe I), 76K (groupe II) et C (groupes III).

Un lysat de 5.10⁷ tachyzoïtes issus de la transfection transitoire des souches RH, 76K et C par la construction plasmidique GRA5HA9-RH (groupe I) a été séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transféré sur des membranes de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec le sérum de lapin anti-HA9 dilué au 10000^{ème}.

Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation de la membrane avec un sérum de chèvre anti-IgG de lapin dilué au 10000^{ème} couplé à la péroxydase.



<u>Figure 25b</u> : Analyse par immunoblot de l'expression transitoire de GRA5HA9-RH et de GRA5HA9-Prugniaud dans le souche RH (groupe I).

Un lysat de 5.10⁷ tachyzoïtes issus de la transfection transitoire de la la souche RH par les constructions plasmidiques GRA5HA9-RH (groupe I) et GRA5HA9-Prugniaud (groupe II) a été séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transféré sur des membranes de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec le sérum de lapin anti-HA9 dilué au 10000^{ème}. Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation de la membrane avec un sérum de chèvre anti-IgG de lapin dilué au 10000^{ème} couplé à la péroxydase.

transcription/traduction *in vitro* dans un lysat de réticulocytes. Ce système d'expression *in vitro* permet de transcrire l'ARNm correspondant au gène puis d'exprimer le produit de traduction par un lysat de réticulocytes. Afin d'obtenir une molécule d'ARNm mature c'est-àdire polyadénylée, la transcription a été réalisée à partir des constructions plasmidiques précédemment clonées (figure 19). Ces constructions sont constituées du cadre de lecture et des régions 5' et 3' non traduites du gène. Les constructions sont placées sous le contrôle du promoteur de la T3 ou de la T7 ARN polymérase. L'analyse de la taille des produits obtenus, après l'étape de traduction dans le lysat de réticulocytes en présence de [³H]-leucine a été réalisée sur un gel de polyacrylamide.

La variation de migration électrophorétique des produits de traduction synthétisés *in vitro* (figure 26) est similaire à celle observée pour les protéines natives (figure 18).

Ces résultats indiquent que les variations de taille des protéines GRA5 et GRA6 ne résulteraient vraisemblablement pas de modifications post-traductionelles mais plutôt d'un changement conformationnel et/ou de l'état chargé des protéines suite aux substitutions en acides aminés.

5) Expression des protéines GRA5 et GRA6 mutées

L'influence de certains acides aminés dans la migration des protéines a été analysée en modifiant la séquence des gènes par mutagenèse dirigée puis en comparant la taille des protéines mutées à celle des protéines sauvages. Afin de différencier l'expression des protéines mutées de celle des protéines endogènes, un marqueur épitopique HA9 a été fusionné à l'extrémité C-terminale des protéines d'intérêt.

A) Mutagenèse des gènes GRA5 et GRA6

Les constructions de mutagenèse réalisées ont été exprimées chez des tachyzoïtes de la souche RH, afin de comparer leur poids moléculaire apparent avec les protéines GRA5HA9-RH et -Prugniaud et GRA6-RH.

Pour la protéine GRA5, la séquence d'un motif de 6 acides aminés, situé dans la région la plus polymorphique entre les trois groupes, en position 41, a été modifiée par mutagenèse à l'aide d'oligonucléotides (section Matériels et Méthodes I.5). Les différentes mutations ainsi que les constructions résultantes ont été résumées dans le **tableau** 7. Les produits issus de ces mutagenèses ont été vérifiés par séquençage. Les constructions réalisées ont été schématisées dans les **figures 27** et **28**.



Figure 26 : Transciption/traduction *in vitro* des gènes *GRA5* et *GRA6* des souches RH (groupe I) et 76 K (groupe II).

Les gènes *GRA5* et *GRA6* des souches RH (groupe I) et 76 K (groupe II) contenant le site de démarrage de la transcription, le cadre de lecture ouvert du gène ainsi que le poly A du gène ont été clonés dans le vecteur pPCR Amp Script SK(+) puis transcrits et traduits *in vitro* par un lysat de réticulocyteS de lapin en présence de $[^{3}H]$ leucine.

Nom de la construction	Motif
GRA5HA9-RH	GARGRE
GRA5HA9-Prugniaud	GAWGGE
µ1.GRA5HA9 -RH	GAWGGE
µ3.GRA5HA9-Prugniaud	GARGRE
µ4.GRA5HA9 -RH	GAWGRE
μ5.GRA5HA9- RH	GARGGE

<u>Tableau 7</u>: Résumé des constructions obtenues par mutagenèse d'un motif de 6 acides aminés de la protéine GRA5.



Figure 27 : Stratégie de mutagenèse de la construction GRA5HA9-RH type I dans le vecteur KS(+).

UT : région transcrite et non traduite ; ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert) ; Prom. : promoteur.



Figure 28 : Stratégie de mutagenèse de la construction GRA5-Prugniaud dans le vecteur KS(+).

UT : région transcrite et non traduite ; ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert) ; Prom. : promoteur.

Pour la protéine GRA6, l'analyse de la séquence en acides aminés a révélé la présence d'une région très polymorphe dans sa partie carboxy-terminale. En effet, dans le groupe II, l'analyse des séquences en acides aminés montre la présence dans cette région d'une part, de deux délétions (de 5 et 1 acides aminés) et d'autre part, de nombreuses modifications. Afin d'étudier le rôle de la région C-terminale de la protéine GRA6 du groupe II dans la différence de migration électrophorétique, une protéine recombinante –HA9 dans laquelle la partie C-terminale de la souche RH (groupe I) a été remplacée par celle de la souche Prugniaud (groupe II) a été réalisée (figure 29).

De la même manière que pour GRA5, une stratégie de mutagenèse a également été réalisée pour étudier l'influence des substitutions en acides aminés dans la protéine GRA6. Dans cette stratégie, seule la séquence du motif (DGGGND) de la souche RH (groupe I) a été remplacée par la séquence codant pour le motif (GGGGND) de la souche Prugniaud (groupe II). La réaction de mutagenèse dirigée a été vérifiée par séquençage. La construction obtenue a été appelée µ2. GRA6HA9-RH dans le vecteur KS (+) (figure 29).

B) Expression par le toxoplasme

Les constructions GRA5HA9 (GRA5HA9-RH, GRA5HA9-Prugniaud, µ1.GRA5HA9-RH, µ4.GRA5HA9-RH, µ5.GRA5HA9-RH et µ3.GRA5HA9-Prugniaud) ont ensuite été transfectées de façon transitoire dans la souche RH (groupe I), puis l'expression des protéines -HA9 a été détectée par immunoblot.

Par contre, des problèmes de détection se sont posés dans l'analyse des protéines GRA6HA9 exprimées transitoirement. Ceci nous a amenés à exploiter un système de transfection stable permettant un enrichissement des toxoplasmes ayant intégré le gène d'intérêt. Le système de sélection basé sur l'auxotrophie des toxoplasmes pour les purines a été utilisé. La construction plasmidique d'intérêt (GRA6HA9-RH, GRA6-RH/Cterm-Prugniaud-HA9-Prugniaud et µ2. GRA6HA9-RH) et le vecteur de sélection pmini-HXGPRT (Roos *et al.*, 1994) ont été co-transfectés dans une souche toxoplasmique déficiente en HXGPRT (hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoryltransférase) (Pfefferkorn et Borotz, 1994 ; Donald *et al.*, 1996). La déficience de la souche HXGPRT⁻ a été utilisée pour sélectionner les clones ayant intégré de façon stable, le gène de sélection *HXGPRT*. A l'issue de cette sélection, l'expression des protéines recombinantes a été analysée en comparaison avec les tachyzoïtes exprimant la protéine endogène (GRA5 ou GRA6HA9-RH et Prugniaud) fusionnée avec l'épitope HA9 à l'aide d'un sérum de lapin dirigé contre cet épitope.



Figure 29 : Stratégie d'obtention des constructions GRA6-RH dans le vecteur KS(+) par mutagenèse.

UT : région transcrite et non traduite ; ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert) ; Prom. : promoteur.

Dans le cas de l'étude de l'expression des protéines GRA5HA9, toutes les constructions (GRA5HA9-RH, GRA5HA9-Prugniaud, μ 1.GRA5HA9-RH, μ 4.GRA5HA9-RH, μ 5.GRA5HA9-RH et μ 3.GRA5HA9-Prugniaud) exprimées de façon transitoire par le toxoplasme ont été détectées par immunoblot (figure 30). De la même manière qu'un polymorphisme de taille a été observé lors de la migration électrophorétique entre les protéines endogènes des souches des groupes I et II, une variation de la taille des protéines GRA5HA9-RH et GRA5HA9-Prugniaud a été observée sur gel d'acrylamide. En effet, la protéine GRA5HA9-Prugniaud a un poids moléculaire plus élevé que celui de la protéine GRA5HA9-RH. Ce résultat confirme donc l'observation précédemment décrite lors de l'analyse de la protéine GRA5 endogène exprimée par différentes souches de toxoplasmes (figure 18).

Alors que dans le cas de la protéine μ 3.GRA5HA9-Prugniaud, deux acides aminés type I ont été créés, celle-ci présentait une migration électrophorétique similaire à celle de la protéine GRA5HA9-RH (groupe I). A l'inverse, l'expression de la protéine μ 1.GRA5HA9-RH, c'est-à-dire de la protéine possédant deux acides aminés type II, a été détectée à un po.Js moléculaire semblable à celui de la protéine GRA5HA9-Prugniaud (groupe II). De plus, l'expression des protéines GRA5HA9-RH ne contenant qu'un acide aminé modifié (μ 4.GRA5HA9-RH et μ 5.GRA5HA9-RH) a également été observée à une taille plus élevée que la protéine GRA5HA9-RH. Cependant, ces protéines recombinantes ne semblaient pas présenter une migration électrophorétique similaire à celle de la protéine GRA5HA9-Prugniaud.

Dans le cas de l'étude de l'expression des protéines GRA6HA9, bien que toutes les constructions (GRA6HA9-RH, GRA6HA9-Prugniaud, μ 2.GRA6HA9-RH et GRA6-RH/Cterm-Prugniaud-HA9-Prugniaud) aient été transfectées de manière stable dans les toxoplasmes, seule l'expression des constructions GRA6HA9-RH, μ 2.GRA6HA9-RH et GRA6-RH/Cterm-Prugniaud-HA9-Prugniaud a pu être détectée (figure 31). Jusqu'à présent, les différents systèmes d'expression employés ne nous ont pas permis de réaliser une étude complète. Cependant, l'analyse de la taille des produits exprimés nous a fourni quelques indications. En effet, la protéine recombinante contenant la région C-terminale de la protéine GRA6-Prugniaud a été détectée a une taille plus élevée que celle de la protéine GRA6HA9-RH. Par contre, l'expression de la protéine μ 2.GRA6HA9-RH, c'est-à-dire de la protéine où un acide aspartique (D, dans la séquence RH du groupe I) a été modifié en glycine (G, dans le groupe II) en position 184 n'a pas révélé de différence de migration par rapport à la protéine GRA6HA9-RH.

L'ensemble de ces résultats indique que la composition en acides aminés semble influencer la migration électrophorétique de la protéine GRA5. Dans le cas de la protéine GRA6, la région C-terminale, très polymorphe entre les trois groupes de souches, semble



<u>Figure 30 :</u> Analyse par immunoblot de l'expression transitoire de différentes constructions GRA5HA9.

Les lysats de 5.10⁷ tachyzoïtes issus de la transfection transitoire de la souche RH par les différentes constructions plasmidiques GRA5HA9 ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec le sérum de lapin anti-HA9 dilué au 10000^{ème}.

Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation de la membrane avec un sérum de chèvre anti-IgG de lapin dilué au 10000^{ème}, couplé à la péroxydase.



Protéines recombinantes -HA9

<u>Figure 31 :</u> Analyse par immunoblot de l'expression stable GRA6HA9-RH, µ2.GRA6HA9-RH et GRA6HA9-RH/Cterm-Prugniaud dans la souche RH.

Les lysats de 5.10⁷ tachyzoïtes issus de la transfection transitoire de la souche RH par les différentes constructions plasmidiques GRA6HA9 ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec le sérum de lapin anti-HA9 dilué au 10000^{ème}.

Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation de la membrane avec un sérum de chèvre anti-IgG de lapin dilué au 10000^{ème}, couplé à la péroxydase.
GRA6HA9-RH.

L'ensemble de ces résultats indique que la composition en acides aminés semble responsable de la différence de taille observée. Les variations de taille des protéines GRA5 et GRA6 dépendraient donc d'un changement conformationnel et/ou de l'état chargé des protéines.

II - Utilisation de la génétique inverse pour l'étude des protéines GRA

Les progrès réalisés en matière de manipulation génétique de *T. gondii*, notamment l'émergence de techniques de transfection et de transformation stable, ont permis d'appliquer avec succès l'utilisation de marqueurs de résistance à des drogues (Kim *et al.*, 1993; Donald and Roos, 1993). Le développement de ces techniques rendait possible l'accès direct à la fonction des protéines par double recombinaison homologue. La recombinaison homologue correspond à la manipulation génétique la plus simple permettant l'échange du gène d'intérêt par des séquences d'ADN exogène. C'est cette stratégie d'invalidation de gène que nous avons engagée pour l'étude du rôle des protéines GRA5 et GRA6.

Afin d'induire cet événement de double recombinaison homologue au locus du gène d'intérêt, **un appariement parfait** est nécessaire entre les régions 5' et 3' flanquantes du gène d'intérêt et celles de l'ADN exogène (figure 32). L'isolement des parasites recombinants est possible grâce à une sélection des parasites présentant le double événement de recombinaison homologue. Les systèmes de sélection employés le plus souvent sont basés sur la propriété de résistance à un antibiotique apporté par l'ADN exogène.

Une première partie de notre travail avait donc pour objectif de construire des plasmides contenant un gène de sélection encadré des régions 5' et 3' flanquantes des gènes *GRA5* et *GRA6* suffisamment grandes pour induire un événement de double recombinaison homologue dans leur locus. La fréquence de recombinaison homologue étant faible chez *T. gondii* (Donald and Roos, 1994), différentes approches (grandes régions flanquantes, piège à promoteur, double sélection) ont été employées. La mise au point d'un système de sélection optimal a ainsi permis d'obtenir un mutant déficient pour la protéine GRA5. Enfin, au cours de la seconde partie de notre travail, le phénotype de ce mutant déficient GRA5⁻ a été étudié *in vitro* et *in vivo* en comparaison avec le phénotype de la souche parentale et de la souche complémentée, toutes deux exprimant la protéine GRA5.

1) Détermination du nombre de copies des gènes

L'invalidation de gène peut se faire en une seule étape si le gène codant pour la protéine étudiée est présent en simple copie dans le génome. Bien que le génome de *T. gondii* soit haploïde, le nombre de copies des gènes *GRA5* et *GRA6* a tout d'abord été recherché par dot blot. Les études de southern blot réalisées sur l'ADN génomique suggéraient que ces gènes sont présents en simple copie (Lecordier *et al.*, 1993, 1995). L'ADN génomique de la souche



Figure 32 : Représentation schématique du double événement de recombinaison homologue induit par un vecteur plasmidique dit de remplacement.

La recombinaison homologue conduit à l'échange de fragments d'ADN entre des doubles brins possédant des séquences identiques. L'homologie entre les séquences d'ADN génomique et d'ADN plasmidique permet un remplacement du gène d'intérêt par un marqueur de sélection, le gène *CAT*. Ce marqueur de sélection confère aux toxoplasmes ayant intégré de manière stable ce gène, un phénotype résistant au chloramphénicol.

UT : région transcrite et non traduite ; ORF : cadre de lecture ouvert ; Prom. : promoteur.

RH a été purifié et sa concentration a été estimée. Des quantités croissantes de cet ADN génomique ainsi qu'un nombre connu de copies de vecteurs plasmidiques (LG7EcoRI/pUC19 pour le gène GRA5, G1PstI/pUC18 pour le gène GRA6 et le clone génomique P43.15 pour le gène SAG3) ont été déposés sur une membrane de nylon. Ces vecteurs plasmidiques ont été choisis car ils ne contiennent qu'une copie du gène GRA5, GRA6 ou SAG3 respectivement. Les membranes de nylon ont ensuite été hybridées à l'aide de sondes spécifiques correspondant à la séquence codante du gène GRA5, GRA6 ou SAG3 marquées au [³²P]. Le gène SAG3 a été utilisé comme contrôle puisque des études précedentes avaient montré que ce gène est présent en simple copie dans le génome des toxoplasmes (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994). Le signal révélé par la sonde SAG3 confirme la nature simple copie de ce gène. De la même façon, le signal obtenu avec les sondes GRA5 et GRA6 pour l'ADN génomique de *T. gondii* a été comparé à celui engendré par une gamme de dilution des plasmides correspondants. La comparaison des signaux a permis de confirmer que les gènes GRA5 et GRA6 sont présents en simple copie dans le génome du toxoplasme (figure 33).

2) Constructions et stratégies

Contrairement aux kineplastides chez lesquels l'intégration d'un ADN exogène se produit spontanément par recombinaison homologue (Eid, and Sollner-Webb, 1991; Cruz *et al.*, 1991), aucune évidence de recombinaison homologue n'a été observée chez *T. gondii*. Afin de sélectionner les parasites ayant intégré l'ADN exogène de façon stable au locus du gène d'intérêt, différentes approches ont été envisagées.

A) Sélection positive

La première approche envisagée est celle de la sélection positive. Le principe de cette sélection est basé sur la propriété de résistance à une drogue apportée par l'ADN exogène. Le marqueur de sélection issu du gène d'*E. Coli* codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) a déjà été employé avec succès chez *T. gondii* (Kim *et al.*, 1993). L'intégration du gène *CAT* dans le génome du toxoplasme confère aux parasites, un phénotype résistant au chloramphénicol. Par contre, les toxoplasmes n'ayant pas intégré le gène *CAT* de façon stable dans leur génome, sont éliminés sous l'effet du chloramphénicol après une quinzaine de jours de sélection. Cet antibiotique n'a pas un effet immédiat et bloque progressivement la synthèse des protéines. Toutes les approches que nous avons utilisées au cours de cette étude exploitent la propriété de résistance au chloramphénicol conférée par la chloramphénicol acétyl transférase.



<u>Figure 33 :</u> Recherche du nombre de copies des gènes *GRA5* et *GRA6* dans le génome des tachyzoïtes de la souche RH par dot blot.

Différentes concentrations d'ADN génomique et de vecteurs plasmidiques ont été déposées puis fixées sur membranes de nylon. Les membranes ont été hybridées avec des sondes nucléotidiques correspondant au cadre de lecture ouvert des gènes *GRA5*, *GRA6* et *SAG3*, marquées au [³²P]. Le nombre de copies des gènes *GRA5*, *GRA6* et *SAG3* a été déterminé en comparant les signaux avec ceux obtenus avec la gamme d'ADN plasmidique.

a) Stratégie des grandes régions flanquantes

Dans le but d'obtenir un mutant déficient pour l'expression des protéines GRA5 ou GRA6, l'ADN exogène introduit dans les parasites doit présenter une homologie suffisamment importante avec les séquences génomiques correspondantes pour induire un événement de double recombinaison homologue au locus du gène GRA5 ou GRA6. Les régions 5' et 3' génomiques des gènes GRA5 et GRA6 ont donc été clonées de façon à encadrer le cadre de lecture ouvert du gène de sélection bactérien CAT (constructions 5'GRA5/CAT/3'SAG1/GRA5 dans le vecteur SK(+) et 5'GRA6/CAT/3'GRA6 dans le vecteur pUC18). Ces plasmides contiennent le gène CAT encadré de 2,1 kb en 5' et 1,8 kb en 3', dans le cas de 5'GRA6/CAT/3'GRA6 dans le vecteur SK(+) et de 0,71 kb en 5' et 1,95 kb en 3', dans le cas de 5'GRA6/CAT/3'GRA6 dans le vecteur pUC18 (figures 35 et 37).

a.1) Construction GRA5

La construction GRA5 a été réalisée après le clonage de la région 5' environnante puis de la région 3' environnante dans le vecteur contenant le gène de sélection bactérien CAT (vecteur SAG1/2CAT, Soldati and Boothroyd, 1993). Les régions non codantes ont été amplifiées par PCR à partir du clone génomique GRA5 (L7HindIII dans le vecteur KS(+), Lecordier et al., non publié) disponible dans le laboratoire. Le fragment 5' non codant a été amplifié à l'aide des oligonucléotides P21.1 et T3 (section I.3.1 Matériels et Méthodes) amplifiant en 5' le polylinker du vecteur KS(+) contenant le site de restriction HindIII et créant en 3', au niveau de l'ATG, un site NsiI (figure 34, 1^{ère}étape). La taille du fragment amplifié a été vérifiée sur un gel d'agarose. Ces fragments ont ensuite été digérés par les enzymes HindIII et NsiI puis clonés en amont du gène CAT dans le vecteur SAG1/2CAT préalablement digéré par ces mêmes enzymes. Cette construction intermédiaire dans laquelle le cadre de lecture du gène GRA5 a été remplacé par celui du gène CAT a été appelée 5'GRA5/CAT/3'SAG1 dans le vecteur SK(+). La région 3' non codante a également été obtenue par amplification, à partir du clone génomique L7HindIII, à l'aide des oligonucléotides P21.5 et T7 (section I.3.1 Matériels et Méthodes) créant en 5', le site BamHI au niveau du codon stop et amplifiant en 3', le polylinker du vecteur contenant le site BamHI (figure 34, 2^{nde}étape). Après vérification de la taille de ce fragment sur un gel d'agarose, celui-ci a été digéré par l'enzyme de restriction BamHI avant d'être cloné dans le vecteur contenant la région 5' environnante (5'GRA5/CAT/3'SAG1) préalablement digéré par BamHI. Le vecteur ainsi obtenu a été baptisé 5'GRA5/CAT/3'SAG1/GRA5 dans le vecteur SK(+) (figure 35).





UT : région transcrite et non traduite ; ORF : cadre de lecture ouvert ; Prom. : promoteur.



Figure 35 : Construction 5'GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5 dans le vecteur SK(+) (7870 pb).

La région 5' environnante puis la région 3' environnante du gène *GRA5* digérée par les enzymes *Nsi*I et *Hind*III ou par *BamH*I et *Hind*III respectivement ont été clonées dans le vecteur SAG1/2CAT, contenant le gène de sélection bactérien *CAT*, préalablement digéré par ces même enzymes.

Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline ; LacZ : gène codant pour la β -D-galactosidase ; ORI : origine de réplication bactérienne ; f1(+) : origine de réplication du phage filamenteux f1.

a.2) Construction GRA6

La construction GRA6 a été réalisée par une stratégie dite de "PCR reverse". Elle permet, en une seule étape, le remplacement du cadre de lecture du gène GRA6 par la séquence codant pour le gène CAT, dans le clone génomique GRA6 contenu dans le vecteur pUC18 (G1PstI dans le vecteur pUC18, Lecordier *et al.*, 1995) (figure 36). Les amorces oligonucléotidiques (P32.1 et P32.8, section I.3.1 Matériels et Méthodes) ont été choisies de façon à générer au niveau de l'ATG de GRA6, un site enzymatique NsiI et au niveau de son codon stop, un site *PacI*. La PCR a été réalisée en utilisant comme matrice, le vecteur G1PstI/pUC18 et l'ADN polymérase Deep Vent_r (exo⁻) (New England Biolabs) qui permet l'amplification de longs fragments d'ADN. Le fragment amplifié contient donc la région 5' flanquante du gène GRA6, la totalité du plasmide pUC18 puis la région 3' flanquante du gène GRA6. La taille du fragment engendré, d'une longueur de 5 kb, a été vérifiée sur un gel d'agarose. Ce fragment amplifié a alors été digéré par les enzymes NsiI et PacI permettant le clonage du cadre de lecture du gène CAT préalablement excisé à partir du plasmide SAG1/2CAT (Soldati and Boothroyd, 1993) grâce à ces mêmes enzymes. La construction obtenue a été nommée 5'GRA6/CAT/3'GRA6 dans le vecteur pUC18 (figure 37).

a.3) Recherche des clones recombinants

Afin de sélectionner les parasites n'exprimant plus les protéines GRA5 et GRA6, les constructions précédemment réalisées (5'GRA5/CAT/3'SAG1/GRA5 dans le vecteur SK(+); 5'GRA6/CAT/3'GRA6 dans le vecteur pUC18) ont été transfectées par électroporation dans des tachyzoïtes de la souche RH. Les plasmides ont été introduits dans les toxoplasmes sous forme linéaire (10, 50 ou 100 µg) et sous forme circulaire (50 µg). Après deux jours de culture des toxoplasmes sur des cellules fibroblastiques, la pression de sélection a été appliquée par addition de chloramphénicol à la culture. Cette pression a été maintenue pendant 10 à 12 jours de culture in vitro ce qui permet aux parasites résistants à cette drogue de se multiplier pendant deux à trois cycles. Après 10 à 12 jours de culture, la population des parasites résistant au chloramphénicol est individualisée par dilution limite en plaque de 96 puits. Les parasites contenus dans les puits où une seule plage de lyse a été observée, c'est-à-dire provenant d'un seul individu, ont ensuite été amplifiés. Le criblage des parasites recombinants clonés a été réalisé par immunoblot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines GRA5 ou GRA6. Bien que tous les clones testés (une cinquantaine dans le cas de GRA6 et plus de 150 dans le cas de GRA5) étaient résistants au chloramphénicol et avaient donc probablement intégré le gène CAT dans leur génome, aucun d'entre eux n'était déficient pour l'expression de GRA5 ou GRA6 (figure 38).

71



<u>Figure 36 :</u> Stratégie de clonage de grandes régions flanquantes du gène *GRA6* par "PCR reverse" dans le vecteur pUC18 : construction du plasmide 5'GRA6/CAT/3'GRA6 dans le vecteur pUC18.

UT : région transcrite et non traduite ; ORF : cadre de lecture ouvert ; Prom. : promoteur.



Figure 37 : Construction 5'GRA6/CAT/3'GRA6 dans le vecteur pUC18 (5940 pb).

La séquence codante du gène *CAT* digérée par les enzymes *Nsi*I et *Pac*I a été clonée en remplacement du cadre de lecture du gène *GRA6* dans le clone génomique GRA6 contenu dans le vecteur pUC18. La région 5' flanquante du gène *GRA6*, la totalité du plasmide pUC18 et la région 3' flanquante du gène *GRA6* ont été obtenue par amplification PCR.

Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline ; Lac Z' : gène codant pour la β -D-galactosidase ; LacI : gène codant pour la protéine répresseur de l'opéron lac.



<u>Figure 38 :</u> Recherche de clones parasitaires déficients pour l'expression des protéines GRA5 ou GRA6 par immunoblot, à la suite d'une sélection dite "positive".

2.10⁷ tachyzoïtes de la souche RH ont été transfectés par les constructions plasmidiques 5'GRA5/CAT/3'SAG1/GRA5 dans le vecteur SK(+) (A) ou 5'GRA6/CAT/3'GRA6 dans le vecteur pUC18 (B). Après une dizaine de jours de sélection en présence de chloramphénicol, les toxoplasmes ont été clonés en plaques de 96 puits.

Un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes provenant de chaque clone ainsi qu'un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes de la souche sauvage RH ont été séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée soit avec les anticorps monoclonaux TG 17-113 anti-GRA5, dilué au 5000^{ème} et TG 05-54 anti-SAG1 dilué au 30000^{ème}, soit avec l'anticorps polyclonal anti-GRA6 dirigé contre la partie N-terminale, dilué au 1000^{ème} et l'anticorps monoclonal TG 05-54 anti-SAG1, dilué au 30000^{ème}. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la péroxydase, dilué 7500^{ème} et le signal a été révélé par chimioluminescence.

Cependant, afin de vérifier l'expression du produit du gène *CAT* responsable de la survie des toxoplasmes en présence de la drogue, l'activité enzymatique de conversion du chloramphénicol a été testée par "CAT assay" (figure 39). Une activité enzymatique a été détectée dans plus de 90 % des clones étudiés.

Cette première série de transfections a permis de montrer l'efficacité du système de sélection par le chloramphénicol mais n'a pas permis d'isoler des mutants déficients pour les protéines GRA5 ou GRA6. Les parasites sélectionnés exprimaient tous les protéines GRA5 ou GRA6 et avaient donc préférentiellement intégré le gène *CAT* de façon aléatoire dans leur génome. Ceci confirme que le phénomène de recombinaison homologue est un événement rare chez *T. gondii*. Ces résultats suggéraient deux hypothèses : premièrement, que les protéines GRA5 et GRA6 sont vitales pour le toxoplasme. Dans ce cas, le double événement de recombinaison homologue, s'il se produit, engendre des parasites non viables. Alternativement, dans le cas où ces protéines ne sont pas vitales à la survie de *T. gondii*, nous nous heurtions à un problème d'enrichissement spécifique de la population parasitaire ayant subi l'événement de double recombinaison homologue.

Dans ce cadre, la poursuite de nos travaux s'est donc orientée vers l'utilisation d'autres stratégies visant à augmenter l'efficacité de sélection des parasites ayant intégré le gène CAT au locus GRA. Dans cette partie du travail, nous nous sommes essentiellement concentrées sur l'obtention d'un mutant déficient pour la protéine GRA5. Une seconde approche, dite du "piège à promoteur", a alors été engagée.

b) Stratégie du "piège à promoteur"

Cette stratégie employée avec succès chez les mammifères (Schwartzberg *et al.*, 1989), utilise une construction dans laquelle le gène de sélection placé en phase de lecture avec le gène à muter est dépourvu du promoteur. L'absence de promoteur dans ces constructions n'autorise l'expression du gène bactérien *CAT* que dans le cas d'une insertion de ce gène en aval d'une région promotrice. Cette stratégie a pour but de limiter la sélection de transformants ayant intégré le marqueur de sélection de façon aléatoire.

Un plasmide qui contient la région 5' non traduite minimale du gène GRA5 (c'est-à-dire ne possédant plus d'activité promotrice), le cadre de lecture du gène bactérien CAT et la grande région 3' flanquante de GRA5 (1,8 kb) a été construit. Des études précédemment réalisées dans le laboratoire avaient permis d'identifier les éléments promoteurs de transcription des gènes GRA (Mercier *et al.*, 1996). Ces études ont ainsi pu définir la région promotrice minimale des gènes GRA1, GRA2, GRA5 et GRA6. Dans le cas du gène GRA5, l'activité promotrice minimale est détectée dans une région située à environ 50 pb du début du



Figure 39 : Analyse de l'activité CAT dans des clones de toxoplasmes à l'issue de la sélection positive au chloramphénicol.

L'activité CAT a été exprimée en pourcentage de conversion du chloramphénicol par rapport au chloramphénicol [¹⁴C], utilisé lors du marquage, fixé arbitrairement à 100 % (contrôle positif). Le graphe représente l'activité CAT des clones parasitaires mesurée après la sélection positive en présence de chloramphénicol. La souche parentale RH a été utilisée comme contrôle négatif.

site de démarrage de la transcription. Une construction qui ne contient qu'une région de 100 pb correspondant à la région 5' non traduite du gène GRA5 a donc été réalisée. Cette région 5' non traduite a été obtenue par amplification PCR à partir du clone génomique GRA5 contenu dans le vecteur KS(+) (L7HindIII dans le vecteur KS(+), Lecordier et al., non publié) (figure 40). Les oligonucléotides utilisés pour amplifier cette région (P21.3 et P21.1, section I.3.1 Matériels et Méthodes) ont été choisis de facon à créer en 5', un site de restriction HindIII et en 3', au niveau de l'ATG, le site NsiI. La taille du fragment amplifié a été visualisée sur un gel d'acrylamide. L'insert a été digéré par les enzymes *Hind*III et NsiI puis cloné dans le vecteur 5'GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5 préalablement digéré par ces même enzymes et libéré de sa grande région 5' flanquante. Cette construction a été nommée P/CAT/3'SAG1/3'GRA5 dans l'ADN plasmidique de cette construction P le vecteur SK(+). 100 μg de /CAT/3'SAG1/3'GRA5 ont alors été linéarisés par SacI et transfectés dans des tachyzoïtes de la souche RH.

Les conditions de sélection utilisées étaient similaires à celles décrites précédemment. Après une dizaine de jours de sélection en présence de chloramphénicol, les parasites ont été individualisés dans des plaques de 96 puits. Les clones parasitaires (une cinquantaine environ) ont été amplifiés sur un nouveau tapis de cellules puis analysés par immunoblot. Les immunoblots ont été révélés par deux anticorps monoclonaux : l'un dirigé contre la protéine GRA5, l'autre contre la protéine de surface SAG1. Alors que l'expression de la protéine SAG1 (prise comme référence interne) a été détectée dans tous les clones parasitaires et dans la souche sauvage RH, l'expression de GRA5 a été observée dans tous les clones avec cependant pour certains clones, environ 20 % d'entre eux, une expression plus faible (figure 41).

L'apparition de ces clones résistants au chloramphénicol indique que le produit du gène CAT est bien exprimé chez ces parasites. Le gène CAT s'est probablement inséré dans le génome des toxoplasmes en amont de régions promotrices. Cependant, la persistance de l'expression de la protéine GRA5 ne met pas en évidence un quelconque enrichissement de la population recombinante. Il semblerait néanmoins que dans certains cas, l'intégration du gène CAT se soit produite dans l'environnement génomique de GRA5, perturbant ainsi l'expression de la protéine GRA5 native puisque 20 % des clones présentaient une expression plus faible. Ces résultats indiqueraient que les séquences de la région 3' flanquante du gène GRA5, d'une longueur de 1,8 kb, permettent de cibler l'ADN plasmidique dans une région du génome proche du gène GRA5.

La fréquence de recombinaison augmentant lorsque les deux partenaires présentent une homologie de séquence relativement importante, nous avons donc repris une stratégie employant de grandes régions environnantes. Cependant, dans l'optique d'améliorer la sélection des parasites recombinants, nous avons utilisé un système de "contre-sélection" ou de **double**



<u>Figure 40 :</u> Stratégie de clonage du "piège à promoteur" : construction du plasmide P-GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5 dans le vecteur SK(+).

 P^- : absence du promoteur ; Prom. : promoteur ; UT : région transcrite et non traduite ; ORF : cadre de lecture ouvert.



<u>Figure 41</u>: Recherche des clones déficients pour l'expression de la protéine GRA5 par immunoblot, à la suite d'une stratégie du piège à promoteur (sélection positive en présence de chloramphénicol) :

Un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes issus de la transfection stable de la souche RH par les plasmides P GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5 dans le vecteur SK(+) a été séparé par électrophorèse sur un gel d'acrylamide puis transféré sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec les anticorps monoclonaux TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 5000^{ème} et TG 05-54 anti-SAG1 dilué au 30000^{ème} puis avec l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la péroxydase dilué au 7500^{ème}. Le signal a été révélé par chimioluminescence.

sélection positive/négative.

B) Stratégie de la double sélection

La stratégie de sélection positive-négative permet, par un système de contre-sélection, un enrichissement très efficace des cellules ayant subi un événement de recombinaison (Zimmer *et al.*, 1994 ; Donald and Roos, 1998). La construction plasmidique doit être réalisée de façon à contenir d'une part, les séquences ADN 5' et 3' du gène d'intérêt encadrant le gène de sélection positive et d'autre part, en amont, le gène de sélection négative. Dans le cas d'un événement de recombinaison homologue, le gène de sélection négative n'est pas intégré dans le génome. Lors de l'intégration au hasard de la construction dans le génome cellulaire, le gène de sélection négative est maintenu et les cellules peuvent être éliminées par l'application de la sélection négative (figure 42).

Le gène *CAT* a été utilisé comme marqueur de sélection positive. Le système de sélection "négative" est basé sur la résistance des parasites sauvages à la 6-thioxanthine. L'absence du gène *HXGPRT* codant pour l'enzyme hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HXGPRT), phénotype Thx^R, confère aux toxoplasmes HXGPRT⁻, une résistance à la 6-thioxanthine. Par contre, l'intégration du gène *HXGPRT* dans le génome des toxoplasmes HXGPRT⁻ génère des parasites sensibles à la 6-thioxanthine, phénotype Thx^S (Introduction, section III-4.B.1).

Les transfections ont nécessité l'emploi d'une souche parasitaire particulière dépourvue du gène HXGPRT, la souche HXGPRT (Roos *et al.*, 1994). Cette souche est dérivée de la souche RH américaine appartenant au groupe I. Dans le but d'induire un événement de recombinaison homologue au locus du gène GRA5, l'appariement entre les séquences d'ADN exogène et génomique doit être parfait. L'étude du polymorphisme des gènes GRA5 et GRA6réalisée au cours de la première partie de ce travail montre l'existence de substitutions de leur composition en bases. L'existence de substitutions n'est pas exclue entre les séquences des régions environnantes du gène GRA5 de l'ADN génomique de la souche HXGPRT et celles des plasmides construits à partir de la souche RH européenne. Cependant, l'influence éventuelle de ces substitutions dans l'appariement entre les régions 5' et 3' flanquantes de la construction plasmidique (sur la base RH européenne) et celles de l'ADN de la souche HXGPRT (RH américaine) est peu probable.



Figure 42 : Principe du double événement de recombinaison homologue intrachromosomique à la suite d'une sélection positive/négative.

Prom. : promoteur ; UT : région transcrite et non traduite ; ORF : cadre de lecture ouvert.

a) Construction GRA5/CAT/HXGPRT

La construction plasmidique réalisée contient d'une part, les séquences ADN 5' et 3' flanquantes du gène GRA5 encadrant le gène de sélection positive CAT et d'autre part, en aval de ces séquences, le gène HXGPRT. L'insert 5'GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5 a été excisé par l'enzyme HindIII à partir du vecteur 5'GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5 dans le vecteur SK(+) précédemment réalisé. Cet insert HindIII-HindIII a été cloné dans le vecteur pmini/HXGPRT/KS(+) préalablement digéré HindIII. La construction résultante a été appelée 5'GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5/ HXGPRT dans le vecteur KS(+) (figure 43).

b) Recherche des clones recombinants

Des parasites HXGPRT ont été transfectés en utilisant la construction plasmidique (5'GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5/HXGPRT). Les toxoplasmes ont été d'abord soumis à une sélection positive en présence de chloramphénicol. L'action du chloramphénicol n'étant pas immédiate, une dizaine de jours de sélection en présence de cette drogue a été nécessaire pour enrichir les parasites exprimant de façon stable la chloramphénicol acétyl transférase. Après dix jours de sélection, la sélection "négative" basée sur la sensibilité à la 6-thioxanthine a été réalisée. Les parasites ayant survécu à cette double sélection (c'est-à-dire de phénotypes chloramphénicol résistant et 6-thioxanthine résistant) ont été individualisés en plaques de 96 puits. Les clones ont ensuite été amplifiés pour obtenir suffisamment d'extraits parasitaires pour l'analyse par immunoblot. Une quinzaine de clones a été obtenue et étudiée. L'expression des protéines GRA5 et SAG1 y a été recherchée dans chaque clone par immunoblot (figure 44). Tous les clones analysés exprimaient la protéine SAG1. Ils contenaient donc suffisamment matériel protéique détectable par la technique utilisée de révélation de par immunochimioluminescence. De façon intéressante, parmi les quatorze clones analysés, douze n'exprimaient plus la protéine GRA5, ceci en comparaison avec la souche sauvage HXGPRT. Cette stratégie de double sélection a donc permis d'obtenir avec succès des clones déficients pour l'expression de la protéine GRA5. De plus, cette double sélection a permis un bon enrichissement des toxoplasmes recombinants en comparaison avec la sélection positive précédemment utilisée puisque plus de 85 % des clones testés n'exprimaient plus la protéine GRA5. L'existence de tels mutants ne permet plus d'envisager le rôle essentiel de la protéine GRA5 dans la survie des parasites. Deux clones ont été arbitrairement sélectionnés pour les analyses ultérieures. Il s'agit des clones 1 et 4. Ces clones ont alors été maintenus sur des cellules fibroblastiques en culture in vitro.



<u>Figure 43 :</u> Stratégie de clonage en vue d'une sélection positive/négative : construction 5'GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5 dans le vecteur pmini/HXGPRT/KS (+).

Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline ; LacZ : gène codant pour la β -D-galactosidase ; ORI : origine de réplication bactérienne ; f1(+) : origine de réplication du phage filamenteux f1 ; Prom. : promoteur, UT : région transcrite et non traduite, ORF : cadre de lecture ouvert.



<u>Figure 44</u> : Recherche des clones déficients pour l'expression de la protéine GRA5 par immunoblot à la suite d'une stratégie du système de double sélection "positive-négative" exploitant le système HXGPRT (sélection positive en présence de chloramphénicol puis négative en présence de 6-Thioxanthine).

Un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes issus de la transfection stable de la souche HXGPRT⁻ par le plasmide 5'GRA5/CAT/3'SAG1/3'GRA5/HXGPRT dans le vecteur SK(+) a été séparé par électrophorèse sur un gel d'acrylamide puis transféré sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée avec les anticorps monoclonaux TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 5000^{ème} et TG 05-54 anti-SAG1 dilué au 30000^{ème} puis avec l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la péroxydase dilué au 7500^{ème}. Le signal a été révélé par chimioluminescence.

Les flèches signalent les clones pour lesquels la protéine GRA5 n'a pas été détectée.

c) Restauration de l'expression de GRA5 par complémentation

Afin de restaurer le phénotype sauvage dans les clones 1 et 4 et donc de vérifier que le phénotype éventuel observé pour les mutants nuls serait dû à l'absence du gène GRA5, les mutants GRA5⁻ ont été complémentés par transfection stable à l'aide du plasmide contenant le cadre de lecture ouvert du gène GRA5 (LG7EcoRI dans le vecteur pUC19, Lecordier *et al.*, 1993). La sélection des clones complémentés, c'est-à-dire exprimant la protéine GRA5, a été réalisée en utilisant le système de sélection basé sur la résistance à la phléomycine apportée par le marqueur ble de sélection positive (Messina *et al.*, 1995). La phléomycine est un antibiotique agissant sur des parasites extracellulaires appartient à la famille de la bléomycine. Ces drogues s'intercalent dans l'ADN et sont responsables d'une inhibition de la croissance. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour l'obtention d'un mutant déficient pour l'expression de la protéine GRA2 (Mercier *et al.*, 1998b). Le génotype et le phénotype des clones complémentés ainsi que ceux d'autres souches de *T. gondii* a été résumé dans le **tableau 8**.

Dans le but de restaurer l'expression de la protéine GRA5, la construction plasmidique contenant le gène *GRA5* (LG7EcoRI dans le vecteur pUC19, Lecordier *et al.*, 1993) et le vecteur TUB5/Ble (Soldati *et al.*, 1995) contenant le gène de sélection *ble* ont été co-transfectés dans les mutants GRA5⁻, clones 1 et 4. Après deux jours de culture sur des cellules HFF, les toxoplasmes ont été séparés des cellules et incubés en présence de phléomycine. Cette sélection a été répétée à deux reprises avant de cloner les parasites résistants à la phléomycine. L'expression de la protéine GRA5 dans les clones parasitaires issus de cette sélection a été analysée par immunoblot à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés d'une part, contre la protéine GRA5 et d'autre part, contre l'actine (contrôle interne). Les clones 1 et 4 GRA5⁻ complémentés pour l'expression de la protéine GRA5 ont ainsi été appelés : clone 1/G5 et clone 4/F2 respectivement (figure 45).

Afin de s'assurer que l'événement de recombinaison homologue a bien remplacé le cadre de lecture du gène GRA5 par le gène CAT, l'analyse de l'environnement génomique des mutants GRA5⁻, clones 1 et 4 a été entreprise par southern blot. Jusqu'à présent, l'analyse des southern blots n'a pas été effectuée dans de bonnes conditions et aucun résultat n'a pu être obtenu. Cependant, sans ces résultats, nous ne pouvons pas attribuer un génotype Δ GRA5 aux clones 1 et 4 déficients pour la protéine GRA5. Dans ce contexte, la préparation des ADN génomiques des clones GRA5⁻ ainsi que ceux des clones complémentés et de la souche sauvage HXGPRT⁻ est en cours de réalisation. Dans le but d'accéder à la fonction de la protéine GRA5, nous nous sommes alors intéressées à l'étude du phénotype de ces mutants.

	génotype			phénotype		
Souche	CAT	HXGPRT	ble	Chloramphénicol (Cm)	6-Thioxanthine (6-TX)	Bléomycine (ble)
Souche RH	-	+		Sensible (Cm ⁸)	Sensible (6-TX ⁸)	Sensible (ble ^S)
Souche HXGPRT	-	-		Sensible (Cm ⁸)	Résistant (6-TX ^R)	Sensible (ble ⁸)
Clones GRA5	+	-	-	Résistant (Cm ^R)	Résistant (6-TX ^R)	Sensible (ble ⁸)
Clones GRA5 complémentés	+	-	+	Résistant (Cm ^R)	Sensible (6-TX ^S)	Résistant (ble ^R)

Tableau 8 : Résumé du génotype et du phénotype de différentes souches de T. gondii .



<u>Figure 45</u> : Analyse par immunoblot de l'expression de la protéine GRA5 après complémentation des clones 1 et 4 GRA5⁻.

5.10⁷ tachyzoïtes des clones 1 et 4 GRA5⁻ ont été co-transfectés par la construction plasmidique G7EcoRI dans le vecteur pUC19 et le vecteur de sélection TUB5/Ble. Les parasites résistants à la phléomycine ont été clonés puis l'expression de la protéine GRA5 dans ces clones a été analysée par immunoblot. Un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes des clones 1 et 4 complémentés ainsi qu'un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes de la souche sauvage HXGPRT⁻ et des clones 1 et 4 GRA5⁻ ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 5000^{ème} ainsi qu'un sérum de lapin anti-actine dilué au 20000^{ème}. Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation des membranes avec un sérum de chèvre anti-IgG de souris dilué 20000^{ème} et avec un sérum de chèvre anti-IgG de lapin dilué 20000^{ème}, tous deux couplés à la péroxydase.

3) Caractérisation du mutant nul GRA5

A) Ultrastructure de la vacuole parasitophore

Afin d'aborder le rôle de la protéine GRA5 dans la maturation et le maintien de la vacuole parasitophore, l'analyse de la vacuole, après l'infection de cellules fibroblastiques par les souches GRA5⁻ et son complémenté, a été réalisée en microscopie électronique. Cette étude n'a pas révélé de modifications structurales de la vacuole entre le mutant déficient et son complémenté. Après infection, les parasites ont, en effet, été détectés dans la cellule-hôte, à l'intérieur de la vacuole. Cette observation indique que la protéine GRA5 n'interviendrait donc pas dans la stabilité de cette structure.

B) Virulence chez la souris

L'étude de la virulence dépend de caractères multiples, tels que la taille de l'inoculum, la voie d'infection, l'espèce infectée... Cependant, la souris est un bon modèle d'étude de la virulence. En effet, les souris sont très sensibles à l'infection par *T. gondii*. La virulence des souches de toxoplasmes chez la souris a permis de distinguer deux phénotypes (virulent et non virulent), basés sur l'habileté des parasites à tuer la souris après une inoculation de tachyzoïtes par voie intrapéritonéale. Ainsi, l'infection intrapérotonéale de souris par un seul tachyzoïte d'une souche virulente telle que la souche RH (ou dérivée de RH, comme la souche HXGPRT⁻) entraîne la mort de l'animal dans les 6 à 10 jours suivant l'inoculation. Par contre, les souris infectées par des souches non virulente, ne permet ni l'enkystement des toxoplasmes dans les différents tissus, ni l'établissement de la phase chronique.

Afin de rechercher la participation de la protéine GRA5 dans la virulence de la souche RH, un lot d'une trentaine de souris a été infecté par voie intrapéritonéale avec 20 tachyzoïtes. L'inoculation de tachyzoïtes de la souche sauvage HXGPRT⁻ a provoqué la mort de 23 souris sur 28 (pourcentage de survie de 17,8 %). De même, 22 souris sur les 29 (pourcentage de survie de 24,1 %) inoculées avec la souche du clone 4 complémenté, clone 4/F2, sont mortes. Par contre, 16 sur les 30 souris (pourcentage de survie de 53,3 %), inoculées avec la souche GRA5⁻ clone 4 étaient toujours vivantes 35 jours après l'inoculation (tableau 9).

Souches de T. gondii	HXGPRT	clone 4 GRA5	clone 4 complémenté
Morts/Total	23/28	14/30	22/29
% de survie	17,8 %	53,3 %	24,1 %

<u>Tableau 9 :</u> Etude de la virulence du clone 4 déficient pour l'expression de la protéine GRA5 chez la souris.

Afin de vérifier que les souris survivantes avaient été infectées par des tachyzoïtes, la sérologie anti-toxoplasmique a été testée (résultats non montrés). Comme attendu, les 5 et 7 souris survivant à l'inoculation avec les tachyzoïtes HXGPRT⁻ et GRA5⁻ complémenté respectivement avaient une sérologie négative pour la toxoplasmose. Mais bien que le pourcentage de survie soit plus élevé, les souris ayant survécu à l'inoculation avec des tachyzoïtes du clone 4 GRA5⁻ n'étaient pas infectées puisque leur sérologie était également négative pour la toxoplasmose. Ces résultats indiquent donc que l'absence de la protéine GRA5 n'influence pas la virulence des tachyzoïtes chez la souris.

C) Croissance in vitro

Afin d'analyser si l'absence de la protéine GRA5 a un effet sur le taux de croissance, la prolifération des toxoplasmes a été étudiée dans les clones 1 et 4 GRA5⁻ en comparaison avec leur complémenté et la souche HXGPRT⁻. Le taux croissance des mutants GRA5⁻ a été évalué par comptage des parasites après 6 heures (ce qui correspond au temps de doublement du parasite) et 24 heures de multiplication intracellulaire. 5.10⁵ (test de croissance de 6 heures) ou 5.10⁴ (test de croissance de 24 heures) parasites ont été déposés sur un tapis de cellules HFF ("Human Foreskin Fibroblast") confluent. Après 2 heures et 4 heures d'invasion respectivement, les toxoplasmes qui n'avaient pas envahi les cellules ont été éliminées. Les parasites ont alors été incubés à 37°C pendant 4 ou 20 heures respectivement puis ils ont été fixés et colorés au Giemsa. Le nombre de parasites par vacuole a alors été dénombré.

Les comptages obtenus suggèrent que les deux clones déficients pour l'expression de la protéine GRA5 (clones 1 et 4) présentent une croissance similaire dans des cellules fibroblastiques. De plus, aucune différence de croissance n'a été observée entre les clones 1 et 4, GRA5⁻ et leur complémenté respectif (clone 1/G5 et clone 4/F2) (figure 46). Une croissance plus lente a été observée chez des tachyzoïtes de la souche sauvage HXGPRT⁻. Seul le phénotype "chloramphénicol sensible" la distingue des autres tachyzoïtes testés (tableau 8), suggérant l'implication éventuelle de la chloramphénicol acétyl transférase dans le



Figure 46 : Test de croissance de tachyzoïtes intracellulaires après 6 et 24 heures de culture *in vitro*.

Les tachyzoïtes déficients pour l'expression de la protéine GRA5 (clones 1 et 4) ainsi que leur complémentés ont été dénombrés après 6 et 24 heures de culture *in vitro*. Le test de croissance représente le pourcentage du nombre de parasites par vacuole parasitophore. La souche parentale HXGPRT⁻ a été utilisée comme contrôle positif.

développement intracellulaire des parasites. Cependant, des tests de croissance avec des tachyzoïtes de la souche HXGPRT de phénotype "chloramphénicol résistant" n'ont pas encore été réalisés et ne nous permettent donc pas de valider cette hypothèse. Ces résultats sont le reflet d'une croissance exponentielle des toxoplasmes GRA5 similaire à celle observée chez des tachyzoïtes exprimant la protéine GRA5 endogène (clones complémentés).

Ces premiers résultats indiquent que les clones 1 et 4 GRA5⁻ sont viables et qu'ils sont à la fois capables d'envahir des cellules-hôtes et de s'y multiplier normalement. L'absence de la protéine GRA5 ne semble donc pas perturber la croissance *in vitro* des toxoplasmes.

Jusqu'à présent, l'absence de résultats probants concernant l'analyse du génotype des clones 1 et 4 GRA5⁻ par southern blot ne nous a pas permis de vérifier l'identité de ces deux clones. Cependant, l'ensemble des résultats menés sur la virulence et la croissance *in vitro* des clones 1 et 4 suggère que ces deux clones présentent un comportement similaire. De plus, la caractérisation ultérieure du phénotype de ce mutant nul a été réalisée avec les deux clones. Cependant, dans la mesure où les résultats obtenus étaient identiques pour les deux clones, seuls les résultats concernant le clone 4 ont été présentés dans ce mémoire.

D) Comportement des autres protéines GRA

Afin d'aborder le rôle de la protéine GRA5 et plus précisément sa participation dans les interactions protéines-protéines avec les autres protéines GRA, le comportement des protéines de granules denses GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5 et GRA6 a été analysé à la fois dans les parasites extracellulaires et à l'intérieur de la vacuole parasitophore du clone 4 GRA5⁻ en comparaison avec la souche sauvage HXGPRT⁻ et la souche complémenté (clone 4/F2).

a) Expression des protéines GRA

Afin de rechercher si l'absence de la protéine GRA5 perturbe la synthèse des autres protéines GRA, l'expression de ces protéines a été analysée par immunoblot dans le clone 4 GRA5⁻ en comparaison avec la souche sauvage et le clone 4 complémenté (clone 4/GRA5/F2). Les membranes ont été révélées à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines GRA1, GRA2, GRA3, GRA4 et GRA6. Ces protéines ont été détectées dans les trois souches parasitaires. De plus, aucune différence de taille n'a été observée entre les protéines GRA exprimées dans le clone 4 GRA5⁻ et son complémenté (figure 47). Ces résultats indiquent que les protéines GRA sont exprimées dans le mutant GRA5⁻ et que l'absence de la protéine GRA5 ne perturbe pas la conformation de ces protéines.



<u>Figure 47 :</u> Analyse par immunoblot de l'expression des protéines GRA dans le clone 4 déficient pour la protéine GRA5.

Un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes de la souche GRA5⁻ clone 4 ainsi qu'un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes de la souche sauvage HXGPRT⁻ et de la souche complémentée (clone 4/F2) ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées, soit avec l'anticorps monoclonal TG 05-54 anti-SAG1 dilué au 10000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-43 anti-GRA1 dilué au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-179 anti-GRA2 dilué au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal Tg2H11 anti-GRA3 dilué au 10000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 5000^{ème}, soit avec le sérum de souris anti-GRA6 recombinante dilué au 10000^{ème}.

Toutes les membranes ont également été incubées avec le sérum de lapin anti-actine dilué au 20000^{ème}. Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation des membranes avec un sérum de chèvre anti-IgG de souris dilué au 20.000^{ème} ou avec un sérum de chèvre anti-IgG de lapin dilué au 20.000^{ème}, tous deux couplés à la péroxydase.

b) Solubilité des protéines GRA dans les granules denses

Le comportement soluble ou membranaire des protéines GRA à l'intérieur des granules denses du mutant GRA5⁻ (clone 4 GRA5⁻) en comparaison avec la souche parentale HXGPRT⁻ et la souche complémentée (clone 4/F2) a tout d'abord été analysé après traitement des parasites extracellulaires par le Triton X-114. Les fractions aqueuse ("A"), détergent ("D") et insoluble ("I") ont été analysées par immunoblot à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les différentes protéines GRA (GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5 et GRA6) et contre la protéine de surface SAG1. Au cours de cette étude, La protéine de granules denses GRA1 qui est une protéine soluble (Sibley *et al.*, 1995) et la protéine membranaire de surface SAG1 (Burg *et al.*, 1988) ont été utilisées comme des contrôles du comportement soluble et membranaire des protéines respectivement : la protéine GRA1 est donc détectée uniquement dans la phase aqueuse alors que la protéine SAG1 est associée uniquement à la phase détergent, ceci pour les trois souches parasitaires analysées (souche HXGPRT⁻; clone 4 GRA5⁻; clone 4/F2). Les contrôles ont montré l'efficacité de l'extraction (figure 48).

La distribution des protéines GRA2, GRA3, GRA4 et GRA6 est similaire dans chacun des extraits parasitaires. Ces résultats confortent ceux précédemment mis en évidence : GRA2, GRA3 et GRA6 sont détectées à la fois dans la phase aqueuse et dans la phase détergent (Mercier *et al.*, 1998a ; Labruyère-Dadaglio *et al.*, sous presse ; Mercier and Sibley, non publiés) alors que la protéine GRA4 est insolubilisée par le traitement au triton X-114 (Labruyère-Dadaglio *et al.*, sous presse). De plus, la distribution de la protéine GRA5 dans les extraits parasitaires de la souche HXGPRT⁻ et du clone 4 complémenté (clone 4/F2), associée à la phase détergent, confirme les résultats précédemment décrits pour la protéine GRA5 (Lecordier *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces résultats indique que l'absence de GRA5 n'interfère probablement pas sur le stockage des autres protéines GRA dans les granules denses du mutant GRA5⁻. Dans le parasite sauvage, ces protéines semblent présentes dans les granules denses sous deux formes, une forme soluble et une forme agrégée qui résulte d'interactions hydrophobes établies entre les différentes protéines.

c) Distribution des protéines GRA dans la vacuole parasitophore

Dans un second temps, le comportement soluble et/ou membranaire des protéines GRA après leur sécrétion dans la vacuole parasitophore, a été analysé par fractionnement cellulaire des parasites intracellulaires. Le fractionnement des extraits cellulaires du clone 4 GRA5⁻ a été comparé à ceux obtenus pour la souche sauvage HXGPRT⁻ et le clone 4 complémenté (clone 4/F2).



<u>Figure 48 :</u> Analyse par immunoblot de la distribution des protéines GRA exprimées dans des tachyzoïtes extracellulaires du clone 4 GRA5⁻ traités par le triton X-114.

5.10⁶ tachyzoïtes provenant du clone 4 GRA5⁻ et 5.10⁶ tachyzoïtes du clone 4 complémenté et de la souche sauvage HXGPRT⁻ ont été traités par le triton X-114. Les fractions insolubles (I), détergent (D) et aqueuse (A) issues du traitement ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées, soit avec l'anticorps monoclonal TG 05-54 anti-SAG1 dilué au 10000 ^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-43 anti-GRA1 diluée au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-179 anti-GRA2 dilué au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA4 dilué au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 5000^{ème}, soit avec le sérum de souris anti-GRA6 recombinante dilué au 1000^{ème}.

Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation des membranes avec un sérum de chèvre anti-IgG de souris dilué 20.000^{ème} et couplé à la péroxydase.

Le contenu vacuolaire (soluble et membranaire) a été séparé des parasites intracellulaires et des débris de la cellule-hôte par seringage puis centrifugation basse vitesse. Le matériel vacuolaire présent dans le surnageant de centrifugation a alors été soumis à une ultracentrifugation de façon à séparer la fraction soluble ("S") de la fraction membranaire ("P"). Ces fractions ont été analysées par immunoblot à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre les différentes protéines. Les protéines GRA1 et SAG1 ont été utilisées comme des contrôles du comportement soluble et membranaire des protéines, respectivement. La détection de la protéine de surface SAG1 uniquement dans la fraction membranaire et de la protéine GRA1 uniquement dans la fraction soluble ceci dans les trois souches analysées (souche HXGPRT⁻; clone 4 GRA5⁻; clone 4/F2) a montré l'efficacité du fractionnement (figure 49).

L'analyse du comportement soluble et/ou membranaire des protéines GRA a révélé pour les protéines GRA2, GRA3, GRA4 et GRA6, une distribution similaire dans chacune des souches étudiées. Les protéines GRA2, GRA3 et GRA6 ont été détectées majoritairement dans la fraction membranaire de la vacuole alors que la protéine GRA4 a été détectée dans les deux fractions. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus, mettant en évidence l'association de la protéine GRA4 avec les membranes du réseau tubulaire intravacuolaire par l'intermédiaire d'interactions fortes de type protéine-protéine alors que les protéines GRA2 et GRA6 sont stabilisées dans les membranes de ce réseau par des interactions hydrophobiques (Labruyère-Dadaglio *et al.*, sous presse). De plus, comme attendu la protéine GRA5 a été détectée uniquement dans la fraction membranaire de la souche HXGPRT⁻ et du clone 4 complémenté (clone 4/F2) (Lecordier *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces résultats montre que l'absence de la protéine GRA5 ne perturbe pas la synthèse des autres protéines GRA. De plus, leur comportement n'est pas modifié : ces protéines sont toujours sécrétées, après l'invasion de la cellule-hôte, dans la vacuole parasitophore où elles s'associent majoritairement à la fraction membranaire.



<u>Figure 49</u> : Analyse par immunoblot de la distribution des protéines GRA après fractionnement du contenu vacuolaire.

Les fractions membranaire (P) et soluble (S) vacuolaires obtenues par fractionnement cellulaire de cellules infectées d'une nuit par le clone 4 GRA5⁻, le clone 4 complémenté ainsi que la souche sauvage HXGPRT⁻ ont été séparées par électrophorèse puis transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées soit avec l'anticorps monoclonal TG 05-54 anti-SAG1 dilué au 10000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-43 anti-GRA1 diluée au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-179 anti-GRA2 dilué au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal Tg2H11 anti-GRA3 dilué au 10000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-179 anti-GRA2 dilué au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal Tg 17-179 anti-GRA5 dilué au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-179 anti-GRA5 dilué au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 5000^{ème}, soit avec le sérum de souris anti-GRA6 recombinante dilué au 1000^{ème}.

Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation des membranes avec un sérum de chèvre anti-IgG de souris dilué 20.000^{ème} couplé à la péroxydase.

III - Contribution à l'étude du ciblage différentiel des protéines GRA5 et GRA6 dans la vacuole parasitophore

L'invasion de *T. gondii* dans la cellule-hôte s'accompagne de l'exocytose régulée des protéines contenues dans les organites de sécrétion. Parmi ces protéines, celles qui sont stockées dans les granules denses sous forme soluble et agrégée vont être sécrétées sous forme soluble dans la vacuole parasitophore (Lecordier *et al.*, 1999 ; Cesbron-Delauw *et al.*, non publié) et ciblées différentiellement vers les membranes de la vacuole. On distingue ainsi trois classes de protéines. A l'exception de la protéine GRA1 qui reste soluble dans la matrice de la vacuole, certaines protéines s'associent étroitement aux membranes de la vacuole parasitophore (GRA3, GRA5 et GRA7), d'autres avec les membranes du réseau tubulaire (GRA2, GRA4 et GRA6).

Les mécanismes de l'exocytose et de ciblage différentiel de ces protéines de granules denses au sein de la vacuole sont encore inconnus. Alors que les travaux réalisés ces dernières années ont permis de définir la structure moléculaire de ces protéines (pour revue Cesbron-Delauw, 1994), ils ne permettent pas d'accéder à leur fonction biologique. Dans le cadre de l'étude des mécanismes d'insertion membranaire post-sécrétoire des protéines GRA dans la vacuole parasitophore, notre objectif était d'identifier le (ou les) domaine(s) protéique(s) impliqués dans le ciblage membranaire différentiel des protéines de granules denses au sein de la vacuole parasitophore, en étudiant le comportement de protéines chimères GRA5/GRA6. Les protéines GRA5 et GRA6 ont en effet été choisies comme modèles d'étude car bien que présentant 24 % d'homologies structurales (deux domaines hydrophobes encadrés de régions hydrophiles) (figure 50), elles présentent un tropisme membranaire différentiel au sein de la vacuole parasitophore. De plus, une particularité de la sécrétion de ces protéines, est liée à l'accumulation transitoire, quelques minutes après l'invasion, de la protéine GRA6, tout comme la protéine GRA2 (Mercier et al., 1998a) au niveau du pôle postérieur du parasite. Après leur sécrétion, la protéine GRA5 est associée à la membrane délimitante de la vacuole (Lecordier et al., 1999) alors que la protéine GRA6 est associée avec les membranes du réseau intravacuolaire (Lecordier et al., 1995; Labruyère-Dadaglio et al., sous presse) (figure 51).

Comme nous ne disposions pas de mutants déficients pour l'expression des protéines GRA5 ou GRA6 lorsque ce travail a débuté, un marqueur épitopique HA9 issu de l'hémaglutinine du virus de l'influenza (Wilson *et al.*, 1984) a tout d'abord été fusionné à l'extrémité C-terminale des séquences codantes de GRA5 (Lecordier *et al.*, 1999) et GRA6 respectivement, afin de visualiser spécifiquement les protéines de fusion à l'aide d'un sérum de lapin commercial. Des études réalisées dans le laboratoire avaient en effet montré l'utilité de cette approche pour l'étude du trafic intravacuolaire et de la topologie de la protéine GRA5.



	Motif A	Motif B	Motif C	Motif D
GRA5	32 G-SGG DDsE 39	59 SL f ER 63	93 LKRrrRRaiQEeS 105	114 EevAEEDK 121
GRA6	56 GsSGG QQ-E 63	118 SLeER 122	171 LRRtgRRspQEpS 183	210 EggAEDDR 217

Figure 50 : Profil d'hydrophobicité des protéines GRA5 et GRA6.

Les quatre motifs communs (A, B, C et D) entre les protéines GRA5 et GRA6 ont été signalés sur les graphes d'hydrophobicité. Leur séquence en acides aminés ainsi que leur position ont été détaillées dans le tableau.


<u>Figure 51</u>: Immunomarquage des protéines GRA5 et GRA6 endogènes, à l'aide des anticorps monoclonaux anti-GRA5 et anti-GRA6 respectivement.

L'immunomarquage des protéines endogènes GRA5 et GRA6 a été réalisé sur des tachyzoïtes intracellulaires de la souche sauvage RH, 10 minutes après l'invasion dans la cellule-hôte. Les protéines ont été révélées soit à l'aide de l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 500^{ème}, soit avec le sérum de souris anti-GRA6 recombinante dilué au 100^{ème}. Les signaux ont été détectés après incubation avec le sérum de chèvre anti-IgG de souris couplé au FITC dilué au 500^{ème}. La protéine GRA5 est associée à la membrane de la vacuole parasitophore, par contre, le marquage de la protéine GRA6 montre une accumulation du signal de fluorescence au niveau du pôle postérieur du parasite

L'addition du marqueur en C-terminal ne perturbe pas le trafic de GRA5 puisque GRA5HA9, exprimé de façon stable chez les toxoplasmes, est stockée dans les granules denses sous forme soluble et agrégée puis sécrétée sous forme soluble dans la vacuole où elle va s'associer par son domaine transmembranaire central avec la membrane délimitante de la vacuole (Lecordier *et al.*, 1999). Différentes constructions chiméres de GRA5/GRA6 ont ensuite été réalisées à partir de GRA5HA9 et de GRA6HA9 construites sur la base des séquences des gènes *GRA5* et *GRA6* de la souche RH, en échangeant leurs domaines hydrophiles N- et C-terminaux respectifs. Ces constructions chimériques ont été exprimées de façon stable chez des tachyzoïtes de la souche RH afin d'analyser le rôle de chaque domaine de GRA5 et de GRA6 dans l'association de ces protéines avec les différentes membranes de la vacuole (réseau ou membrane délimitante).

1) Réalisation des constructions chimériques -HA9

Notre objectif au cours de ce travail, était d'étudier l'implication éventuelle de la région transmembranaire de la protéine GRA5 dans son association avec la membrane délimitante de la vacuole parasitophore. Dans ce but, trois constructions chimériques contenant la région transmembranaire de GRA5 encadrée soit des régions N- et C-terminales de GRA6, soit de la région N- ou C-terminale de GRA6 ont été réalisées. Ces constructions ont été obtenues à partir du plasmide GRA5HA9 et sont résumées dans la **figure 52**. Toutes ces constructions possèdent en fusion avec leur extrémité C-terminale le marqueur épitopique HA9. De plus, elles contiennent toutes le promoteur du gène GRA5, la région 5' non traduite du gène GRA5 (5' UT GRA5) et la région 3' non traduite du gène GRA5 (3' UT GRA2). Enfin, elles contiennent toutes le domaine transmembranaire central de GRA5 flanqué :

- soit des deux domaines hydrophiles N- et C-terminaux de la protéine GRA6 : construction N6T5C6-HA9 (figure 53),
- soit du domaine N-terminal de GRA6 : construction N6T5C5-HA9 (figure 54),
- soit du domaine C-terminal de GRA6 : construction N5T5C6-HA9 (figure 55),

("N" pour région N-terminale, "T" pour région transmembranaire et "C" pour région C-terminale).

Les séquences d'ADN codant pour les domaines d'intérêt de la protéine GRA6 ont été amplifiées par PCR à partir de la matrice plasmidique G1PstI/pUC18 (Lecordier *et al.*, 1995). Les oligonucléotides utilisés ont été choisis pour créer les sites *BstE*II (en 5', au niveau de l'ATG et en 3', entre le N-terminal et la transmembrane) et les sites *Nhe*I (en 5', entre la transmembrane et le C-terminal et en 3', au niveau du stop) aux extrémités des fragments N-et C-terminaux de *GRA6* respectivement (section Matériels et Méthodes I.5). La taille des



Figure 52 : Résumé des constructions recombinantes -HA9 dans le vecteur KS(+).

Prom. : promoteur ; UT : région transcrite et non traduite ; aa : acides aminés ; TM : région transmembranaire ; N: région N-terminale ; C : région C-terminale.



Figure 53 : Stratégie de clonage de la construction N6T5C6-HA9 dans le vecteur KS(+).

Prom. : promoteur ; UT : région transcrite et non traduite ; TM : région transmembranaire.



Figure 54 : Stratégie de clonage de la construction N6T5C5-HA9 dans le vecteur KS(+).

Prom. : promoteur ; UT : région transcrite et non traduite ; TM : région transmembranaire.





Figure 55 : Stratégie de clonage de la construction N5T5C6-HA9 dans le vecteur KS(+).

Prom. : promoteur ; UT : région transcrite et non traduite ; TM : région transmembranaire.

fragments amplifiés a été vérifiée sur gel d'agarose. Les fragments PCR N et C-terminaux ont ensuite été clonés dans les vecteurs GRA5HA9 présentant les même sites de clonage (figures 53, 54, 55, 1^{ère}étape). Les sites de restriction *BstE*II et *Nhe*I utilisés pour le clonage des fragments PCR ont modifié les séquences en acides aminés au niveau des jonctions, entre la région N-terminale GRA6 et la transmembrane GRA6 et entre la transmembrane GRA5 et la région C-terminale de GRA6. Afin de restaurer ces jonctions, c'est-à-dire afin d'éliminer les acides aminés crées par les sites de restriction entre les différents domaines des protéines GRA5 ou GRA6, une mutagenèse a été réalisée à partir des constructions chimériques (figure 53, 54, 55, 2^{nde}étape). Les réactions de mutagenèse ont été effectuées à l'aide des oligonucléotides répertoriés dans la section I.5 de la partie Matériels et Méthodes. La restauration des jonctions a été vérifiée par séquençage automatique des constructions N6T5C5-HA9, N6T5C6-HA9 et N5T5C6-HA9.

Ces constructions ont été transfectées de façon stable chez le toxoplasme et l'analyse du comportement (soluble ou membranaire) de ces protéines chimériques dans les granules denses et dans la vacuole parasitophore, a été entrepris au cours de la troisième partie de notre travail. L'analyse des protéines chimériques -HA9 a été réalisée en comparaison avec celle des protéines GRA5HA9 et GRA6HA9 exprimées de façon stable par les toxoplasmes.

2) Obtention de lignées stables de toxoplasmes

Afin d'obtenir des clones de toxoplasmes exprimant de façon stable les protéines -HA9, la construction plasmidique correspondante et le vecteur de sélection pmini-HXGPRT (Roos et al., 1994) ont été co-transfectés dans des toxoplasmes de la souche HXGPRT (Pfefferkorn et Borotz, 1994 ; Donald et al., 1996). La déficience de cette souche (dérivée de la souche RH) pour l'expression de l'enzyme HXGPRT a été utilisée pour sélectionner les clones ayant intégré de façon stable dans leur génome, le gène de sélection HXGPRT (Introduction section III.4.B). Les parasites issus de cette sélection positive ont été clonés et l'expression de la protéine de fusion d'intérêt a été détectée par immunoblot à partir d'extraits parasitaires. Plusieurs clones parasitaires exprimant chacune des protéines de fusion ont été obtenus à l'issue de la sélection. Cependant, comme tous les clones analysés présentaient un comportement similaire, un seul d'entre eux a été représenté dans ce mémoire. La présence de ce marqueur épitopique en fusion avec l'extrémité C-terminale des protéines a permis de distinguer par immunoblot les protéines recombinantes de leur homologue endogène (GRA5 et GRA6). En effet, ces protéines (GRA5HA9 ; GRA6HA9 ; N6T5C5-HA9 ; N6T5C6-HA9 et N5T5C6-HA9) ont été mises en évidence spécifiquement à l'aide d'un sérum de lapin dirigé contre l'épitope HA9. Alors que les protéines GRA5 et GRA6 endogènes migrent à une taille apparente de 21 kDa et 32 kDa respectivement, les protéines GRA5HA9 et GRA6HA9 ont été détectées à un poids moléculaire apparent plus élevé avec 22 kDa et 34 kDa respectivement. Dans le cas des chimères, d'une manière surprenante, deux d'entre elles (N6T5C6-HA9 et N6T5C5-HA9) présentaient une migration électrophorétique similaire à celle de GRA6HA9 avec un poids moléculaire apparent d'environ 34 kDa. La troisième, N5T5C6-HA9 a été détectée à un poids moléculaire apparent (22 kDa) similaire à celui observé pour GRA5HA9 (figure 56).

Afin de rechercher si l'expression des protéines de fusion perturbe la synthèse des protéines GRA5 et GRA6 endogènes, l'expression de ces protéines endogènes a été analysée par immunoblot à l'aide des anticorps anti-GRA5 et anti-GRA6 respectivement. Aucune différence de taille n'a été observée entre l'expression de ces protéines GRA dans la souche sauvage HXGPRT⁻ et dans celles exprimant les protéines de fusion. De plus, la détection de la protéine GRA5 à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la partie N-terminale de la protéine (Charif *et al.*, 1990 ; Lecordier *et al.*, 1999) a permis l'observation de la protéine endogène ainsi que les protéines GRA5HA9 et N5T5C6-HA9. De la même manière, l'utilisation d'un sérum de souris dirigé contre la protéine GRA6 a permis de détecter à la fois la protéine endogène ainsi que les protéines de fusion N6T5C5-HA9 et N6T5C6-HA9. Ces dernières migrent avec un poids moléculaire respectif d'environ 34 kDa et 33 kDa légèrement supérieur à celui de la protéine endogène (32 kDa). Ces résultats indiquent que les protéines GRA5 et GRA6 sont exprimées dans les clones -HA9 et que la présence de l'épitope HA9 ne perturbe pas la conformation de ces protéines.

3) Solubilité des protéines GRA dans les granules denses

Dans un second temps, le comportement soluble et/ou membranaire des protéines -HA9 dans les granules denses a été apprécié par l'analyse de leur solubilité à la suite d'un traitement de parasites extracellulaires par le Triton X-114. Les fractions aqueuse ("A"), détergent ("D") et insoluble ("I") issues de ce fractionnement ont été analysées par immunoblot à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les différentes protéines GRA (GRA1, GRA5 et GRA6) et contre la protéine de surface SAG1. Les protéines GRA1 et SAG1 ont été utilisées comme des contrôles respectifs du comportement soluble et membranaire des protéines. En effet, alors que la protéine GRA1 qui est une protéine soluble (Sibley *et al.*, 1995) est détectée uniquement dans la phase aqueuse, la protéine membranaire de surface SAG1 (Burg *et al.*, 1988) est observée uniquement dans la phase détergent, ceci dans toutes les souches parasitaires examinées dans cette expérience (résultats non montrés).

L'analyse de la distribution des protéines recombinantes -HA9 a révélé que ces protéines présentaient un profil de distribution similaire. En effet, elles ont toutes été détectées



<u>Figure 56 :</u> Analyse par immunoblot de l'expression des protéines recombinantes -HA9. Les protéines sont exprimées de façon stable dans une population clonée de toxoplasmes, cotransfectée par le plasmide codant pour la protéine recombinante -HA9 ainsi que par le plasmide de sélection pminiHXGPRT.

Un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes issus de la transfection stable de la souche HXGPRT⁻ par les plasmides d'intérêts (-HA9) ainsi qu'un lysat de 5.10⁶ tachyzoïtes de la souche sauvage HXGPRT⁻ ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées, soit avec un sérum de lapin anti-HA11 dilué au 10000^{ème} (A), soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 5000^{ème} (B), soit avec le sérum de souris anti-GRA6 recombinante dilué au 1000^{ème} (C).

Les membranes ont également été incubées avec le sérum de lapin anti-actine dilué au 10000^{ème}. Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation des membranes avec un sérum de chèvre anti-IgG de souris dilué au 20000^{ème} ou avec un sérum de chèvre anti-IgG de lapin dilué au 20000^{ème}, tous deux couplés à la péroxydase. majoritairement dans la phase détergent et en quantité plus faible dans la phase aqueuse de la partition par le triton X-114, ce qui est un comportement similaire à celui observé pour les protéines GRA5 et GRA6 endogènes (figure 57).

Les protéines -HA9, comme les protéines endogènes seraient donc contenues dans les granules denses des toxoplasmes sous forme soluble et sous forme d'agrégats liés par des interactions hydrophobiques.

4) Distribution des protéines de fusion dans la vacuole

Afin d'étudier si ces protéines -HA9 sont sécrétées dans la vacuole parasitophore après l'invasion de la cellule-hôte et quel est alors leur état (soluble *versus* membranaire), la distribution soluble et/ou membranaire de GRA5HA9, GRA6HA9, N6T5C5-HA9, N6T5C6-HA9 et N5T5C6-HA9 a été analysée à la suite du fractionnement cellulaire de cellules HFF infectées une nuit par ces différentes souches stables.

Le contenu vacuolaire a été purifié des parasites intracellulaires et des débris de la cellule-hôte puis séparé par ultracentrifugation en fraction soluble ("S") et membranaire ("P"). Ces fractions ont été analysées par immunoblot à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines -HA9, GRA1, SAG1, GRA5 et GRA6 (figure 58). La protéine de granules denses GRA1 qui est une protéine soluble (Sibley *et al.*, 1995) et la protéine membranaire de surface SAG1 (Burg *et al.*, 1988) ont été utilisées respectivement comme des contrôles du comportement soluble et membranaire des protéines (résultats non montrés).

La distribution des protéines de fusion HA9 (GRA5HA9, GRA6HA9, N6T5C5-HA9, N6T5C6-HA9 et N5T5C6-HA9) a alors été analysée en utilisant un sérum de lapin qui reconnaît spécifiquement l'épitope HA9. De la même manière que lors de la partition par le triton X-114, à la suite du fractionnement cellulaire, toutes les protéines de fusion présentaient un profil de répartition similaire. En effet, une proportion plus importante de ces protéines a été détectée dans la fraction membranaire de la vacuole. Ces résultats montrent que les protéines -HA9 sont sécrétées dans la vacuole après l'invasion de la cellule-hôte où elles sont détectées à la fois sous forme soluble et membranaire.

De plus, la distribution des protéines GRA5 et GRA6 endogènes n'est pas perturbée par l'expression des protéines -HA9 puisqu'elles ont été détectées majoritairement dans la fraction membranaire de la vacuole. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment décris mettant en évidence l'association membranaire de ces protéines (Lecordier *et al.*, 1995 ; Labruyère-Dadaglio *et al.*, sous presse).



<u>Figure 57 :</u> Analyse par immunoblot de la distribution des protéines recombinantes -HA9 et GRA endogènes dans des tachyzoïtes traités par le triton X-114.

1.10⁸ tachyzoïtes provenant d'une population clonée de toxoplasmes issus de la transfection stable de la souche HXGPRT⁻ par les plasmides d'intérêts (-HA9) et 1.10⁸ tachyzoïtes de la souche sauvage HXGPRT⁻ ont été traités par le triton X-114. Les fractions insoluble (I), détergent (D) et aqueuse (A) issues du traitement ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées, soit avec un sérum de lapin anti-HA11 diluée au 10.000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 5000^{ème}, soit avec le sérum de souris anti-GRA6 recombinante dilué au 1000^{ème}. Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation des membranes avec un sérum de chèvre anti-IgG de souris dilué 20.000^{ème} ou avec un le sérum de chèvre anti-IgG de lapin

dilué 20.000^{ème}, tous deux couplés à la péroxydase.



<u>Figure 58 :</u> Analyse par immunoblot de la distribution des protéines recombinantes -HA9 et des protéines GRA endogènes après fractionnement cellulaire du contenu vacuolaire.

Les fractions membranaire (P) et soluble (S) vacuolaires obtenues par fractionnement cellulaire de cellules infectées d'une nuit par les souches recombinantes HA9 ou la souche sauvage HXGPRTont été séparées par électrophorèse puis transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées soit avec un sérum de lapin anti-HA11 dilué au 10000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17.43 anti-GRA1 diluée au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17.43 anti-GRA1 diluée au 20000^{ème}, soit avec l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 dilué au 5000^{ème}, soit avec le sérum de souris anti-GRA6 recombinante dilué au 1000^{ème}.

Les signaux ont été révélés par chimioluminescence après incubation des membranes avec un sérum de chèvre anti-IgG de souris dilué au 20000^{ème} ou avec un le sérum de chèvre anti-IgG de lapin dilué au 20000^{ème}, tous deux couplés à la péroxydase.

A l'heure actuelle, bien que l'analyse de la localisation des protéines -HA9 dans la vacuole n'a pas permis de déterminer le tropisme membranaire de ces protéines pour des raisons techniques. Par ailleurs, l'analyse du trafic intravaculaire de ces protéines recombinantes a été étudiée par immunofluorescence. Des cellules fibroblastiques ont été infectées pendant 2 minutes par des tachyzoïtes, exprimant de façon stable les protéines -HA9, puis incubées pendant 10 minutes. La sécrétion des protéines dans la vacuole parasitophore a été analysée par immunofluorescence à l'aide du sérum de lapin anti-HA9, après fixation des cellules et perméabilisation sélective des membranes à la saponine (Carruthers and Sibley, 1997). La présence de l'épitope -HA9 à l'extrémité C-terminale des protéines ne perturbe pas la sécrétion des protéines GRA5HA9, GRA6HA9 ainsi que les protéines recombinantes -HA9. En effet, tout comme leur homologue endogène, alors qu'aucune accumulation du signal de fluorescence n'a été observée pour la protéine GRA5HA9, la protéine GRA6HA9 transite au niveau de la partie postérieure du parasite (figure 59). L'immunomarquage des protéines chimériques, 10 minutes après l'invasion, n'a pas révélé d'accumulation du signal de fluorescence pour les protéines N5T5C6-HA9 et N6T5C5-HA9. Par contre, un marquage similaire à celui obtenu pour la protéine GRA6 a été observé pour la protéine N6T5C6-HA9 (figure 60).

En conclusion, l'ensemble des analyses effectuées jusqu'à présent pour étudier le trafic intracellulaire des protéines GRA-HA9 suggère d'une part, que ces protéines de fusion sont stockées dans les granules denses sous forme soluble et d'agrégats stabilisés par des interactions hydrophobes et d'autre part, qu'elles sont sécrétées sous forme soluble dans la vacuole où elles vont s'associer aux membranes (délimitante de la vacuole et/ou du réseau).

Полиции Полиции Сказная Полиции Полиции Сказная Полиции Полиции Сказная Полиции Полиции Сказная Полиции Полиции Сказная

Anti-HA11

1

Phase

<u>Figure 59 :</u> Immunomarquage des protéines recombinantes GRA5HA9 et GRA6HA9 10 minutes après l'invasion dans la cellule-hôte.

Des tapis de cellules fibroblastiques ont été infectés pendant 10 minutes par des tachyzoïtes exprimant de façon stable les protéines recombinantes -HA9 puis ont été incubés en présence d'un sérum de lapin anti-HA11 dilué au 500^{ème}. Les protéines recombinantes ont été révélées avec le sérum de chèvre anti-IgG de lapin couplé au FITC dilué au 500^{ème}.

Une accumulation du signal de fluorescence a été observée au niveau du pôle postérieur des parasites exprimant la protéine GRA6HA9 (pointes de flèche). Le marquage des parasites exprimant la protéine GRA5HA9 se situe sur l'ensemble de la vacuole parasitophore.



<u>Figure 60 :</u> Immunomarquage des protéines recombinantes -HA9 (N5T5C6-HA9, N6T5C5-HA9, N6T5C6-HA9) 10 minutes après l'invasion dans la cellule-hôte.

Les tapis de cellules fibroblastiques ont été infectés pendant 10 minutes par des tachyzoïtes exprimant de façon stable les protéines recombinantes puis ont été incubés en présence d'un sérum de lapin anti-HA11 dilué au 500^{ème}. Les protéines recombinantes -HA9 ont été révélées avec le sérum de chèvre anti-IgG de lapin couplé au FITC dilué au 500^{ème}.

Une accumulation du signal de fluorescence, comparable au signal obtenu dans la souche GRA6HA9 (figure 59), a été observée au niveau du pôle postérieur des parasites exprimant la protéine N6T5C6-HA9 (pointe de flèche). Par contre, de la même manière que la souche GRA5HA9 (figure 59), le marquage se situe sur l'ensemble de la vacuole parasitophore pour les parasites exprimant les protéines N5T5C6-HA9, N6T5C5-HA9.

Discussion

Le succès du parasitisme de *T. gondii* est attribué à son développement intracellulaire au sein d'un compartiment spécialisé, la vacuole parasitophore. En effet, cette vacuole, dont la formation est initiée à partir de la membrane de la cellule-hôte lors de l'invasion cellulaire, est incapable de fusionner avec les compartiments endocytiques de la cellule-hôte (Sibley *et al.*, 1985). Afin d'éviter cette fusion, la composition de la vacuole est rapidement modifiée d'une part, par l'exclusion des marqueurs de la cellule-hôte (Mordue and Sibley, 1997) et d'autre part, par la sécrétion de protéines parasitaires, les protéines GRA (Cesbron-Delauw, 1994).

Les protéines GRA sont stockées dans des granules denses sous forme soluble et d'agrégats. A la suite de la pénétration du parasite dans la cellule-hôte, elles sont sécrétées sous forme soluble et vont être ciblées différentiellement au sein de la vacuole parasitophore. Les travaux réalisés ces dernières années ont permis la caractérisation moléculaire de ces protéines ainsi que l'étude de leur trafic dans la vacuole parasitophore. Cependant, leur rôle fonctionnel n'est pas encore défini. Leur implication, dans les mécanismes de multiplication et/ou de survie intracellulaire développés par le parasite, est probable.

Grâce aux progrès réalisés ces dernières années dans la manipulation génétique des toxoplasmes (Kim *et al.*, 1993 ; Soldati and Boothroyd, 1993 ; Donald and Roos, 1993), l'étude du tropisme différentiel et de la fonction biologique de ces protéines est désormais envisageable. Dans ce contexte, le but de notre travail visait, par une approche génétique, à aborder, premièrement, le rôle des protéines GRA par l'analyse de leur participation dans la virulence parasitaire (polymorphisme) et par la réalisation de mutants nuls et l'analyse de leur phénotype et deuxièmement, à identifier le (ou les) domaine(s) protéique(s) impliqué(s) dans le tropisme membranaire des protéines GRA. Cette approche a été réalisée en prenant les protéines GRA5 et GRA6 comme modèle d'étude d'une part, parce qu'elles présentent des homologies structurales (même profil d'hydrophobicité, 4 motifs communs) et d'autre part, parce qu'après leur sécrétion, elles sont ciblées différentiellement dans la vacuole parasitophore. En effet, la protéine GRA6 est détectée dans la membrane délimitante de la vacuole parasitophore alors que la protéine GRA6 va s'associer avec les membranes du réseau tubulaire intravacuolaire (Lecordier *et al.*, 1993 ; 1995).

I - Etude du polymorphisme des protéines de granules denses GRA5 et GRA6 de différentes souches de toxoplasmes

Toutes les souches animales et humaines isolées à travers le monde sont groupées dans une même espèce, T. gondii. De plus, les différences du comportement parasitaire observées à l'intérieur d'une même espèce animale et notamment chez la souris (virulence, non virulence), suggéraient que l'espèce T. gondii soit composée de populations hétérogènes (Sibley and Boothroyd, 1992c ; Sibley and Howe, 1996). Récemment, la combinaison des études immunologiques (Ware and Kasper, 1987; Gross et al., 1991), iso-enzymatiques (Dardé et al., 1992 ; Dardé, 1996) et génétiques (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction ou RFLP et par amplification génomique aléatoire ou RAPD) (Cristina et al., 1991; Sibley et al., 1992b, 1992c ; Guo and Johnson, 1995) a permis de définir le caractère clonal de la population de T. gondii. D'ailleurs, la population est composée de trois lignées clonales prédominantes (Howe and Sibley, 1995 ; Sibley and Howe, 1996). Dans cette classification, alors que les souches du premier groupe (groupe I), comme la souche RH, sont des souches très virulentes chez la souris et sont responsables de toxoplasmose congénitale, les souches du second groupe (groupe II), comme les souches 76K, Prugniaud sont moins virulentes et sont capables de former des kystes chez la souris. Elles occasionnent souvent des pathologies sévères chez l'homme et sont souvent associées à une réactivation toxoplasmique par rupture des kystes. Les souches du troisième groupe (groupe III), comme les souches C et C56, sont également faiblement virulentes mais elles sont plus rarement associées aux toxoplasmoses humaines. Ces souches sont très abondantes chez les animaux.

Au cours de la première partie de notre travail, un polymorphisme de taille similaire a été mis en évidence pour les protéines GRA5 et GRA6 entre les trois groupes génotypiques. L'analyse comparative des séquences nucléotidiques des gènes *GRA5* et *GRA6* ainsi que les séquences en acides aminés déduites à partir du cadre de lecture ouvert n'ont pas révélé de divergence importante entre les trois groupes. Les séquences sont très conservées à l'intérieur d'un même groupe, alors qu'une faible divergence intra-espèce entre chaque groupe a été observée. Cette divergence est d'ailleurs plus marquée entre le groupe II et les groupes I et III qu'entre le groupe III et le groupe I. Ceci a tout particulièrement été observé dans la région C-terminale de la protéine GRA6 puisque cette région contient, d'une part, deux délétions (de 5 et 1 acides aminés) et d'autre part, de nombreuses substitutions non conservatives, 4 sur les 8 derniers acides aminés.

De plus, les protéines GRA5 et GRA6 des groupes I et II, exprimées dans des systèmes d'expression hétérologues (*in vitro* et *ex vivo*), ne semblent pas présenter des modifications post-traductionnelles différentielles entre les trois groupes.

La modification de la composition nucléotidique des gènes par mutagenèse dirigée a permis de mettre en évidence la contribution d'un changement conformationnel et/ou d'un état chargé différentiel des protéines entre les trois groupes.

1) Similarité du comportement électrophorétique des protéines GRA5 et GRA6 entre les trois groupes

La comparaison des séquences en acides aminés des protéines GRA5 et GRA6 sur la base de leur homologie structurale a révélé d'une part qu'aucune modification n'a été observée dans les deux régions hydrophobes des protéines et d'autre part, qu'à l'intérieur d'un même groupe aucune substitution ne se produit au même endroit dans l'un des 4 motifs communs (figure 61).

			GRA5		GRA6					
	Groupe	Ι	32 G-SGGDDsE 39		56 GsSGGQQ-E 63					
Motif A :	Groupe l	Ι	32 G-SGGDDsE 39		56 GsSGGQQ-E 63					
	Groupe I	II	32 G-SGGDDsE 39		56 GsSGGQQ-E 63					
			GRA5	GRA6						
Motif B :	Groupe I		59 GSLfER 63	118 SLEER 122						
	Groupe II		59 GSLfER 63	Souc Prug	the 76K : 118 SLeER 122 niaud : 118 SLdER 122					
	Groupe III		59 GSLfER 63		118 SLeER 122					
		GRA5			GRAG	5				
<u>Motif C :</u>	Groupe I	I 93 LKRrrRRaiQEe		S 105	171 LRRtgRRspQEpS 183					
	Groupe II	II 93 LRRrrRRaiQEe		<mark>S</mark> 105	171 LRRtgRRspQEpS 183					
	Groupe III		93 LKRrrRRaiQEeS 105		Souche C : $_{171}$ LRRtgRRspQEpS $_{183}$ Souche C56 : $_{171}$ LRRtgRRspPEpS $_{183}$					
			GRA5		GRA6					
Motif D :	Groupe I		114 EevAEeD 120		210 EggAEdD 216					
	Groupe I	1	114 EevAEeD 120		210 Egg-EdD 216					
	Groupe II	Ι	114 EevAEeD 120		210 EggGEdD 216					

Figure 61 : Alignement des séquences en acides aminés des quatre motifs communs entre

Discussion

La conservation de la séquence en acides aminés des régions hydrophobes entre les trois groupes suggère l'importance éventuelle de ces régions dans un comportement similaire de ces protéines entre des souches des trois groupes. Lorsque le tachyzoïte a infecté la cellulehôte, la protéine GRA5 est détectée dans la membrane délimitante de la vacuole parasitophore et la protéine GRA6 dans les membranes du réseau intravacuolaire. Au stade bradyzoïte, elles sont toutes les deux détectées dans la paroi kystique (Lecordier et al., 1993, 1995; Torpier et al., 1993). Des études précédentes suggèrent d'une part, l'importance de la séquence caractéristique d'un peptide signal dans la sécrétion de ces protéines et d'autre part, le rôle de la région centrale hydrophobe caractéristique d'une région transmembranaire dans l'association membranaire de ces protéines (Lecordier et al., 1993, 1995, 1999). Par contre, l'existence d'une région plus polymorphe entre les trois groupes, en N-terminal pour la protéine GRA5 et en C-terminal pour la protéine GRA6, implique peut être une différence de comportement de ces protéines selon les souches. Ainsi l'étude topologique de la protéine GRA5, dans la vacuole parasitophore, a permis de montrer que son domaine N-terminal est exposé au cytoplasme de la cellule-hôte. Ceci permet de supposer l'existence d'interaction du domaine Nterminal GRA5 avec des protéines cellulaires. Une étude similaire de l'orientation de la protéine GRA6 dans les membranes du réseau intravacuolaire devrait nous permettre de déterminer quel domaine N- ou C-terminal interagit avec le cytoplasme cellulaire. Le rôle des régions N- ou C-terminale des protéines GRA5 et GRA6 pourrait être appréhendé par la réalisation de protéines GRA5 chimères (contenant soit la région N-terminale de type I, II ou III) et GRA6 chimères (contenant soit la région C-terminale de type I, II ou III) et l'étude des interactions protéine-protéine résultantes.

De plus, l'analyse des séquences en acides aminés n'explique pas pourquoi d'une part, ces deux protéines présentent un comportement électrophorétique similaire entre les trois groupes et d'autre part, la différence de taille entre le poids moléculaire prédictif des protéines GRA5 et GRA6 et leur poids moléculaire apparent. En effet, malgré une homologie faible entre ces deux protéines (24 % d'homologie), une corrélation frappante de leur profil de migration électrophorétique entre les trois groupes a été observée. Cependant, l'analyse des séquences en acides aminés des quatre motifs communs aux protéines GRA5 et GRA6 n'a pas révélé de substitutions communes (même position et/ou composition identique). De même, ces deux protéines ont un comportement électrophorétique aberrante par rapport à leur poids moléculaire théorique. D'ailleurs, des études précédentes concernant les séquences protéiques primaires des protéines GRA5 et GRA6 de la souche RH (groupe I) révèlent qu'il existe une différence entre le poids moléculaire théorique et apparent (Lecordier et al., 1993 ; 1995). En effet, alors que le poids moléculaire théorique est de 14,3 kDa pour la protéine GRA5 et de 24 kDa pour la protéine GRA6, ces protéines migrent en conditions non réductrices à une taille de 21 kDa et de 32 kDa, respectivement. De la même manière, d'autres protéines de T. gondii présentent également une migration aberrante. C'est, par exemple, le cas pour les protéines de


Alignement des séquences en acides aminés de la protéine GRA5

Alignement des séquences en acides aminés de la protéine GRA6



Souche RH (groupe I)

Souches 76K et Prugniaud (groupe II)

Souches C et C56 (groupe III)

Figure 62 : Représentation schématique des protéines GRA5 et GRA6.

Localisation des sites de phosphorylation (\Rightarrow) et de O-glycosylation (Ser) additionnels.

granules denses GRA1, GRA2 et GRA4 (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989; Mercier *et al.*, 1993; Mévelec *et al.*, 1992) et pour l'antigène de surface, SAG2 qui présente un poids moléculaire théorique de 15 kDa pour une taille apparente de 22 kDa (Parmley *et al.*, 1992). Toutes ces différences entre les poids moléculaires théorique et apparent pourraient être attribuées soit à des modifications post-traductionnelles de la protéine et/ou à la composition en acides aminés.

Dans notre étude sur le polymorphisme de taille des protéines GRA5 et GRA6 entre les trois groupes, nous avons envisagé l'existence de modifications post-traductionnelles différentielles entre les protéines du groupe I (souche RH) et celles du groupe II (souches 76K ou Prugniaud) (figure 62). Le comportement électrophorétique des protéines GRA5 et GRA6 entre les groupes I et II exprimées dans des systèmes d'expression hétérologues (*in vitro* et *ex vivo*), nous a permis d'estimer le poids moléculaire apparent de ces protéines sans qu'il y ait de modifications post-traductionnelles. Cette analyse a révélé une variation de taille similaire entre les deux groupes à celle observée pour les protéines natives. L'implication de modifications post-traductionnelles semblent peu probable, cependant, différentes analyses permettraient de compléter cette étude :

- Premièrement, l'analyse de l'expression des protéines GRA5 et GRA6, dans le système *in vivo*, doit être compléter par l'expression de ces protéines type I, type II et type III dans les trois contextes d'expression. De plus, pour la protéine GRA6, les problèmes de détection auxquels nous avons été confrontées, au cours de l'expression *in vivo* de cette protéine, ne nous ont pas permis d'analyser sa taille dans différents contextes. L'existence de modifications différentielles entre les souches n'est pas à exclure dans la mesure où la divergence de cette protéine est plus importante que pour la protéine GRA5. Des expériences de transfections stables de cette protéine apporteront probablement des informations supplémentaires concernant l'implication de tels mécanismes dans la maturation de cette protéine.

- Deuxièmement, il est possible d'analyse l'existence de modifications posttraductionnelles différentielles par marquage métabolique en présence de sucres tritiés ou d'ATP marqué au phosphore 32. En effet, la recherche de sites de modification-posttraductionnels potentiels, à partir de la séquence en acides aminés par programme informatique a révélé la glycosylation probable des résidus sérine et thréonine (O-glycosylation, groupe II) et l'existence de sites de phosphorylation supplémentaires (groupes II et III). D'ailleurs, ce genre de modifications post-traductinnelles ont été décrites dans la souche RH (groupe I), elles impliquent d'une part, la glycosylation probable des résidus sérine et thréonine de la protéine (O-glycosylation, Lecordier *et al.*, 1993) et d'autre part, la phosphorylation de la protéine GRA6 de la souche RH (Labruyère-Daglaglio *et al.*, sous presse). Au cours de notre travail, nous avons également mis en évidence le rôle joué par certains acides aminés dans la migration électrophorétique de ces protéines par mutagenèse dirigée. Ces résultats suggèrent l'implication du changement conformationnel et/ou de l'état chargé des protéines dans le polymorphisme de taille de ces protéines entre les trois groupes. Des travaux précédents montrent l'influence de la composition en acides aminés dans la migration électrophorétique d'une protéine. En effet, chez le *Plasmodium*, la modification d'un seul acide aminé dans la séquence de la protéine recombinante de surface, GST-MSP1, provoque une variation de migration de 10 % par rapport à la protéine non mutée (Holder, A., communication personnelle). Cependant, cette hypothèse nécessite une analyse plus approfondie, notamment pour la protéine GRA6. En effet, l'influence dans la région C-terminale de cette protéine d'une part, d'une délétion de plusieurs acides acides aminés et d'autre part, de nombreuses substitutions à l'extrémité de cette région, pourrait intervenir dans sa différence de migration. Cette étude pourra être appréhendée par mutagenèse dirigée de bases dans la séquence du gène GRA6 type I et type II puis en comparant la taille des protéines mutées à celle des protéines sauvages.

2) Marqueurs prédictifs de la pathogenèse

L'identification des composés parasitaires spécifiques, qui contribuent à la pathologie ou qui fournissent des marqueurs prédictifs de la progression de la maladie, est devenue un axe de recherche important. En effet, la toxoplasmose peut provoquer de sévères pathologies dans deux situations particulières d'une part, chez le fœtus et d'autre part, chez les individus immunodéficients. Cependant, de façon surprenante et encore inconnue, la contamination de ces individus par le parasite n'entraîne pas toujours le développement d'une pathologie. En effet, seulement 45 % des infections, au cours de la grossesse, conduisent à la transmission du parasite au fœtus (Dupouy-Camet *et al.*, 1993). De même, chez les patients immunodéprimés, comme les patients atteints du SIDA, seulement 30 % des patients infectés de façon chronique par *T. gondii* vont développer une pathologie sévère au niveau du système nerveux central (Luft and Remington, 1992). A l'heure actuelle, les raisons de cette différence ou les facteurs responsables de la sévérité de la maladie ne sont pas connus.

Par ailleurs, la combinaison de différentes études (génétiques, immunologiques et biochimiques), réalisées chez l'homme, révèlent une corrélation frappante entre le génotype des souches et la maladie (Dardé *et al.*; 1992 ; Howe and Sibley, 1995). Les souches du groupe II sont plus souvent associées à des réactivations d'infections chroniques, conduisant à des encéphalites toxoplasmiques chez les sujets immunodéprimés. Les souches du groupe I, très virulentes chez la souris et présentant une parasitémie élevée, sont plus fréquemment associées aux toxoplasmoses congénitales. Dans l'avenir, l'identification génétique des souches, chez les

patients atteints chroniquement, sans symptômes apparents, ou chez les femmes enceintes permettra de prévenir la maladie d'une part, par un diagnostic précoce et d'autre part, par la mise en place rapide d'un traitement efficace. Bien que l'influence du génotype parasitaire dans la toxoplasmose soit clairement établie, en revanche, il n'a pas été démontré si l'association des souches des groupes I et II pour les toxoplasmoses humaines est le reflet de leur capacité d'infecter préférentiellement l'homme ou de leur capacité à développer la maladie. Pour cette raison, une meilleure compréhension des gènes impliqués dans la pathologie est nécessaire pour permettre leur utilisation en tant que marqueurs prédictifs de la progression de la maladie.

L'existence d'un polymorphisme évident des protéines GRA5 et GRA6 entre les trois groupes génotypiques permet d'envisager leur utilisation en tant que marqueurs prédictifs impliqués dans la progression et dans la sévérité de la maladie. L'utilisation des protéines GRA5 et GRA6 dans le typage des souches pourra être entreprise par des techniques de biologie moléculaire (RFLP, analyse de l'expression de gènes altérés, analyse du taux différentiel de transcription) et par des techniques immunochimiques (taux d'expression des protéines, recherche d'antigènes différentiels).

A) Marqueurs génétiques

Les progrès réalisés ces dernières années dans la manipulation génétique a permis de classer les souches en trois génotypes distincts (Sibley and Boothroyd, 1992 ; Parmley *et al.*, 1994a ; Howe and Sibley, 1995 ; Meisel *et al.*, 1996). D'ailleurs, cette classification est possible en combinant l'analyse des profils de restriction (RFLP) engendrés à la suite de la digestion de plusieurs loci distincts (régions 5' et 3' régulatrices et région codante). L'efficacité de cette analyse est liée au nombre de loci testés ainsi qu'à une interprétation facile des profils de restriction permettant de distinguer les trois groupes.

A la suite de l'analyse de la séquence codante des gènes GRA5 et GRA6, nous avons mis en évidence l'existence d'un polymorphisme génétique entre les trois groupes. De plus, la présence de sites de restriction différentiels entre les trois groupes pourrait être utilisée pour une analyse plus rapide par RFLP de ces deux loci. Ceci permettrait d'ajouter deux marqueurs génétiques supplémentaires (GRA5 et GRA6) permettant le typage génotypique des souches.

Il serait également intéressant de rechercher s'il existe un polymorphisme génétique entre les trois groupes dans la région 5' régulatrice des gènes GRA5 et GRA6. En effet, l'analyse de la région 5' régulatrice de plusieurs gènes GRA, montre que cette région joue un rôle important dans leur expression (Mercier *et al.*, 1996 ; Lefebvre-Van Hende, 1998). Par ailleurs, l'importance de cette région a également été démontrée pour le gène SAG1 (Boothroyd *et al.*, 1995). Le nombre de répétitions d'un motif nucléotidique dans cette région révèle une bonne corrélation entre la virulence des souches chez la souris et le niveau de transcription de SAG1 (Windeck and Gross, 1996).

De plus, l'utilisation de la génétique inverse (transfection, mutagenèse) permettra d'appréhender l'influence des substitutions nucléotidiques observées dans la région 3' transcrite et non traduite (3' UT). En effet, cette région joue un rôle important dans la stabilité des messagers c'est-à-dire dans l'efficacité de la traduction (Diederich *et al.*, 1997). D'ailleurs, des travaux récents, chez *Trypanosoma brucei*, montrent l'implication de cette région dans l'expression différentielle des gènes Vsg ("Variant surface glycoprotein"). De plus, chez le toxoplasme, des travaux réalisés dans le laboratoire, mettent en évidence l'influence de la région 3' UT des gènes *SAG1* et *GRA5* dans l'expression du gène indicateur *CAT* (chloramphénicol acétyl transférase) placé en amont de ces régions (Lefebvre-Van Hende, 1998).

Enfin, afin de rechercher l'implication de ces protéines dans la virulence, la localisation chromosomique du locus des gènes GRA5 et GRA6 pourrait être réalisée. Des travaux préliminaires, réalisés dans le laboratoire par électrophorèse en champs pulsé, suggèrent que le locus GRA5 soit lié au chromosome V, alors que celui de GRA6 est lié au chromosome VIII. Cette approche peut, en effet, mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre l'emplacement chromosomique et la virulence. Des études précédentes montrent que le caractère virulent des souches est régulée par une région liée au locus SAG1, se trouvant sur le chromosome VIII (Howe et al., 1996). Cependant, le critère d'appartenance à ce chromosome ne semble pas suffisant pour déterminer le caractère virulent d'une souche. En effet, l'obtention récente d'un mutant déficient pour l'expression de la protéine GRA2 montre l'importance de cette protéine dans la virulence du toxoplasme, or le locus du gène GRA2 se trouve sur le chromosome X (Mercier et al., 1998b). Par ailleurs, les résultats obtenus à la suite de la caractérisation du mutant GRA5⁻ révèlent que la protéine GRA5 ne contribue pas à la virulence du parasite. La localisation chromosomique des gènes GRA5 et GRA6 permettra peut être faire la distinction entre les facteurs directement impliqués dans la virulence et ceux prédictifs de la virulence.

B) Marqueurs antigéniques

Des travaux récents ont montré que des différences génétiques observées dans le locus du gène GRA4 sont responsables d'un épitope différentiel utilisé pour différencier les souches entre les groupes I et les groupes II et III (Meisel *et al.*, 1996). La présence d'une région très polymorphique, dans la région C-terminale de la protéine GRA6, permet d'envisager une variabilité antigénique de cette région entre les trois groupes. Dans ce contexte, l'intérêt de cette région pour le diagnostic de la maladie pourrait être étudié. En effet, la partie N -

Discussion

terminale de la protéine GRA6 est très conservée dans les trois groupes. D'ailleurs, cette région est fortement immunogénique puisque 94 % des sérums humains reconnaissent des structures antigéniques dans la partie N-terminale de la protéine (Lecordier *et al.*, en préparation). Par contre, pour sa région C-terminale, la situation est très différente car à l'heure actuelle, seul 10 % des sérums sont dirigés contre cette région. Il est possible d'envisager que des anticorps spécifiques dirigés contre la partie carboxy terminale de la protéine GRA6 de type I, type II ou type III puissent compléter le diagnostic prédictif de pathogenèse par ELISA en apportant une indication sur le typage des souches. A ce jour, les différences antigéniques observées entre les souches permettent de distinguer les souches uniquement selon leur virulence chez la souris (Weiss *et al.*, 1988; Gross *et al.*, 1991).

De plus, l'expression des protéines GRA5 et GRA6 pourrait être analysée afin d'étudier qu'elle est l'influence des variations génétiques sur l'expression différentielle de ces protéines. Ceci pourrait être réalisé par la comparaison du signal d'expression de ces protéines entre les trois groupes par immunofluorescence semi-quantitative par "phospho-imager". Des travaux récents montrent que l'expression de la protéine cytoplasmique hsp70 est variable entre des souches virulentes et non virulentes. Son expression différentielle est liée à l'existence de variations génétiques, à la fois dans sa séquence ADN et au niveau de son taux de transcription (Lyons *et al.*, 1998).

II - Utilisation de la génétique inverse pour l'étude des protéines GRA

L'ensemble des travaux réalisés ces dernières années a permis la caractérisation moléculaire ainsi que l'analyse topologique des molécules de granules denses (Ossorio *et al.*, 1994; Mercier *et al.*, 1998a, 1998b; Lecordier *et al.*, 1999; Labruyère-Dadaglio *et al.*, sous presse). Cependant, aucune fonction biologique dans le développement intracellulaire des toxoplasmes n'a été décrite. D'ailleurs, aucune homologie significative avec des protéines connues a été observée à la suite de l'interrogation de banques de données. Le développement des techniques de la génétique inverse rend désormais possible une approche directe par double recombinaison homologue. Il s'agit d'un événement particulier au cours duquel les séquences d'un marqueur de sélection viennent remplacer celles d'un gène d'intérêt. Une telle approche est réalisable si la protéine d'intérêt n'est pas essentielle pour le toxoplasme. De plus, le génome du toxoplasme est haploïde pendant une grande partie de son cycle, ceci permet un événement de double recombinaison homologue en une seule étape.

Dans le but d'appréhender la fonction des protéines GRA5 et GRA6, notre objectif était d'obtenir un mutant déficient pour l'expression de ces protéines. Lorsque le travail a été engagé, un système de transfection stable et de sélection positive était à notre disposition. Ce système exploite la sensibilité naturelle que les toxoplasmes ont pour le chloramphénicol. D'ailleurs, cette approche avait permis d'obtenir une lignée de toxoplasmes déficiente pour l'expression de la protéine ROP1 (Kim *et al.*, 1993) et une seconde pour la protéine SAG3 (Tomavo, non publié). Cependant, une telle démarche n'avait pas été utilisée pour obtenir des mutants nuls ni pour GRA5 ni pour GRA6.

1) Obtention et Caractérisation du mutant nul GRA5

Chez T. gondii, la fréquence d'intégration par double recombinaison homologue est faible contrairement à d'autres parasites protozoaires ou à E. coli (Shen et al., 1986; Finbarr-Tobin et al., 1992; Gwo-Shu Lee et al., 1990). Elle est proportionnelle à la longueur des fragments homologues. Cette fréquence est d'environ 50 % lorsque la longueur des séquences génomiques est de 8 kb (Donald and Roos, 1993).

Une stratégie dite du "piège à promoteur", combinée au système de sélection positif, a été testée. Cette technique, utilisée avec succès chez les mammifères (Schwartzberg *et al.*, 1989; Sedivy and Sharp, 1989), n'autorise l'expression du marqueur de sélection que s'il est placé sous le contrôle d'un promoteur endogène. Bien que l'efficacité d'enrichissement des

clones recombinants soit très élevée chez les cellules de mammifères (Sedivy and Sharp, 1989), celle-ci n'a pas eu d'effet évident dans l'enrichissement des parasites recombinants. Enfin, le récent développement de nouvelles techniques de sélection du toxoplasme nous a permis de résoudre ce problème par un système de "contre-sélection" ou de double sélection positive/négative (Zimmer *et al.*, 1994 ; Donald *et al.*, 1998). L'exploitation de cette double sélection "positive et négative" a été utilisée pour la première fois avec succès pour isoler des mutants déficients pour l'expression de la protéine GRA5.

L'analyse du phénotype du mutant nul GRA5 n'a pas révélé d'atténuation de la virulence du parasite chez la souris. De plus, la capacité d'invasion de ces mutants dans des cellules fibroblastiques n'est pas altérée. Ils se trouvent isolés du cytoplasme de la cellule-hôte, à l'intérieur d'une vacuole parasitophore dont l'ultrastructure n'est pas altérée. A l'intérieur de la cellule-hôte, l'absence de la protéine GRA5 n'a pas d'effet sur la multiplication des parasites. Par ailleurs, la synthèse des autres protéines GRA dans le mutant nul GRA5 ne semble pas modifiée : ces protéines présentent, en effet, un comportement dans les granules denses similaire à celui observé dans la souche parentale. Ceci suggère que les protéines GRA dans le mutant GRA5 seraient stockées dans les granules sous forme soluble et membranaire et qu'elles seraient sécrétées, après l'invasion de la cellule-hôte, dans la vacuole parasitophore.

2) Caractérisation d'autres mutants nuls chez T. gondii

Le remplacement de séquences ADN au locus d'un gène par recombinaison homologue est une approche couramment employée pour appréhender la fonction d'une protéine. Cependant, contrairement à d'autres parasites protozoaires incluant les kinéplastides (Trypanosome, Leishmanie) et le Plasmodium, où l'intégration d'ADN exogène se produit exclusivement par recombinaison homologue (Cruz et al., 1991; Van Dijk et al., 1995; Wu et al., 1996), chez le toxoplasme, l'intégration de transgène se fait à la fois par des mécanismes homologue et non homologue (Donald and Roos, 1993, 1994). Afin d'inactiver un gène par un événement de double recombinaison homologue, différentes stratégies ont été employées chez T. gondii. A l'heure actuelle, ces stratégies ont permis d'obtenir avec succès huit populations parasitaires déficientes pour l'expression d'une protéine soit de granule dense (GRA2, GRA5), soit de rhoptries (ROP1), soit de surface (SAG3), soit spécifique du stade bradyzoïte (BAG1), soit possédant une activité enzymatique (UPRT, HXGPRT, DHFR-TS) (Mercier et al., 1998b ; Kim et al., 1993 ; Tomavo et al., non publié ; Bohne et al., 1998 ; Donald and Roos, 1994, 1995; Donald et al., 1996). Toutes ces approches montrent des similarités avec les systèmes de recombinaison décrits chez les mammifères ou chez la levure (Hasty et al., 1991; Sedivy and Sharp, 1989) (tableau 10). A l'exception de la stratégie employée pour le mutant nul GRA5', elles sont toutes basées d'une part, sur une sélection positive et d'autre part, sur l'utilisation de constructions plasmidiques contenant des séquences génomiques de plusieurs kilo bases. Bien que l'événement de double recombinaison homologue a très peu été étudié chez le toxoplasme, les travaux de Donald et Roos montrent l'importance de la longueur des séquences génomiques sur la fréquence de l'événement de double recombinaison homologue. En effet, pour des séquences génomiques de 7,6 kb de longs, le pourcentage de recombinaison homologue est de 60 % et de 40 % pour la recombinaison non homologue. Par contre lorsque la longueur de ces séquences augmente (15,7 kb), la fréquence de la recombinaison homologue) (Donald and Roos, 1993).

Locus d'intérêt	gène de sélection	résistance	Longueur des régions génomiques	Nature et quantité de l'ADN	Nombre Parasites
GRA2	ble	Phléomycine	5'flanquant: 3200 pb 3'flanquant: 2400 pb	50 μg linéaire 300 μg circulaire	1,6.10 ⁸
ROP1	CAT	Chloramphénicol	5'flanquant: 1300 pb 3'flanquant: 950 pb	20 µg linéaire	2. 10 ⁷
SAG3	CAT	Chloramphénicol	5'flanquant: 2800 pb 3'flanquant: 2200 pb	linéaire	
UPRT	UPRT*	5-fluorouracil	11 kb séquences génomiques	20 à 100µg linéaire et circulaire	2. 10 ⁷
HXGPRT	HXGPRT*	6-thioxanthine	11,5 kb séquences génomiques	50 μg linéaire et circulaire	2. 10 ⁷
DHFR-TS	DHFR-TS*	pyriméthamine	7,6 et 15,7 kb séquences génomiques	50 μg linéaire et circulaire	1. 10 ⁷
BAG1	CAT	Chloramphénicol			
GRA5	CAT HXGPRT	Chloramphénicol 6-thioxanthine	5'flanquant: 2100 pb 3'flanquant: 1800 pb	100 μg linéaire	2. 10 ⁷

<u>Tableau 10</u> : Résumé des différentes stratégies d'obtention des différents mutants nuls chez *T. gondii*.

* : séquence codante du géne modifiée par mutagenèse dirigée.

Par contre, ces différentes stratégies ne mettent pas en évidence une quelconque relation entre le nombre de copie et la nature (linéaire et circulaire) de l'ADN transfecté et la fréquence de l'événement de double recombinaison homologue.

L'analyse de ces différents mutants met en évidence que l'absence d'expression d'une protéine n'est pas léthale pour le toxoplasme. Ceci a d'ailleurs marqué le rôle non essentiel d'une enzyme impliquée dans les voies métaboliques (synthèse des folates, bases purines ou bases pyrimidiques). Le rôle de certains de ces mutants nuls (ROP1⁻, GRA2⁻, SAG3⁻) a été appréhendé dans la pathogenèse et en particulier au cours de la phase aiguë de l'infection (Soldati et al., 1995 ; Mercier et al., 1998b ; Tomavo et al., non publié). La phase aiguë de l'infection toxoplasmique se caractérise à la fois par une multiplication et une dissémination rapide des parasites dans les tissus nerveux et musculaires. La souris est souvent utilisée comme modèle expérimental de la maladie. En effet, les souches virulentes provoquent sa mort au cours de la phase aiguë de l'infection, alors que les souches non virulentes permettent l'installation de la phase chronique de l'infection. L'infection toxoplasmique chez l'homme se fait généralement après l'ingestion de kystes ou d'oocystes. Les bradyzoïtes et les sporozoïtes, contenus dans ces formes de résistance, se différencient en tachyzoïtes et se propagent dans l'organisme. L'analyse de la virulence de ces mutants nuls, chez la souris après l'inoculation par voie intrapéritonéale, montre la contribution des protéines GRA2 et SAG3 dans la virulence parasitaire. Par contre, la multiplication de ces parasites, in vitro, n'est pas altérée par l'absence de ces protéines. D'autre part, d'un point de vue ultrastructural, ces analyses montrent le rôle d'une part, de la protéine ROP1 dans la morphologie et l'aspect des rhoptries et d'autre part, celui de la protéine GRA2 dans la formation du réseau intravacuolaire (Mercier et al., non publié). Par contre, lors de la phase chronique de l'infection, seul le phénotype du mutant BAG1⁻ a été appréhendé. Alors que l'absence de la protéine BAG1 n'altère ni la morphologie, ni la fréquence de formation des kystes, elle intervient sur une diminution du nombre de kystes (Bohne et al., 1998 ; Shang et al., 1999).

3) Exploitation du mutant nul GRA5

Dans le cas du mutant nul GRA5⁻, la protéine GRA5 n'intervient pas dans la virulence parasitaire observée chez la souris. Cependant, bien que le tropisme membranaire de la protéine GRA5 suggère d'une part, sa participation probable aux processus impliqués dans la modification de la vacuole parasitophore et d'autre part, son implication dans le développement parasitaire, l'analyse de son phénotype ne permet pas de conclure sur la participation de la protéine GRA5 dans de tels mécanismes. Dans l'hypothèse que les protéines GRA sont importantes dans le développement du parasite, celles-ci pourraient présenter des fonctions biologiques redondantes entre elles. Dans ce cas, la réalisation de multi-mutants nuls

Discussion

pour plusieurs protéines GRA permettrait d'aborder la contribution de ce système de redondance entre les protéines GRA. En effet, l'ultrastructure de la vacuole parasitophore en microscopie électronique n'est pas altérée après l'infection de cellules fibroblastiques par le mutant nul GRA5⁻. Cependant, ces observations ne permettent pas d'exclure une participation probable de la protéine GRA5 dans le maintien de la vacuole parasitophore. D'ailleurs, l'analyse de sa séquence protéique primaire a révélé de faibles homologies avec des protéines présentent dans le cytosquelette des neurones. La présence notamment d'autres protéines GRA dans la membrane de la vacuole, comme les protéines GRA3 et GRA7, pourrait également contribuer de façon redondante à ce maintien structural (Bermudes et al., 1994a ; Mévelec et al., 1992). L'analyse en microscopie électronique de l'ultrastructure d'une vacuole parasitophore dépourvue de certaines protéines GRA (GRA3, GRA5 et/ou GRA7) pourrait déterminer la participation de ces molécules à la fois dans son maintien et dans les mécanismes développés par le parasite pour éviter la fusion avec les compartiments endocytiques de la cellule-hôte. La disponibilité de plusieurs marqueurs de sélection permet d'envisager la réalisation d'autres mutants nuls (GRA3⁻ et GRA7) et de la combinaison de plusieurs mutants (GRA5⁻/GRA3⁻; GRA5⁻/GRA7⁻ et GRA5⁻/GRA3⁻/GRA7⁻).

Par ailleurs, l'absence de la protéine GRA5, ne semble pas modifier pas la synthèse des autres protéines GRA. Une étude de la localisation de ces protéines à l'intérieur de la vacuole parasitophore par immunofluorescence appréhenderait la participation éventuelle de la protéine GRA5 dans le tropisme membranaire des protéines GRA. En effet, des travaux récents montrent que le trafic de la protéine GRA6, dans le mutant nul GRA2, est perturbé après sa sécrétion dans la vacuole. La protéine GRA6 ne transite plus par la partie postérieure du parasite, cependant, à un stade de développement plus avancé, elle se comporte comme une protéine intégrale de membrane (Mercier *et al.*, non publiés). De plus, la formation d'un complexe multimérique fonctionnel comprenant les protéines GRA2, GRA4 et GRA6 a été mis en évidence dans les membranes du réseau tubulaire (Labruyère-Dadaglio *et al.*, sous presse). L'implication de la protéine GRA5 dans la membrane de la vacuole parasitophore présentent un aspect punctiforme (Lecordier and Cesbron-Delauw, non publié).

Le rôle de la protéine GRA5 dans la vacuole pourrait être également appréhendé en étudiant son implication d'une part, dans les échanges métaboliques entre le parasite et la cellule-hôte et d'autre part, dans les mécanismes de communication. La vacuole parasitophore constitue une zone clé à l'interface entre les parasites et la cellule-hôte à la fois dans la communication et dans les échanges métaboliques. D'ailleurs, la diffusion, à travers la membrane de la vacuole parasitophore, de petites protéines (1300-1900 daltons) suggère son rôle dans les échanges métaboliques. En effet, la présence d'un pore dans la membrane cette vacuole dont la taille d'exclusion serait de 1200 daltons faciliterait les échanges de nutriments (Schwab *et al.*, 1994). La localisation membranaire de la protéine GRA5 permet d'imaginer son implication potentielle dans la formation de ce pore et/ou dans la formation de canaux facilitant ainsi les échanges métaboliques. Ceci pourra être analysé en comparant le suivi de traceurs fluorescents au travers de la membrane de la vacuole parasitophore entre le mutant nul GRA5⁻ et son complémenté.

De plus, à la suite de la pénétration du parasite dans la cellule-hôte, d'étroites relations se créent entre les mitochondries et des éléments du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte et la membrane de la vacuole parasitophore. Des travaux récents montrent que des protéines de rhoptries également associées à la membrane de la vacuole parasitophore interviennent dans l'ancrage des mitochondries le long de la membrane vacuolaire (Sinai *et al.*, 1997). La participation de la protéine GRA5 dans ces mécanismes d'ancrage et/ou dans la transduction des signaux n'est pas à exclure.

4) Conclusions

La combinaison de différentes approches expérimentales nous permettra probablement de définir la fonction biologique de la protéine GRA5 au cours du développement intracellulaire du parasite. La protéine GRA5 est une protéine commune à tous les stades parasitaires (tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte). Elle est, en effet, détectée d'une part, au niveau de la paroi du kyste (bradyzoïtes) et d'autre part, à la membrane de la vacuole parasitophore délimitant des tachyzoïtes parasitaire (Torpier et al., 1993; Cesbron-Delauw, 1994). De plus, au cours du développement à l'intérieur de la cellule-hôte, les sporozoïtes contenus dans l'oocyste (forme de résistance extérieure), forment deux vacuoles parasitophores, la première, (pv1) pendant l'invasion cellulaire et la seconde (pv2) 18 à 24 heures après l'infection. La première vacuole (pv1) présente une taille plus large et ne contient pas de réseau intravacuolaire (Speer et al., 1995). Jusqu'à présent, seule la protéine de granule dense GRA5 a été détectée dans cette vacuole (pv1) (Tilley et al., 1997). La persistance de la protéine GRA5 dans les stades de résistance (bradyzoïte et sporozoïte) suggère qu'elle joue un rôle important dans l'interface hôte-parasite. Cependant, le mutant nul GRA5, dont nous disposons actuellement, ne nous permet pas d'appréhender le rôle de la protéine GRA5 dans ces deux formes de résistance puisque ce mutant a été obtenu dans la souche RH, incapable de se différencier en bradyzoïte ou en sporozoïte. L'obtention de mutants nuls GRA5, dans les formes bradyzoïte à partir d'une souche kystogène (Prugniaud ou 76K) et sporozoïte à partir de la souche VEG après l'infection de chat (Dubey, 1995), permettrait d'analyser le rôle de cette protéine au cours du cycle parasitaire. Un mutant dans des sporozoïtes permettrait d'analyser, par exemple, leur capacité à accomplir un cycle complet chez le chat. La participation de la protéine GRA5 pourrait être analysée d'une part, dans l'ultrastructure de la vacuole parasitophore entourant les sporozoïtes et d'autre part, dans la paroi du kyste délimitant les bradyzoïtes. De plus, afin de détecter plus facilement un mutant nul GRA5⁻ dans une souche kystogène exprimant de manière stable la protéine β -galactosidase (β -gal) peut être envisagée. L'existence d'une souche Prugniaud, β -gal rend cette approche réalisable. En effet, l'activité de cette protéine permet sa détection par des substrats colorimétriques. Le phénotype de ce mutant *in vivo* et *in vitro* pourrait être étudié. Ceci pourrait être réalisé dans différents modèles animaux (rats, souris). La capacité qu'a le mutant nul GRA5⁻ à former des kystes dans différents organes ainsi que leur dénombrement permettront d'étudier le rôle de la protéine GRA5 dans le développement du stade bradyzoïte. De même, l'analyse du taux de cytokines (IFN γ , TNF α , IL-2, IL-10 et IL-12) permettra d'aborder sa participation dans la réponse immunitaire anti-toxoplasmique.

D'autre part, les résultats obtenus à la suite de l'étude de la protéine GRA2 montrent l'intérêt de réaliser un mutant n'exprimant plus la protéine GRA6. L'ultrastructure du réseau ainsi que la sécrétion postérieur de la protéine GRA2 dans le mutant GRA6⁻ permettraient de mieux comprendre l'implication de ces protéines dans la formation du réseau intravacuolaire. D'ailleurs, la réalisation d'un mutant nul GRA6⁻ est en cours du fait de la disponibilité à la fois d'un système de double sélection négatif-positif ainsi qu'une construction plasmidique 5'GRA6/CAT/3'GRA6.

Ces différents mutants pourront être utilisés d'une part, pour étudier le rôle de ces protéines par l'analyse de leur phénotype et d'autre part, comme système d'étude *in vivo* (interactions protéine-protéine, association membranaire). Ceci pourrait être réalisé dans une souche n'exprimant plus la protéine d'intérêt. L'introduction de cette protéine native par des systèmes artificiels de protéo-liposomes permettrait d'analyser de quelle manière cette protéine est ciblée et va s'intégrer dans les membranes. De même, ces mécanismes pourraient être étudiés par l'analyse de l'association membranaire de protéines chimères GRA5/GRA6 dans un contexte n'exprimant plus ces protéines.

III - Contribution à l'étude du ciblage différentiel des protéines GRA5 et GRA6 dans la vacuole parasitophore

A la suite de l'invasion dans la cellule-hôte, les protéines GRA contenues dans les granules denses du toxoplasme sont sécrétées sous forme soluble et sont ciblées différentiellement vers les membranes de la vacuole (Charif *et al.*,1990 ; Achbarou *et al.*, 1991b ; pour revue Cesbron-Delauw, 1994). La protéine GRA1 qui est une protéine soluble est détectée dans la matrice de la vacuole. Par contre, certaines protéines GRA, comme les protéines GRA3, GRA5 et GRA7 vont s'associer avec la membrane délimitante de la vacuole parasitophore, alors que d'autres (GRA2, GRA4 et GRA6) s'associent avec les membranes du réseau intravacuolaire. Bien que la caractérisation moléculaire des protéines GRA soit définie (pour revue Cesbron-Delauw, 1994), ils ne permettent pas d'appréhender par quels mécanismes post-sécrétoires ces protéines s'insèrent dans les membranes de la vacuole parasitophore.

Bien que les travaux du laboratoire ont permis de montrer que l'insertion des protéines GRA dans les membranes est un processus post-sécrétoire, les mécanismes moléculaires qui sous entendent leur tropisme différentiel ne sont pas connus. Afin d'identifier le (ou les) domaine(s) protéique(s) impliqués dans le ciblage membranaire différentiel des protéines de granules denses au sein de la vacuole parasitophore, nous avons étudié le comportement de protéines chimères GRA5/GRA6. Les protéines GRA5 et GRA6 ont été choisies comme modèles d'étude car elles présentent un ciblage différentiel au sein de la vacuole parasitophore. La protéine GRA5 s'associe avec la membrane délimitante de la vacuole parasitophore (Charif *et al.*, 1990 ; Lecordier *et al.*, 1993), alors que la protéine GRA6 s'insère dans les membranes du réseau intravacuolaire (Lecordier et al., 1995 ; Labruyère-Dadaglio *et al.*, sous presse).

1) Analyse du comportement de protéines chimères

Lorsque ce travail a été engagé, nous ne disposions pas de mutants déficients pour l'expression des protéines GRA5 ou GRA6. Notre objectif était de voir si la région transmembranaire de la protéine GRA5 pouvait jouer un rôle dans le tropisme de la protéine vers la membrane délimitante de la vacuole parasitophore. Dans ce cadre, nous avons étudié le comportement de trois lignées parasitaires exprimant de façon stable une construction chimérique contenant la région transmembranaire de la protéine GRA5 encadré soit la région N-terminale de la protéine GRA6 (N6T5C5-HA9), soit la région la région C-terminale de GRA6 (N5T5C6-HA9), soit les régions N- et C-terminales de GRA6 (N6T5C6-HA9). Dans les parasites extracellulaires, ces protéines chimériques présentent un comportement similaire à celui observé pour les protéines GRA endogènes (Lecordier *et al.*, 1999 ; Labruyère-Dadaglio *et al.*, sous presse). A la suite de l'invasion du parasite dans la cellule-hôte, toutes ces protéines chimériques, tout comme les protéines GRA endogènes, sont sécrétées au niveau du pôle apical. Par contre, la protéine N6T5C6-HA9 transite également à la partie postérieure du parasite suggérant son éventuelle association avec les membranes du réseau tubulaire. De plus, dans la vacuole parasitophore, ces chimères vont s'associer aux membranes. Cependant, la localisation de ces chimères par immunofluorescence indirecte n'a pas pu être définie.

2) Facteurs influençant l'association des protéines avec les membranes

Les protéines nouvellement synthétisées s'intègrent dans les membranes soit directement dans la bicouche lipidique, comme c'est le cas pour les petites protéines de la paroi bactérienne (protéine M13, Kuhn., 1987), soit par l'intermédiaire de protéines chaperonnes, telle que la protéine bactérienne SecB (Kumamoto and Francetic, 1993). Cependant, dans ces deux mécanismes, l'intégration des protéines dans les membranes est corrélée au caractère hydrophobe des segments à l'intérieur des membranes. C'est d'ailleurs une des caractéristiques de la région transmembranaire. De plus, dans le cas de protéines possédant une région transmembranaire, différents travaux mettent en évidence également le rôle d'une part, de la longueur de cette région et d'autre part, de la nature des acides aminés à la périphérie de cette région dans l'association membranaire des protéines. L'insertion des protéines intégrales de membrane à la surface des cellules de mammifères se fait par l'intermédiaire d'un segment transmembranaire d'une longueur de 17 à 30 acides aminés. La création par mutagenèse dirigée d'une région de 12 acides aminés dans la région transmembranaire de la protéine CD2 humaine interfère avec la stabilité de cette protéine avec la bicouche lipidique (Corcao et al., 1995). De la même manière, les travaux réalisés chez la levure montrent l'importance de la longueur et de la composition de la région transmembranaire dans l'association de la protéine Ufelp (protéine t-SNARE du réticulum endoplasmique) avec les membranes (Rayner and Pelham, 1997). Par ailleurs, la charge des acides aminés adjacents à la région transmembranaire joue un rôle important dans l'orientation. Ceci a notamment été mis en évidence chez la levure, où une charge positive en N- ou C-terminal n'a pas d'effet sur l'orientation de la protéine Nexo, alors qu'une charge négative a un effet inverse sur son orientation (Harley et al., 1998).

Chez *T. gondii*, les mécanismes post-sécrétoires, impliqués dans l'intégration membranaire des protéines, et plus particulièrement ceux intervenant dans l'insertion des protéines GRA dans les membranes vacuolaires (membrane délimitante de la vacuole parasitophore et membrane du réseau intravacuolaire) ont été peu étudiés (Mercier *et al.*, 1998a ; Lecordier *et al.*, 1999 ; Labruyère-Dadaglio *et al.*, sous presse). Des analyses précédentes, réalisées sur la protéine GRA5, montrent l'importance de cette région (18 acides

aminés) dans son association avec la membrane de la vacuole parasitophore (Lecordier et al., 1999). Par contre, à l'heure actuelle, il n'existe pas de preuves mettant en évidence le rôle de la région transmembranaire (longueur et/ou charge des acides aminés adjacents) dans le tropisme différentiel des protéines GRA5 et GRA6 pour la membrane délimitante de la vacuole parasitophore et pour les membranes du réseau intravacuolaire respectivement. Il est possible d'envisager une telle hypothèse pour les protéines GRA5 et GRA6 puisque la comparaison de la taille des régions transmembranaires entre ces deux protéines montre que la région transmembranaire de la protéine GRA6 est plus longue d'un acide aminé (19 acides aminés). D'ailleurs, grâce aux progrès de la manipulation génétique de T. gondii, nous avons réalisé des souches de toxoplasmes exprimant de manière stable des protéines de fusion GRA5HA9 additionnées d'un acide aminé dans sa portion transmembranaire et GRA6HA9 délétées d'un acide aminé. L'analyse de leur localisation après l'invasion dans la cellule-hôte, apportera peutêtre des indications intéressantes sur le tropisme membranaire de ces protéines. La description récemment d'une nouvelle protéine de granules denses, GRA7 (Jacobs et al., 1998 ; Fischer et al., 1998), a permis de comparer la région transmembranaire entre les protéines associées à la membrane délimitante de la vacuole parasitophore (GRA5 et GRA7), et les protéines associées aux membranes du réseau tubulaire (GRA4 et GRA6). Cette comparaison rend cette hypothèse peu vraisemblable car aucune corrélation entre la longueur de la région transmembranaire et le tropisme membranaire n'est trouvée. Cette observation confirme d'une part, l'importance de la région transmembranaire dans l'association membranaire de ces protéines et d'autre part, elle suggère le rôle éventuel des régions N- et/ou C-terminale dans leur tropisme membranaire. La topologie des chimères GRA5/GRA6 au sein de la vacuole parasitophore apportera probablement des renseignements intéressants quant à l'influence des différents domaines protéines.

3) Conclusions

Dans le but d'étudier les domaines protéiques impliqués dans le ciblage des protéines dans la vacuole, l'analyse de la localisation des chimères N6T5C5-HA9, N5T5C6-HA9 et N6T5C6-HA9 contribuera probablement à mieux comprendre ces mécanismes d'insertion membranaires post-sécrétoires. Afin de déterminer par immunofluorescence la localisation membranaire de ces chimères, nous envisageons d'améliorer les conditions de fixation et de perméabilisation des cellules. Cependant, il n'est pas impossible d'imaginer que l'association de ces protéines avec les membranes vacuolaires soit gênée par des problèmes d'encombrement stériques. En effet, les différentes analyses de localisation des protéines GRA au sein de la vacuole révèlent que ces protéines sont très abondantes (Charif *et al.*, 1990 ; Lecordier *et al.*, 1993, 1995). Dans ce cas, l'utilisation de toxoplasmes déficients pour l'expression des
protéines GRA5 ou GRA6 ou de double mutants nuls GRA5, GRA6 pour étudier l'association membranaire de ces protéines pourrait être envisagée.

Par ailleurs, ces protéines chimères pourraient être utilisées pour étudier quel(s) est (sont) le(s) domaine(s) protéique(s) intervenant dans les interactions protéine-protéine. En effet, la détection de la protéine N6T5C6-HA9 dans la partie postérieure du parasite, quelques minutes après l'invasion, suggère que les domaines N- et C-terminaux de la protéine GRA6 sont importants dans son transport vers le pôle postérieur du parasite. Par ailleurs, les résultats obtenus à la suite de l'analyse du phénotype du mutant nul GRA2⁻ montrent que la protéine GRA2 pourrait jouer le rôle de translocon en assurant le transport de la protéine GRA6 (Mercier *et al.*, 1998b). Il serait donc intéressant de rechercher si la protéine GRA5 s'associe avec d'autres protéines intervenant alors dans le tropisme membranaire de ces protéines par des expériences de "cross-linking". Si une telle association existe, les protéines chimères GRA5/GRA6 permettraient d'étudier le rôle des différents domaines protéiques de GRA5 dans son interaction protéine-protéine.

De plus, dans le but de compléter notre étude, la réalisation d'autres lignées de toxoplasmes, exprimant de façon stable, les protéines chimériques N5T6C5-HA9, N5T6C6-HA9 ou N6T6C5-HA9 permettraient d'appréhender le rôle des différents domaines des protéines GRA5 et GRA6 dans leur tropisme différentiel.

Conclusion générale

En conclusion, au cours ce travail de thèse, nous avons mis en évidence l'existence d'un polymorphisme de taille des protéines GRA5 et GRA6 chez différentes souches de toxoplasmes. Ce polymorphisme permet de répertorier les souches parasitaires dans les trois groupes génotypiques de *Toxoplasma gondii*.

Dans un second temps, grâce au développement de la manipulation génétique du toxoplasme, nous avons abordé la fonction de la protéine GRA5 par l'invalidation de son gène. La mise en place d'un système de double sélection "positive-négative" a permis l'obtention d'un mutant nul GRA5 dans la souche RH. L'analyse du phénotype du mutant nul a mis en évidence que la protéine GRA5 est une protéine non essentielle pour les toxoplasmes de la souche RH. De plus, l'absence de son expression ne perturbe ni l'ultrastructure de la vacuole parasitophore, ni la virulence chez la souris, ni la multiplication intracellulaire du toxoplasme.

Enfin, dans le cadre des études sur les mécanismes d'insertion membranaire postsécrétoire des protéines GRA, la troisième partie de ce travail visait à appréhender l'étude du tropisme différentiel de GRA5 et GRA6 pour les membranes vacuolaires, par l'expression de protéines chimériques (GRA5-GRA6). Des lignées stables de toxoplasmes exprimant les protéines hybrides (échange des domaines N- et C- terminaux) fusionnées à leur extrémité Cterminale avec l'épitope du virus de l'influenza ont été obtenues. Les protéines chimériques N5T5C6-HA9, N6T5C5-HA9 et N6T5C6-HA9 se comportent comme des protéines membranaires dans la VP. L'analyse de leur trafic intravacuolaire, 10 minutes après l'invasion cellulaire, a révélé que seule, la protéine N6T5C6-HA9 se comporte comme GRA6 en transitant par la partie postérieure du parasite. Les protéines N5T5C6-HA9, N6T5C5-HA9 semblent se comporter comme la protéine GRA5. Ces résultats suggèrent l'intervention des domaines N-et C-terminaux de GRA6 lors de son accumulation postérieure dans la VP.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives tant sur le plan appliqué que fondamental.

Sur le plan appliqué :

L'existence d'un polymorphisme des protéines GRA5 et GRA6 devra être considérée dans les stratégies visant d'une part, à améliorer le diagnostic sérologique de la toxoplasmose et d'autre part, à évaluer l'influence du génotype parasitaire sur la pathogénicité des souches toxoplasmiques.

-Sur le plan fondamental :

La démonstration de l'efficacité d'un système de double sélection pour l'obtention de mutants nuls permettra de rationaliser et optimiser l'obtention de tels mutants chez le toxoplasme. Ainsi, en ce qui concerne les protéines GRA, l'existence d'interactions entre ces protéines ainsi que leur possible redondance soulignent la nécessité d'obtenir d'autres mutants nuls ainsi que des "multi-mutants" où plusieurs gènes *GRA* seront invalidés. De même, l'existence d'un polymorphisme des protéines GRA en fonction des souches d'une part et l'implication potentielle de ces protéines dans la formation de la paroi kystique, d'autre part, incitent à l'obtention de mutants nuls dans différentes souches parasitaires. La convergence de ces approches génétiques devrait permettre de mettre en évidence des phénotypes intéressants pour l'étude du rôle des protéines GRA.

Enfin, l'approche engagée pour l'étude du tropisme membranaire différentiel des protéines GRA5 et GRA6 par l'expression de protéines chimériques devra être étendue à d'autres protéines chimères et suivie d'une étude fine de leur topologie membranaire. De plus, l'étude des interactions protéines-protéines et protéines-lipides de l'ensemble de ces protéines chimériques ainsi que l'analyse de leurs modifications post-traductionnelles, la phosphorylation en particulier, devraient permettre d'appréhender au niveau moléculaire les mécanismes impliqués dans le processus d'insertion membranaire post-sécrétoire des protéines GRA dans la vacuole parasitophore.



I - Biologie moléculaire

1) Préparation de l'ADN génomique

Les préparations d'ADN génomique (RH, Prugniaud, souches 76K, C, C56...) ont été réalisées à partir de tachyzoïtes provenant **d'ascites de souris infestées** ou issus de **l'infection d'un tapis de cellules Hep-II**. Les parasites ont été recueillis puis purifés après filtration sur une membrane de polycarbonate d'une porosité de 3 μ m (Nucléopore). Après une centrifugation de 10 minutes à 3000 trs./min., les parasites ont été lavés deux fois en PBS. Le culot a été repris dans une solution d'EDTA 0.1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, SDS 1 % et protéinase K 2 μ g/ml et incubé une nuit à 50°C. Les protéines contaminantes ont été éliminées par une extraction au phénol/chloroforme. L'ADN a été précipité avec deux volumes d'éthanol absolu puis lavé en éthanol 70 %. L'ADN a été solubilisé dans un tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) pendant toute une nuit à 4°C ; sa concentration a été déduite après estimation de la densité optique de la solution à 260 nm.

2) Hybridation des acides nucléiques

La technique d'hybridation utilisant des sondes nucléiques a été employée pour identifier des séquences spécifiques d'acides nucléiques dans l'ADN génomique (**Southern Blot**) ou dans une molécule d'ADN recombinant (**Dot Blot**).

A) Southern et Dot Blot

a) Southern Blot :

Les Southern Blot ont été réalisés selon la méthode standard de Southern (Southern, 1975). L'ADN génomique a été digéré par une ou plusieurs endonucléases de restriction et les fragments d'ADN ont été séparés, par électrophorèse en gel d'agarose 0.8 %, dans un tampon TAE 1X (Tris-HCl 4mM, CH₃COO'Na⁺ 2mM, EDTA 0.2 mM, pH 7.9). Les fragments ont été visualisés après coloration au bromure d'Ethidium sous rayons ultraviolets (U.V.). L'ADN a été dénaturé par incubation du gel d'agarose dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0.25 M) pendant 30 minutes. Après neutralisation dans un tampon de neutralisation (Tris-HCl 0.5 M pH 7.0 et NaCl 1.5 M) pendant 30 minutes, celui-ci a été transféré sur une membrane de nylon non chargée (Hybond-N, Amersham) ou de nitrocellulose (Schleicher et Schuell) grâce à un transfert par capillarité dans une solution saline SSC 10X. L'ADN a été fixé par covalence à la membrane de nylon à l'aide de rayons U.V. pendant 3 minutes ou à la membrane de nitrocellulose pendant 2 heures à 80°C.

b) Dot Blot:

Les Dot Blot ont été réalisés à partir d'ADN génomique ou plasmidique. L'ADN a été déposé soit à l'aide d'un système de Dot Blot, soit par repiquage des colonies bactériennes issues d'une nuit de culture à 37°C sur une membrane de nylon non chargée (Hybond-N, Amersham) ou de nitrocellulose. L'ADN a ensuite été dénaturé 10 minutes dans une solution de NaOH 0.5 M et NaCl 1.5 M, neutralisé 20 minutes dans une solution de Tris-HCl 1 M pH 7.5 et NaCl 1.5 M. Les membranes ont été rincées 10 minutes en SSC 2X (NaCl 0.3 M, Na₃C₆H₅O₇,H₂O 0.03 M, pH 7.2), séchées puis l'ADN a été fixé en utilisant les conditions précédemment décrites.

B) Sondes nucléotidiques marquées à l' $[\alpha^{32}P]$ dCTP

Les sondes nucléotidiques ont été obtenues à la suite de la synthèse de fragments d'ADN en présence de $[\alpha^{32}P]$ -dCTP par le fragment Kleenow de l'ADN polymérase. Le marquage a été réalisé selon la technique de "random priming" à l'aide du kit "Megaprime DNA labelling systems" (Amersham).

a) Préparation des inserts d'ADN

Les inserts d'ADN ont été préparés soit par digestion enzymatique pendant 2h à 37°C soit par amplification par PCR (Section Matériels et Méthodes I.3). La pureté et la taille des fragments obtenus ont été vérifiées sur un gel d'agarose 1 % puis les fragments ont été purifiés par extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation en présence d'un dixième de volume d'acétate de sodium 0.3 M pH 4.8 et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après une centrifugation de 30 minutes à 13000 trs./min., l'ADN a été lavé en éthanol 70 % puis sa concentration a été estimée à 260 nm.

b) Marquage par l' $[\alpha^{32}P]$ dCTP

30 à 50 ng d'insert d'ADN ont été dénaturés 10 minutes à 95°C puis marqués en présence d'[α^{32} P] dCTP selon la méthode de "random priming" pendant 30 minutes à 37°C. La réaction a été arrêtée par addition d'EDTA 20 mM. L'insert d'ADN double brin marqué a été purifié sur une colonne Sephadex G-25 (Boehringer-Mannheim) éliminant les nucléotides libres. L'efficacité du marquage a été évaluée par comptage de la radioactivité incorporée en liquide de scintillation. La sonde a été dénaturée avant l'hybridation en présence d'une solution de soude 0.4 M.

C) Hybridation

Les membranes de nylon ou de nitrocellulose ont tout d'abord été pré-hybridées une heure à 68°C dans la solution d'hybridation (formamide 40 %, NaCl 0.9 M, SDS 1 %, EDTA 2mM,

Denhardt's 4X, sulfate de dextran 5 %, 50 μ g/ml d'ADN de sperme de hareng, phosphate de sodium 50 mM pH 6.5).

La sonde dénaturée a été ajoutée et les membranes ont été incubées toute une nuit à 68°C. Les membranes ont été lavées deux fois 15 minutes à température ambiante en SSC 2X, SDS 0.1% puis deux fois 15 minutes en SSC 0.1X, SDS 0.1%. Les Blots ont ensuite été séchés et autoradiographiés à -80°C entre deux écrans amplificateurs (X-Omat, Kodak).

3) Amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction : réaction d'amplification en chaine)

Les réactions d'amplification d'ADN ont été réalisées à partir du génome toxoplasmique ou de vecteurs plasmidiques recombinants. Les matrices génomiques ont été utilisées dans le cas de l'étude du polymorphisme des gènes *GRA5* et *GRA6* de différentes souches ou lors de l'amplification des régions flanquantes des gènes *GRA*. Les matrices d'origine plasmidiques ont été préparées suivant le principe de lyse alcaline et purifiées soit sur un gradient discontinu de CsCl soit sur une colonne d'affinité (Plasmid Maxi KitTM, Qiagen).

A) Les oligonucléotides

Afin de permettre un bon appariement avec la matrice, les amorces oligonucléotidiques spécifiques d'une taille suffisante ont été choisies pour amplifier la région d'intérêt. De même, des bases supplémentaires qui créent des sites de restriction facilitant le clonage ultérieur de ce fragment ont été introduites à l'extrémité de ces amorces.

Les oligonucléotides utilisés pour réaliser ces amplifications géniques sont détaillés dans les tableaux 11 et 12.

Noms	Séquence	Taille	Sens
Locus SAG1			
P30.3	5' CAATGTGCA CCTGTA GGA AGC 3'	21 b	S
P30.5	5' CAACGGTAATCACTCACGCG 3'	20 b	AS

Locus 850			
P850.1	5' AAGGACCTGGTAACAGTCC 3'	19 b	S
P850.2	5' TCAAGGCTTGGATGTTTCG 3'	19 b	AS

Noms	Séquence	Taille	Sens	Sites créés
gène GRA5				
D21 10		21 h	c	XhoI
F21.19	S TEAACTEGAGEEGEGTEGGTTTGGTTTGTGE S	31 b	3	au Cap site
P 21 2 0		21 h	٨S	XhoI
F21.20	S GIATCICGAGOOCAGACOTOOCCOUTTEC S	510	AS	au polyA

Noms	Séquence	Taille	Sens	Sites créés
gène <i>GRA6</i>				
P32 11		30 h	S	EcoRI
F 52.11	S TIGAATTEEOCOCOTETEATOCAAATOCCE S	500	3	au Cap site
P32 12		26 h	15	EcoRI
1 32.12		200	AS	au polyA

<u>Tableau 11 :</u> Nom, séquence, longueur en bases et orientation des oligonucléotides utilisés lors de l'étude du polymorphisme des gènes encodant pour les protéines de granules denses.

S : Sens, AS : Anti-Sens, les sites de restriction créés sont notés en gras.

Noms	Séquence	Taille	Sens	Sites créés
gène GRA5				
P21.1	5' GGATCGATGCATTTTGTTACTTCACGAAAATCGC 3'	34 b	AS	NsiI
				à l'ATG
D21.5	5' TTGATCCATCCGGATTTAGTGCGTGTAGCGCAGC3'	34 h	c	BamHI
F21.J	S TIGATOGATECOUATTIAUTOCOTOTAUCOCAUCS	540	3	au stop
P21.3	5' CCGTCAGTCAAGCTTATTTTGGTTTTTG 3'	28 b	S	HindIII

Primer T3	5' ATTAACCCTCACTAAAG 3'	17 b
Primer T7	5' AATACGACTCACTATAG 3'	17 b

Noms	Séquence	Taille	Sens	Sites créés
gène GRA6				
P32.1	5'ACGGATCGATGCATTTCGCCGACACTCCCAAG 3'	32 b	AS	NsiI
				à l'ATG
P32.8			S	PacI
1.52.0	STOTTOATIAATIAAUATUAAAACAUU S	200	S	au stop

<u>Tableau 12</u>: Nom, séquence, longueur en bases, orientation et sites de restriction créés des oligonucléotides utilisés lors de la stratégie d'obtention de mutants nuls GRA5- et GRA6-.

S : Sens, AS : Anti-Sens, les sites de restriction créés sont notés en gras.

B) Conditions d'amplification génique (PCR)

Les réactions d'amplification PCR ont été réalisées à l'aide de l'appareil Peltier Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research) à partir de 5 à 10 ng de matrice plasmidique ou de 1 μ g d'ADN génomique, dans un volume réactionnel de 50 μ l. Les matrices ont été placées en présence de 0.5 μ M d'amorces oligonucléotidiques, d'un mélange de désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 200 μ M, Pharmacia) de 4 unités de l'ADN polymérase Deep Vent_r.

Les réactions ont été effectuées en suivant le même principe. Les conditions d'amplification standard étaient les suivantes : une étape de dénaturation de 5 minutes à 94°C suivie de 30 à 40 cycles d'amplification. Chaque cycle se déroulait à la suite d'une étape de dénaturation (une minute

à 94°C), d'une étape d'appariement (une minute de 55°C) et d'une étape d'élongation (deux minutes à 72°C). La réaction se terminait par une étape d'élongation de 7 minutes à 72°C.

Ces conditions ont été modifiées lorsque de grands fragments devaient être amplifiés. Dans ces cas précis, les PCR ont été réalisées en présence de l'ADN polymérase Deep Vent_r (exo⁻) (New England Biolabs) avec des temps d'élongation de sept minutes.

A la suite de chaque amplification génique, la taille des fragments amplifiés a été vérifiée par électrophorèse d'un aliquot sur un gel d'agarose 1 % en TAE 1X. Les fragments de taille attendue ont été soit purifiés, digérés et clonés dans un vecteur plasmidique présentant des sites compatibles, soit sous clonés dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+) préalablement digéré par *Sfr*I (pPCR ScriptTM Amp SK(+) Cloning Kit, Stratagène).

4) Obtention de plasmides recombinants ou clonage moléculaire

Cette technique comprend deux étapes : création de molécules d'ADN recombinantes par clonage d'inserts dans des matrices plasmidiques et propagation et réplication de l'ADN recombinant.

A) Préparation des vecteurs plasmidiques et des fragments d'ADN

Les vecteurs plasmidiques et les fragments d'ADN issus de l'amplification génique ou contenus dans d'autres matrices vectorielles ont été digérés pendant 2 heures à 37°C en présence d'endonucléases de restriction (une unité d'enzyme par µg d'ADN) en respectant les conditions de digestion délivrées par le fabricant (Boehringer-Mannheim). A l'issue de cette incubation, la qualité des digestions a été vérifiée par électrophorèse d'un aliquot sur un gel d'agarose 1 % en tampon TAE 1X.

Les inserts d'ADN digérés ont été séparés sur un gel d'agarose préparatif 1 % (Gibco BRL). La bande correspondant à l'insert a été découpée sous U.V. puis purifiée à la suite d'une centrifugation de 10 minutes à 8000 trs./min. dans une colonne SpinX (Costar).

Les vecteurs plasmidiques digérés et les inserts d'ADN extraits de gels ont été séparés des protéines contaminantes par extraction au phénol/chloroforme. L'ADN a ensuite été précipité en présence d'un dixième de volume d'acétate de sodium 0.3 M, pH 4.8 et de deux volumes d'éthanol absolu. Après une centrifugation de 30 minutes à 13000 trs./min., les ADN ont été lavés avec de l'éthanol 70 % avant d'être séchés puis repris dans du TE. Afin d'estimer la concentration des ADN, une fraction a été prélevée et dosée sur minigel d'agarose 1 % en tampon TAE 1X en présence de quantité connue de marqueurs de poids moléculaire.

B) Ligation et transformation bactérienne

Le clonage des inserts d'ADN purifiés dans les vecteurs plasmidiques d'intérêt préalablement digérés a été obtenu à la suite d'une étape de ligation. La ligation a été réalisée pendant 30 minutes à 16°C en présence de la ligase du phage T4 à l'aide du kit de "Ligation expressTM" (Clontech).

Les produits issus de cette ligation ainsi que ceux obtenus à la suite du clonage des produit PCR dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+) ont été introduits dans des bactéries. Pour cela, les souches de bactéries XL-1 Blue et JM109 ont tout d'abord été rendues compétentes pour la transformation.

Deux modes de transformation ont été employés. Au cours du premier mode de transformation, les bactéries ont été rendues compétentes chimiquement par la méthode TFB (KMES 10mM, RbCl 0.1 M, MnCl₂, 4H₂O 45 mM, CaCl₂, 2H₂O 10 mM, HaCaCl₃ 3mM) (Sambrook *et al.*, 1989). Le produit de ligation a été placé en présence des bactéries rendues compétentes par un traitement au TFB/DMSO/DTT pendant 30 minutes sur glace avant de subir un choc thermique de 1 min. 30 sec. à 42°C. Des bactéries compétentes prêtes à l'emploi ont également été employées (Stratagène). Le second mode de transformation consiste à introduire l'ADN à la suite d'un choc électrique par électroporation (Stratagène).

A la suite de la transformation, les bactéries sont mises en culture en milieu LB pendant une heure à 37°C pour permettre l'expression du gène de résistance à l'ampicilline. Les bactéries sont ensuite étalées sur des boîtes de pétri LB-ampicilline (100 μ g/ml) et incubées une nuit à 37°C.

5) Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est un procédé permettant d'introduire des mutations dans une séquence d'ADN connue. Il s'agit un outil intéressant dans l'approche de l'étude entre la structure et la fonction des protéines ou dans l'identification de régions intramoléculaires ou d'acides aminés essentiel dans l'expression de gènes et dans la fonction des protéines. Cette technique a notamment été employée afin d'appréhender, dans un premier temps, le polymorphisme des protéines de granules denses GRA5 et GRA6 dans différentes souches et, dans un second temps, afin d'étudier le ciblage différentiel de ces protéines dans la vacuole parasitophore.

A) Les oligonucléotides

La mutation a été introduite directement dans une position désirée en utilisant un oligonucléotide spécifique. Cet oligonucléotide sert d'amorce d'ADN pour la synthèse *in vitro*

d'une nouvelle copie du gène contenant désormais la mutation désirée. Les oligonucléotides utilisés pour réaliser ces mutations ont été détaillés dans les **tableaux 13** et **14**.

Noms	Séquence	Taille	Sens	Sites créés
gène GRA5				
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				NheI/SphI/
P21.A	5' ACGTGGATCCGCATGCTAGCCTCTTCCTCGGC 3'	32 b	AS	<i>BamH</i> I au
				stop
DO1 SC		25 h	c	BstEII à
P21.00	J AACAAAAIGGIGACCGIAAAACGCGJ	250	3	l'ATG

S: sens ; AS : anti-sens ; les sites de restriction créés sont notés en gras.

Noms	Séquence	Taille	Sens
gène GRA5		-	
P21.N1	5' GTGCTTGGGGGGGGGGAACA 3'	19 b	S
P21.N1.rev	5' TGTTCACCCCCCAAGCAC 3'	19 b	AS
P21.N3	5' GAAGGTGCTAGGGGGGCGTGAACAACAA 3'	27 b	S
P21.N3.rev	5' TTGTTGTTCACGCCCCCTAGCACCTTC 3'	27 b	AS
P21.N4	5' GAAGGTGCTTGGGGGGCGTGAA 3'	21 b	S
P21.N4.rev	5' TTCACGCCCCCAAGCACCTTC 3'	21 b	AS
P21.N5	5' GCTAGGGGGGGGGGAACAACAA 3'	21 b	S.
P21.N5.rev	5' TTGTTGTTCACCCCCCTAGC 3'	21 b	AS

<u>Tableau 13 :</u> Nom, séquence, longueur en bases et orientation des oligonucléotides utilisés lors de la stratégie d'obtention des chimères GRA5.

S : Sens, AS : Anti-Sens, les bases mutées sont notées en gras.

Noms	Séquence	Taille	Sens	Sites créés
gène GRA6				
D32 A		24 h	S	BstEII à
Г <i>Ј</i> 2. П	J GOCGRAATGGTAACCOUTGGCATEJ	240	S	l'ATG
	· ·			BstEII
P32.C	5' CACAGCACCGGTGACCCTGTGGCG 3'	24 b	AS	après le
				Nterm6
D22 D		24 h	c	NheI après
r 52.D	J GETTETTIGETAGEAGGAETGGAJ	240	3	la TM6
		22 h	15	NheI au
F 52.E (KII)	J UTITICAGE TAGEATAATCAAAC J	23 0	AS	stop
P32.E		22 h	AC	<i>Nhe</i> I au
(Prugniaud)	J GITTICAGCIAGCAAAATCAAACJ	23 0	AS	stop

Noms	Séquence	Taille	Sens
gène <i>GRA6</i>			·
P32.N2	5' ATCTGGGGGGTGGTGGTGG 3'	18 b	S
P32.N2.rev	5' CCACCACCACCACAGAT 3'	18 b	AS

<u>Tableau 14 :</u> Nom, séquence, longueur en bases et orientation des oligonucléotides utilisés lors de la stratégie d'obtention des chimères GRA6.

S : Sens, AS : Anti-Sens, les bases mutées sont notées en gras.

B) Conditions de mutagenèse

Les vecteurs plasmidiques utilisés comme matrice lors de la réaction de mutagenèse ont été préparés par la méthode de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989) puis purifiés sur une colonne d'affinité (Plasmid Maxi KitTM, Qiagen). Afin d'introduire la mutation désirée dans la séquence d'ADN d'intérêt, deux oligonucléotides contenant les séquences mutées ont été choisis. Ces deux oligonucléotides complémentaires ont servi d'amorces d'amplification PCR. La séquence des amorces oligonucléotidiques a été répertoriée dans les **tableaux 13** et **14**. Les PCR ont été effectuées à l'aide de l'appareil Peltier Thermal Cycler (PTC-200, MJ Research) à partir de 10 ng de matrice plasmidique, dans un volume réactionnel de 50 μ l. Les matrices ont été placées en présence de 62.5 ng de chaque amorce oligonucléotidique, d'un mélange réactionnel contenant les dNTP et de 2.5 unités de l'ADN polymérase *Pfu* (Stratagène).

Les réactions ont été réalisées en suivant une étape de dénaturation initiale de 30 secondes à 95°C suivie de 18 cycles d'amplification. Chaque cycle comportait une étape de dénaturation (30 secondes à 95°C), une étape d'appariement (une minute à 55°C) et une étape d'élongation (2 minutes/ kb de plasmide).

A la suite de ces cycles d'amplification, l'ADN parental ayant servi de matrice est éliminé par digestion avec l'endonucléase de restriction *Dpn*I pendant une heure à 37°C. L'endonucléase *Dpn*I reconnait spécifiquement les ADN méthylés et ne digère donc pas l'ADN muté nouvellement synthétisé. Les produits digérés ont alors été transformés en bactéries de souche XL-1 Blue ou JM109

6) Sélection des plasmides recombinants et mutagénéisés

A) en présence d'antibiotiques

Les constructions plasmidiques ont été transformées dans des bactéries XL-1 Blue ou JM109 puis les bactéries ont été étalées sur une boîte de LB-Agar en présence d'antibiotique. Les bactéries transformées ont été sélectionnées en présence d'**ampicilline (100 \mug/ml)** et/ou de tétracycline (12,5 μ g/ml)

B) X-gal/IPTG

L'activité β -galactosidase a été utilisée pour sélectionner les bactéries transformées lors du sous clonage d'inserts PCR dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+). En effet, en présence d'X-gal (5 %) et d'IPTG (4 mM), l'insertion de fragments ADN dans le site *Sfr*I du vecteur pPCR Script Amp SK(+) perturbe l'expression du gène *LacZ* (codant pour la β -galactosidase). Par conséquent, les bactéries ayant intégré les plasmides recombinants ont un phénotype β -gal⁻ (colonie blanche) en présence d'X-gal et d'IPTG, alors que les bactéries contenant les plasmides sauvages ont un phénotype β -gal⁺ (colonie bleue).

C) Hybridation

A la suite de la transformation, les colonies sélectionnées ont été repiquées en double sur des boîtes quadrillées permettant un criblage en hybridation. Une empreinte de la première boîte a alors été réalisée sur une membrane de nitrocellulose. La recherche des clones bactériens contenant le plasmide d'intérêt a été effectuée par la technique d'hybridation des acides nucléiques avec une sonde d'ADN marquée au [³²P] (Section Matériels et Méthodes I.2).

D) Minipréparation d'ADN

Les clones recombinants ont ensuite été amplifiés en culture liquide en présence d'antibiotique puis une minipréparation de leur ADN plasmidique a été réalisée par la méthode de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989). L'ADN a été digéré par différentes enzymes de restriction en présence de RNase et les fragments engendrés ont été analysés sur gel d'agarose 1 % en tampon TAE 1X.

7) Préparation des constructions plasmidiques

Les plasmides recombinant ont été obtenus par lyse alcaline d'une culture bactérienne et purifiés soit sur une colonne d'affinité (Plasmid Maxi et midi KitTM, Qiagen), soit sur un gradient de chlorure de césium. La concentration de l'ADN double brin a été estimée par la mesure de la densité optique de la solution à 260 nm (Spectrophotomètre Beckman DU-64).

8) Séquençage

La séquence des différentes constructions chimériques ou mutées utilisées pour l'étude d'une part du polymorphisme des protéines de granules denses et d'autre part du ciblage différentiel de ces protéines au sein de la vacuole parasitophore, a été vérifiée par séquençage manuel ou automatique.

Le séquençage de l'ADN a été réalisé en utilisant la méthode décrite par Sanger (Sanger *et al.*, 1977) selon le principe de terminaison des chaînes. Les matrices séquencées étaient des ADN double brin (plasmidiques ou des inserts d'ADN). 7 à 10 μ g de la matrice ont été préalablement dénaturés, pendant 10 minutes, à température ambiante en présence de soude 0.4 M puis précipités par deux volumes d'éthanol en présence d'acétate de sodium 0.3 M pH 4.8 une nuit à -20°C. Après une centrifugation de 30 minutes à 13000 trs./min., l'ADN a été lavé puis repris dans de l'eau distillée. La réaction de séquençe a alors été rapidement amorcée par l'appariement de l'oligonucléotide.

A) Séquençage manuel

Le séquençage manuel a été réalisé en présence de $[^{35}S] \alpha$ -dATP (Amersham) à l'aide du kit "Deaza G/A^{T7} sequencing TM Mixes" (Pharmacia). Les réactions de séquence ont été analysées après migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide 6 % en tampon TBE 1X. Le gel a ensuite été fixé 15 minutes dans une solution d'acide acétique 10 %, méthanol 10 % puis séché et autoradiographié (film Biomax, Kodak).

B) Séquençage automatique

Le séquençage automatique a été réalisé en présence de fluorochrome couplé au dATP (CyTM5-13-dATP) à l'aide du kit "AutoReadTM Sequencing Kit" (Pharmacia).

C) Analyse des séquences d'ADN

Les séquences nucléotidiques ont été analysées grâce aux logiciels DNA Star (DNA star Inc.) et Omiga. Ces programmes ont permis d'identifier les différents sites de restriction, de prédire la taille et les différents cadres de lecture.

II - Biologie cellulaire

1) Préparation des parasites

Au cours de cette étude de nombreuses souches parasitaires provenant de chacun des trois groupes ont été utilisées. Les tachyzoïtes des souches RH et HXGPRT (groupe I), 76K et Prugniaud (groupe II) disponibles dans notre laboratoire ont été préparées à partir d'ascites de souris ou à partir de cellules en culture. Les souches utilisées dans l'analyse du polymorphisme nous ont été fournies par le laboratoire du Docteur Uwe Gross (Institut d'Hygiène et de Microbiologie. Université de Würzburg, Allemagne).

Plus généralement, la souche de laboratoire utilisée comme référence à travers le monde est la souche RH. Cette souche isolée en 1939 d'un enfant mort d'une encéphalite toxoplasmique (Sabin, 1941) est très virulente chez la souris. Afin de conserver sa virulence, elle est régulièrement entretenue par passages successifs chez la souris. C'est à partir de la souche RH que de nombreuses manipulations génétiques ont été réalisées (souches mutantes : HXGPRT⁻, RH/ β -galactosidase).

A) Préparation à partir d'ascites de souris

Les toxoplasmes ont été recueillis après lavage du péritoine de souris Swiss/OF1 (IFFA CREDO) infectées depuis trois jours. Les parasites ont été repris en milieu D10 (Gibco BRL) et purifiés à la suite d'une filtration à travers des membranes de polycarbonate de 3 μ m (Nucleopore) puis lavés deux fois en milieu D10.

B) Préparation à partir de culture de cellules

Afin d'entretenir ou d'amplifier les parasites en culture *in vitro*, des cellules Hep II (cellules hépithéliales humaines) sont cultivés en milieu D10 jusqu'à confluence. Les cellules sont alors infestées par des toxoplasmes récoltés du péritoine des souris. Après 4 jours de culture, le surnageant de culture a été prélevé. Afin d'éliminer les cellules non lysées et les débris cellulaires, les parasites ont été filtrés sur papier (Schleicher et Schuell) puis sur des membranes de polycarbonate 3 µm avant d'être lavés en milieu D10.

2) Transfection

A) Préparation des parasites

Les tachyzoïtes cultivés *in vitro* en cellules Hep II sont recueillis et filtrés à travers des membranes de polycarbonate de 3μ m. Les parasites sont centrifugés 15 min à 3000 trs./min, puis lavés dans 15 ml de cytomix (Van den Hoff, Moorman *et al.*, 1992). Après une centrifugation de 15 min à 3000 trs./min , le culot a été repris dans 5 ml de cytomix supplémenté par des agents antioxydants (GSH 5 mM, ATP 2 mM, pH 7.6, Sigma). Les tachyzoïtes vivants ont été comptés après coloration au bleu de Trypan (Flow Laboratories) et préparés dans du cytomix supplémenté à la concentration de 5.10⁷ parasites par ml pour les expériences d'expression transitoire ou de 2.10⁷ parasites par ml pour les transfections stables.

B) Préparation de l'ADN

L'ADN plasmidique a été préparé selon la technique de lyse alcaline des bactéries. Pour les transfection transitoires, l'ADN est purifié sur colonne par la méthode Qiagen suivi d'une extraction des protéines au phénol/chloroforme. Pour les transfections stables, l'ADN est purifié sur un gradient discontinu de CsCl (Sambrook *et al.*, 1989) suivi d'une extraction au N-butanol. L'ADN a ensuite été précipité toute la nuit à -20° C, en présence de NaCl 250 mM et de 2.5 volumes d'éthanol absolu puis centrifugé 30 min à 13000 trs./min. Le culot a été lavé en éthanol 70%, séché puis repris dans 100 µl de cytomix supplémenté.

C) Transfection transitoire (Soldati et al., 1993)

a) Conditions d'électroporation

 5.10^7 tachyzoïtes de la souche RH ont été placés avec 50 µg d'ADN plasmidique circulaire dans des cuvettes d'électroporation de 4 mm d'épaisseur (BTX). L'ADN a été introduit dans les parasites à la suite d'un choc électrique réalisé selon les paramètres suivants : 2250 V, 25 µF, 100 Ohms, 0.6 ms (Electro Cell Manipulator 600, BTX). Après le choc électrique, les tachyzoïtes ont été laissés 15 minutes à température ambiante avant d'être remis en culture 20 heures à 37°C dans 10 ml de D10. Les parasites ont alors été centrifugés et lavés deux fois dans une solution de PBS.

D) Transfection stable

a) Conditions d'électroporation

2.10⁷ tachyzoïtes ont été mis en contact avec l'ADN plasmidique en présence de cytomix supplémenté (GSH 5mM, ATP 2mM, pH 7.6) dans des cuvettes d'électroporation. Les tachyzoïtes utilisés provenaient soit de la souche RH pour les expériences de sélection positive soit de la souche mutante HXGPRT dérivant de la souche RH mais déficiente dans l'expression de l'enzyme HXGPRT (Roos *et al.*, 1994) pour les expériences d'expression des protéines GRA6-HA9 mutées et pour les doubles sélections (positive et négative).

En fonction du but recherché, la nature et la quantité de l'ADN plasmidique transfecté ont été modifiées, ce qui permet de distinguer deux systèmes de transfections stables. Le premier système avait pour objectif d'obtenir un enrichissement des toxoplasmes exprimant les protéines GRA6HA9. Dans ce cas, 100 µg de la construction GRA6HA9 d'intérêt ainsi que 10 µg du vecteur de sélection pminiHXGPRT ont été mélangés dans un rapport 10/1 puis co-précipités pour l'électroporation selon la technique précédemment décrite.

Dans le second système, dont le but était d'obtenir un mutant déficient pour l'expression de la protéine de granule dense GRA5 ou/et GRA6, différentes quantités d'ADN (10 μ g, 50 μ g, 100 μ g) ainsi que la nature (circulaire ou linéaire) des plasmides ont été testées. Les constructions plasmidiques ont été linéarisées pendant 10 heures à 37°C en présence d'enzymes de restriction (Boehringer-Mannheim, une unité d'enzyme par μ g d'ADN). La qualité de la digestion a été vérifiée sur un gel d'agarose 1 %. La construction plasmidique a ensuite été précipitée comme précédemment décrit.

L'ADN plasmidique a été introduit dans les parasites par électroporation en utilisant les même paramètres que ceux décrits lors de la transfection transitoire. A la suite du choc électrique, les parasites ont été mis en culture à 37°C, dans 5 ml de D10 sur un tapis confluent de cellules fibroblastiques (Human Foreskin Fibroblast) dans une boîte de 25 cm² (Costar).

b) Conditions de culture et de sélection

- Sélection positive

Le système de sélection positive permet une sélection des parasites ayant intégré de manière stable le plasmide de sélection dans leur génome. Cette sélection a été utilisée d'une part pour sélectionner les parasites transformés par le gène *CAT* (Chloramphénicol Acétyl Transférase), en présence de chloramphénicol (Sigma) (Kim *et al.*, 1993) et d'autre part pour sélectionner les toxoplasmes de la souche mutante HXGPRT⁻ transformés par le gène *HXGPRT* en présence de xanthine et d'acide mycophénolique (Sigma) (Roos *et al.*, 1994).

Afin de permettre une bonne infection des cellules par les toxoplasmes, les drogues n'ont été additionnées au milieu de culture que 24 heures après l'électroporation.

+ Sélection en présence de chloramphénicol

Le milieu de culture contenait 20 μ M de chloramphénicol. L'action de cette drogue est retardée et n'intervient qu'après 7 à 8 jours de culture. Afin de maintenir une action efficace de cette drogue, le milieu a été renouvelé tous les jours et la sélection des parasites a été maintenue pendant 10 à 12 jours soit 3 ou 4 lyses du tapis cellulaire.

+ Sélection en présence de xanthine et d'acide mycophénolique

50 μ g/ml de xanthine et de 25 μ g/ml d'acide mycophénolique ont été additionnés au milieu de culture. Ces drogues ont une action immédiate sur les parasites HXGPRT⁻ n'ayant pas intégré le gène *HXGPRT*. La pression de sélection a alors été maintenue pendant 4 à 5 jours de culture jusqu'à la lyse complète du tapis de cellules.

A la fin de la période de sélection, une partie des parasites issus de la lyse complète du tapis cellulaire a été recueillie et l'expression de la protéine étudiée a été testée par immunoblot. Les parasites restant ont été clonés, en présence des drogues, dans des plaques de 96 puits (Greiner) contenant un tapis confluent de cellules HFF, par la technique de la dilution limite (Section Matériels et Méthodes II.2.D.c).

+ Sélection en présence de bléomycine

 5μ g/ml de phléomycine ont été additionnés au milieu de culture en présence de parasites extracellulaires pendant 10-12 heures. Les parasites ont infecté un nouveau tapis de cellules. Deux autres cycles de sélection en présence de phléomycine ont été effectués puis les parasites ont été clonés.

- Double sélection: positive et négative

Le système de double sélection a été utilisé lors de la transfection de la souche HXGPRT⁻. Ce système de sélection est basé sur l'action combinée de deux modes de sélection, l'un positif en présence de chloramphénicol, l'autre négatif en présence de 6-Thioxanthine. Cette approche n'est réalisable qu'avec des parasites HXGPRT⁻. La présence du gène *CAT* permet, d'une part, d'appliquer une sélection positive puisque l'expression de ce gène confère un phénotype résistant au chloramphénicol. L'absence d'expression de l'enzyme HXGPRT⁻ par les parasites HXGPRT⁻.

permet, d'autre part, une sélection négative puisque ces toxoplasmes sont résistants à l'action de la 6-thioxanthine.

 2.10^7 tachyzoïtes HXGPRT ont été tranfectés en présence de 100 µg de la construction plasmidique 5'GRA5/CAT/3'GRA5/HXGPRT en utilisant les même conditions d'électroporation que celles décrites lors de la transfection transitoire. L'ADN plasmidique transfecté a préalablement été linéarisé pendant 10 heures à 37°C en présence des enzymes de restriction *SacI* ou *KpnI*. La digestion a été vérifiée sur un gel d'agarose 1% puis l'ADN a été précipité et préparé pour l'électroporation comme précédemment décrit.

A la suite de l'électroporation, les parasites HXGPRT ont été mis en culture sur un tapis de cellules fibroblastiques en présence de 5 ml de D10 à 37°C. Après 24 heures de culture, la sélection positive en présence de 20 μ M de chloramphénicol a été amorcée. La sélection a été maintenue pendant 10 à 12 jours. Après une dizaine de jours de sélection c'est à dire à la lyse suivante du tapis cellulaire, la sélection négative a été réalisée. 360 μ g/ml de 6-Thioxanthine sont additionnés au milieu de culture en présence de 20 μ M de Chloramphénicol. L'action de la 6-Thioxanthine étant immédiate, les deux drogues ont été maintenues pendant 2 à 3 lyses du tapis cellulaire. Les parasites ont alors été récoltés et clonés.

c) Clonage et amplification des clones

Afin d'obtenir une génération de toxoplasmes descendant d'un seul individu, le clonage des parasites a été réalisé par dilution limite dans des plaques de 96 puits contenant des cellules HFF en milieu D10. Les plaques de clonage ont été centrifugées 1 min à 500 trs./min avant d'être remises en culture à 37°C, 5% CO2. La formation des plages de lyse est observable après 5 jours de culture, pendant cette période les plaques ont été maintenues dans l'incubateur sans être déplacées. Les puits dans lesquels une seule plage de lyse a été observée ont été repérés et les parasites contenus dans ces puits ont été amplifiés en l'absence de drogues sur un tapis de celulles HFF dans des plaques de 24 puits. L'expression des protéines parasitaires d'intérêt a été examinée par immunoblot. Les clones parasitaires retenus ont été amplifiés par passages successifs sur des cellules HFF jusqu'à un entretien routinier dans des boîtes de 25 cm².

d) Test de virulence chez la souris

La souris est un bon modèle d'étude de la virulence des souches car elle permet de distinguer deux phénotypes de virulence selon l'abilité qu'a un tachyzoïte à provoquer la mort. Une dilution de 2.10¹ tachyzoïtes (souche sauvage HXGPRT⁻, clone 4/F2, clone 4 GRA5⁻ complémenté fraîchement lysés), préparée juste avant l'infection en DMEM-SVF 5 %, a été inoculée à des souris Swiss Depret (mâle de 20 g) par voie intrapéritonéale. Le dénombrement des souris mortes et vivantes a été réalisé sur une période de 20 jours. Les souris survivantes ont été saignées 35 jours après l'inoculation et la réactivité de leur sérum a testé contre un antigène total de la souche RH.

e) Test de croissance

Le test qui compare la croissance de la souche sauvage HXGPRT⁻, les mutants nuls GRA5⁻ (clones 1 et 4) et les souches complémentées (1/G5 et 4/F2) a été réalisé sur des lamelles de verre déposées dans des plaques de 24 puits et sur lesquelles ont poussé des cellules fibroblastiques jusqu'à la confluence. 5.10⁵ (test de croissance de 6 heures) ou 5.10⁴ (test de croissance de 24 heures) parasites fraîchement lysés ont été resuspendus dans un milieu minimum (MEM-SVF 1 %-Glutamine-gentamycine-Hepes) puis déposés sur le tapis de cellules fibroblastiques préalablement équilibré dans le même milieu. Après 2 heures et 4 heures d'invasion respectivement, les toxoplasmes extracellulaires ont été éliminés par rinçage du tapis cellulaire par du PBS-Ca²⁺. Les cultures ont été incubées à 37°C 5 % CO2 pendant 4 ou 20 heures respectivement. Après rinçage en PBS-Ca²⁺, les cellules infectées ont été fixées une minute dans une solution de méthanol puis colorées au Giemsa selon les conditions préconisées par le kit. Les lamelles ont été montées sur lames en mowiol puis observées à l'aide d'un microscope Axioplan 2 (Zeiss) équipé d'un contraste de phase.

III - Analyse des protéines

L'expression de ces protéines de *T. gondii* a été réalisée par des techniques de transcription/traduction *in vitro* ou par la transfection d'ADN dans le toxoplasme (Section Matériels et Méthodes II).

La détection des protéines a été réalisée par des techniques d'immunoblot et d'immunofluorescence impliquant l'utilisation d'anticorps spécifiques.

1) Les anticorps

Afin de détecter les protéines de *T. gondii* exprimées dans des systèmes d'expression *in vitro* et *in vivo* par les techniques d'immunoblot et d'immunofluorescence, les anticorps primaires utilisés étaient les suivants :

- l'anticorps monoclonal TG 05-54 anti-SAG1 (Couvreur et al., 1988);
- l'anticorps monoclonal TG 17-43 anti-GRA1 (Charif et al., 1990) ;
- l'anticorps monoclonal TG 17-179 anti-GRA2 (Charif et al., 1990) ;
- l'anticorps monoclonal T62H11 anti-GRA3 (Bermudes et al., 1994a).
- l'anticorps monoclonal 4G1-AH11 anti-GRA4 (Labruyere et al., sousmis) ;
- l'anticorps monoclonal TG 17-113 anti-GRA5 (Charif et al., 1990);
- le sérum de souris anti-GRA6 recombinante (Lecordier et al., 1995) ;
- le sérum de lapin anti-HA11 (Babco) ;
- le sérum de lapin anti-actine (Dobrowolski and Sibley, 1997).

Les anticorps secondaires utilisés étaient :

- le sérum de chèvre anti-IgG de souris couplé à la péroxydase (Sigma et Jackson) ;

- le sérum de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la péroxydase (Sigma et Jackson) ;

- le sérum de chèvre anti-IgG de souris couplé au FITC (Fluoresceine Iso-Thio-Cyanate, Sigma) ou au BODIPI (Molecular Probes) ;

- le sérum de chèvre anti-IgG de lapin couplé au FITC (Fluoresceine Iso-Thio-Cyanate, Sigma) ou au BODIPI (Molecular Probes) ;

2) Expression des protéines en système in vitro

L'expression des produits des gènes *GRA5* et *GRA6* clonés dans le vecteur plasmidique pPCR Script Amp SK(+) a été réalisée grâce au système de transcription/traduction *in vitro* dans un

lysat de réticulocytes de lapin à l'aide du kit "TNT coupled Reticulocyte Lysat Systems" (Promega).

Les matrices plasmidiques utilisées contiennent la région 5' transcrite, non traduite, le cadre de lecture ouvert et la région 3' non traduite du gène d'intérêt. L'orientation de l'insert génomique GRA d'intérêt dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+) a été déterminée après comparaison des profils de digestion, à savoir pour :

- l'insert génomique GRA5/RH est orienté 5'-3' dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+).
- l'insert génomique GRA6/76K est orienté 5'-3' dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+).
- l'insert génomique GRA6/RH est orienté 3'-5' dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+).
- l'insert génomique GRA6/76K est orienté 5'-3' dans le vecteur pPCR Script Amp SK(+).

La transcription *in vitro* a été réalisée avec l'ARN polymérase du phage T3 (Promega) pour les insert clonés dans le sens 5'-3' et avec l'ARN polymérase du phage T7 (Promega) pour l'insert GRA6/RH cloné dans le sens 3'-5'. Les constructions plasmidiques ont été préparées selon la technique de lyse alcaline des bactéries (Sambrook *et al.*, 1989) à l'aide du kit Qiagen. L'ADN a ensuite été purifié par extraction au phénol/chloroforme puis précipité toute la nuit à -20°C en présence d'acétate de sodium 0.3 M pH 4.8 et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après une centrifugation de 30 minutes à 13000 trs./min., le culot a été lavé en éthanol 70 % puis repris en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

L'ARNm correspondant à l'ADNc de l'insert d'intérêt a été synthétisé à partir de 2 μ g d'ADN plasmidique (circulaire) et de 10 unités d'ARN polymérase T3 ou T7. Cet ARNm est simultanément traduit par un lysat de réticulocyte de lapin en présence de 0,5 mCi de [³H] leucine (Amersham). Cette réaction de transcription/traduction *in vitro* est réalisée en une seule étape pendant 90 minutes à 30°C.

3) Expression de protéines chez T. gondii

Les récents progrès développés dans la manipulation génique du toxoplasme permettent désormais l'expression stable de gènes d'intérêt par le parasite. L'analyse de l'expression de protéines chez *T. gondii* nécessite la mise au point d'un système de révélation permettant de différencier l'expression des protéines natives du parasite par rapport à celles exprimées à la suite de l'intégration de gènes dans le génome du parasite.

A) Analyse immunochimique

Les extraits protéiques ont été préparés dans du tampon échantillon, en conditions réductrices (β -mercaptoéthanol, 10 %) ou non réductrices puis dénaturés 5 minutes à 95°C. Les protéines ont ensuite été séparées sur la base de leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide 13 % en présence de SDS. L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 200 mM, SDS 0.1 %), selon la méthode décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). Afin de calibrer le gel, chaque migration a été réalisée en présence de marqueurs de poids moléculaires précolorés (Gibco BRL ou Biorad). A la suite de la migration, le gel a été séché et autoradiographié ou transféré sur une membrane de nitrocellulose.

B) Autoradiographie des gels

Afin de fixer les protéines sur le gel, celui-ci a été incubé 30 minutes à température ambiante dans une solution d'acide acétique 8 %, méthanol 20 %. Le gel a ensuite été mis en contact avec une solution amplificatrice (Amplify, Amersham) avant d'être séché sous vide et autoradiographié à -70°C (film X-Omat, Kodak).

C) Immunotransfert (Western Blot)

Les protéines séparées sur le gel de polyacrylamide ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (porosité 0.45 µm, Schleicher et Schuell). Le transfert a été réalisé selon la méthode de transfert semi-sec (Towbin et al., 1979), dans un tampon de transfert (Tris-HCl 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0.0375 %, méthanol 20 %), à température ambiante pendant 90 minutes avec une résistance de 110 mA par minigel (soit 0.8 à 1 mA/cm² de gel). Le transfert a été vérifié à la suite de la coloration des protéines contenues sur la membrane de nitrocellulose par une solution de rouge de Ponceau pendant 5 minutes à température ambiante. La membrane a ensuite été rincée 3 fois avec de l'eau distillée avant d'être saturée 30 minutes à température ambiante dans une solution PBS-lait écrémé 5 % (Gloria). La membrane a alors été incubée toute une nuit à 4°C, sous agitation, en présence de l'anticorps primaire dilué dans une solution PBS-lait écrémé 5 %. La membrane a été lavée 3 fois 15 minutes à température ambiante dans une solution PBS-Tween 20 0.1 %. La membrane a été incubée avec une solution d'anticorps secondaire diluée dans du PBS-lait écrémé 5 % pendant 1 heure, à température ambiante, sous agitation. Après 3 lavages de 15 minutes à température ambiante dans une solution PBS-Tween 20 0.1 %, les protéines ont été révélées à la suite d'une réaction de chimioluminescence. La membrane a été incubée une minute en présence d'une solution de luminol et d'agent oxydant (volume/volume) (Dupont NEN ou Supersignal Pearce) puis autoradiographiée à température ambiante (Hyperfilm, ECL).

D) Immunofluorescence

La visualisation de la localisation des protéines parasitaires a été réalisée après l'infection d'un tapis confluent de fibroblastes par les toxoplasmes par la technique d'immmunofluorescence indirecte.

a) Préparation des cellules et infection parasitaire

Les cellules HFF ont été déposées dans 2 ml de D10 sur une lamelle de verre de 2 cm² contenue dans un puits d'une plaque de 4 puits (Costar) et placées à 37° C, 5 % CO₂ jusqu'à la confluence du tapis. Les cellules ont alors été infectées par 5.10⁴ parasites par lamelle, pendant 24 heures ou 5.10⁵ parasites pendant 10 minutes à 37° C, 5 % CO₂.

b) Immunofluorescence

Le milieu D10 a été éliminé et les cellules ont été rincées 3 fois avec une solution de PBS avant d'être fixées 20 minutes à 4°C, avec une solution fixatrice préparée extemporanément (PBS-formaldéhyde 3 %, Mercks). Après 3 lavages en PBS, les cellules ont été perméabilisées pendant 10 minutes à 4°C, en présence d'une solution de PBS-formaldéhyde 3 % -saponine 0.002 %. Les lamelles ont été saturées, pendant 30 minutes, à température ambiante, dans une solution PBS-SVF 5 % (sérum de veau foetal), GSF 5 % (sérum de chèvre foetal), saponine 0.001 %. L'anticorps primaire dilué dans une solution PBS-SVF1 % -saponine 0.001 % a été incubé avec les cellules pendant une heure, à température ambiante. Après 3 lavages de 5 minutes en PBS, les lamelles ont été incubées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière, à température ambiante, avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dilué en PBS-SVF1 % -saponine 0.001 %. Après 3 lavages de 5 minutes en PBS, les lamelles ont été montées sur lames en présence d'un protecteur de fluorescence (Mowiol, Calbiochem) et laissées en position horizontale une nuit à l'abri de la lumière. Les cellules ont alors été observées en épifluorescence à l'aide d'un microscope Axioplan 2 (Zeiss) équipé d'un contraste de phase et photographiées avec un appareil Axiophot (Zeiss) (film Kodak Elite II, 100 ASA).

E) Traitement par le triton X-114

Afin d'analyser le comportement soluble ou membranaire des protéines à l'intérieur des granules denses, les parasites extracellulaires ont été traités par le Triton X-114. Les toxoplasmes fraîchement lysés ont été centrifugés 15 min à 3000 trs./min. Après un lavage en PBS-Ca²⁺, le culot a été repris dans 500 μ l d'une solution de PBS contenant des inhibiteurs de protéases (Na-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone 10 μ g/ml, a-PMSF 10 μ g/ml, leupeptine 1 μ g/ml, E-64 10 μ g/ml). 200 μ l d'une solution de triton X-114 10 % ont été additionés et la solution a été incubée sur glace pendant une heure. Après une centrifugation de 15 min à 14000 trs./min, le culot qui représente la

fraction insoluble ("I") a été lavé en PBS. Les phases détergent ("D") et aqueuse ("A) contenues dans le surnageant ont été séparées par incubation de 10 minutes à 37°C suivie d'une centrifugation de 15 min à 14000 trs./min. Les phases détergent et aqueuse ont été extraites deux fois en retour par du PBS ou du triton X-114 10 % respectivement puis précipitées par deux volumes d'acétone.

F) Fractionnement cellulaire

Le comportement soluble et/ou membranaire des protéines, après leur sécrétion dans la vacuole parasitophore, a été réalisé par fractionnement cellulaire parasites intracellulaires.

Un tapis de cellules fibroblastiques confluentes a été infecté par les tachyzoïtes pendant une nuit à 37°C, 5% CO2. Les cellules infectées ont été décollées mécaniquement à l'aide d'un grattoir dans un volume minimum de PBS-EGTA 1mM et contenant des inhibiteurs de protéases (Na-ptosyl-L-lysine chloromethyl ketone 10 μ g/ml, a-PMSF 10 μ g/ml, leupeptine 1 μ g/ml, E-64 10 μ g/ml). Les cellules et les vacuoles ont été cassées par seringage à travers des aiguilles d'un diamètre de 27 g. Après élimination des parasites libres et des déchets cellulaires par une centrifugation basse vitesse 15 min. à 3000 trs./min à 4°C, la fraction soluble a été précipitée par deux volumes d'acétone et le culot (fraction membranaire) a été rincé deux fois par une solution de PBS contenant des inhibiteurs de protéases. Le contenu vacuolaire présent dans le surnageant de centrifugation a été séparé en une fraction soluble ("S") et membranaire ("P") après une ultracentrifugation 2 heures à 100000 tr./min à 4°C.

Bibliographie

Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Autheman, J. M., Fortier, B., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1991a). Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol., 47, 223-234.

Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1991b). Differential targetting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.*, 103, 321-329.

Aikawa, M., Komata, Y., Asai, T., and Midorikawa, O. (1977). Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. Am. J. Pathol., 87(2), 285-296.

Ambroise-Thomas, P., and Garin, J. P. (1984). Toxoplasmose. Encycl. Med. Chir., Paris, Maladies Infectieuses, 8098 A10, 4, 1-8.

Ambroise-Thomas, P., and Pelloux, H. (1993a). La toxoplasmose et sa pathologie. Med. Mal. Infect., 23 Special, 121-128.

Ambroise-Thomas, P., and Pelloux, H. (1993b). Toxoplasmosis-Congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol. Today*, 9(2), 61-63.

Ancelle, T., Goulet, V., Tirard-fleury, V., Baril, L., Mazaubrun, C., Thulliez, P., Wcislo, M., and Carme, B. (1996). La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. *Bull. Epidémiol. Hebdom.*, 51, 227-229.

Araujo, F. G., Williams, D. M., Grumet, F. C., and Remington, J. S. (1976). Strain-dependent differences in murine susceptibility to toxoplasma. *Infect. Immun.*, 13(5), 1528-30.

Araujo, F. G. (1991). Depletion of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect. Immun.*, 59(5), 1614-1619.

Asai, T., Kim, T. J., Kobayashi, M., and Kojima, S. (1987). Detection of nucleoside triphosphate hydrolase as a circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, 55(5), 1332-5.

Asai, T., Miura, S., Sibley, L. D., 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(19), 11391-11397.

Asai, T., O'Sullivan, W. J., and Tatibana, M. (1983). A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Purification, some properties, and activation by thiol compounds. J. Biol. Chem., 258(11), 6816-6822.

Ashburn, D. (1992). Human Toxoplasmosis. History and General Epidemiology, O. U. Press, ed., 1-21.

Beckers, C. J. M., Dubremetz, J.-F., Mercereau-Puijalon, O., and Joiner, K. A. (1994). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. J. Cell Biol., 127(4), 947-961.

Beckers, C. J. M., Wakefield, T., and Joiner, K. A. (1997). The expression of Toxoplasma proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 89(2), 209-223.

Bermudes, D., Dubremetz, J. F., Achbarou, A., and Joiner, K. A. (1994a). Cloning of a complete cDNA encoding the dense granule protein GRA3 from *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol., 68, 247-257.

Bermudes, D., Peck, K.R., Afifi, M., Beckers, C.J.M., and Joiner, K. A. (1994b). Tandemly repeated genes encode Nucleotide Triphosphate Hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem., 269(46), 29252-29260.

Berrebi, A., Bessieres, M. H., Rolland, M., Sarramon, M. F., Bloom, M. C., and Seguela, J. P. (1992). La toxoplasmose congénitale : approche diagnostique et conduite à tenir actuelle. *Concours Med.*, 114-35, 3153-3158.

Bloch-Michel, E., Couvreur, J., and Thulliez, P. (1992). Toxoplasmose oculaire. Encycl. Med. Chir., Paris, 21230B18.

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., 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(6), 1221-1230.

Bohne, W., Parmley, S. F., Yang, S., and Gross, U. (1996). Bradyzoite-specific genes. Current Topics in Microbiology and Immunology : *Toxoplasma gondii.*, U. Gross, ed., Springer, Heidelberg, Germany., 80-91.

Bohne, W., Hunter, C. A., White, M. W., Ferguson, D. J. Gross, U. and Roos, D. S. (1998). Targeted disruption of the bradyzoite-specific gene BAG1 does not prevent tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol., 92, 291-301. Boothroyd, J. C., Black, M. Kim, K., Pfefferkorn, E. R., Seeber, F., Sibley, L. D. and Soldati, D. (1995). Forward and reverse genetics in the study of the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. In: Adolph K (ed) Methods in molecular genetics. Academic. Press, New York, 3-29.

Boothroyd, J. C., Hehl, A., Knoll, L. J., and Manger, L. D. (1998). The surface of *Toxoplasma* : more and less. *Int. J. Parasitol.*, 28, 3-9.

Borst, P., Overdulve, J. P., Weijers, P. J., Fase-Fowler, F., and van den Berg, M. (1984). DNA circles with cruciforms from *Isospora* (*Toxoplasma*) gondii. Biochim. Biophys. Acta, 781(1-2), 100-111.

Brown, C. R., and McLeod, R. (1990). Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. J. Immunol., 145(10), 3438-3441.

Büllow, R., and Boothroyd, J. C. (1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen in liposomes. J. Immunol., 147, 3496-3500.

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(10), 3584-3591.

Burg, J. L., Grover, C. M., and 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. (1993). Toxoplasmosis- The first commercial vaccine. Parasitol. Today, 9, 335-337.

Capron, A., and Dessaint, J. P. (1988). Vaccination against parasitic diseases : some alternative concepts for the definition of protective antigens. *Ann. Inst. Past. /Immunol.*, 139, 109-117.

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(2), 114-123.

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(2), 137-144.

Cerami, C., Frevert, U., Sinnis, P., Takas, B., Clavijo, P., Santos, M. J., and Nussenzweig, V. (1992). The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoïte protein of *Plasmodium falciparum* sporozoïtes. *Cell*, 70, 1021-1033.

Cesbron-Delauw, M. F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R. J., Lenzen, G., Cesbron, J. Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J. P., and Capron, A. (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(19), 7537-7541.

Cesbron-Delauw, M. F. (1994). Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol. Today*, 10(8), 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(23), 16217-16222.

Cesbron-Delauw, M. F., Lecordier, L., and Mercier, C. (1996). Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. Current Topics in Microbiology and Immunology : *Toxoplasma gondii.*, U. Gross, ed., Springer, Heidelberg, Germany, 59-66.

Chardès, T., and Bout, D. (1993). Mucosal immune response in toxoplasmosis, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.*, 144(1), 57-60.

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(1), 114-124.

Chobotar, B., and Scholtyseck, E. (1982). Ultrastructure. The Biology of the Coccidia, E. P. L. Long, ed., University Park Press, Baltimore, 101.

Corcao, G., Sutcliffe, R. G., Kusel, J. R. and Lima, S. F. (1995). Lateral diffusion of human CD2 wild type and mutants with large deletions in the transmembrane domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 208, 1131-1136.

Corcoran, L. M., Thompson, J. K., Walliker, D., and Kemp, D.J. (1988). Homologous recombinaison within subteleomeric repeat sequences generates chromosome size polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 53, 807-813.

Cornelissen, A. W. C. A., Overdulve, J. P., and Van Der Ploeg, M. (1984). Determination of nuclear DNA of five Eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii, Sarcocystis cruzi, Eimeria tenella, E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii. Parasitol.*, 88, 531-553.

Couvreur, G., Sadak, A., Fortier, B., and Dubremetz, J. F. (1988). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. Parasitol., 97, 1-10.

Couvreur, J. (1993). Toxoplasmose congénitale : Prise en charge et devenir. Méd. Mal. Infect., 23(Spécial), 176-182.

Cristina, N., Oury, B., Ambroise, T. P., and Santoro, F. (1991). Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitol. Res.*, 77(3), 266-268.

Cristina, N., Derouin, F., Pelloux, H., Pierce, R., Cesbron-Delauw, M. F., and Ambroise-Thomas, P. (1992). Polymerase Chain Reaction (PCR) detection of *Toxoplasma gondii* in AIDS patients using the repetitive sequence *TGR 1E. Pathol. Biol.*, 40, 52-55.

Cruz, A., Coburn, C. M., and Beverley, S. M. (1991). Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7170-7174.

D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M., and Trincherie, G. (1993). Interleukine-10 inhibits human lymphocyte interferon γ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.*, 178, 1041-1048.

Darcy, F., Maes, P., Gras-Masse, H., Auriault, C., Bossus, M., Deslée, D., Godard, I., Cesbron-Delauw, M. F., Tartar, A., and Capron, A. (1992). Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxopasma gondii* P30 antigen. J. Immunol., 149(11), 3636-3641.

Dardé, M. L., Bouteille, B., and Pestre-Alexandre, M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.*, 78, 786-794.

Dardé, M. L. (1996). Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. Current Topics in Microbiology and Immunology., *Toxoplasma gondii.*, U. Gross, ed., Springer, Heidelberg, Germany, 27-41.

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(2), 164-70.

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(1), 156-161.

De Melo, E. J., de Carvalho, T. U., and de Souza, W. (1992). Penetration of *Toxoplasma* gondii into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Strut. Funct.*, 17, 311-317.

De Melo, E. J., and Souza, W. (1997). Relationship between the host cell endoplasmic reticulum and the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii*. Cell Struct. Funct., 22, 317-323.

Decoster, A., Darcy, F., Caron, A., and Capron, A. (1988). IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet*, 12, 1104-1107.

Decoster, A., Darcy, F., Caron, A., and Capron, A. (1992). Anti-P30 IgAantibodies as prenatal markers of congenital toxoplasma infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 87, 310-315.

Denton, H., Brown, S. M. A., Roberts, C. W., Alexander, J., Mcdonald, V., Thong, K. W., and Coombs, G. H. (1996). Comparison of the phosphofructokinase and pyruvate kinase activities of *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella* and *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol., 76(1-2), 23-29.

Derouin, F., Gluckman, E., Aubert, P., Devergie, A., Beauvais, B., Garin, Y., and Larivierre, M. (1990). Toxoplasmose et greffe de moëlle. Evaluation du risque. Orientation de la prophylaxie. *ICOPA. Paris. résumé n°458*.

Derouin, F., Devergie, A., 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.

Diederich, M., Kruys, V., and Wellman, M. (1997). Role of untranslated regions in mRNA translation and stability. M. S. Med. Sci., 13(11), 1266-1276.

Dimier, I. H., and Bout, D. T. (1997). Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in IFN- γ -activated human intestinal epithelial cells." *Immunol. Cell Biol.*, 75, 511-514.

Dobrowolski, J. M., and Sibley, L. D. (1996). Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*, 84(6), 933-939.

Dobrowolski, J. M., Carruthers, V. B., and Sibley, L. D. (1997a). Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Mol. Microbiol., 26(1), 163-173.

Dobrowolski, J. M., Niesman, I. R., and Sibley, L. D. (1997b). Actin in the parasite *Toxoplasma* gondii is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil. Cytoskel.*, 37(3), 253-262.

Donald, R. G. K., and Roos, D. S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii* : a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90, 11703-11707.

Donald, R. G. K., and Roos, D. S. (1994). Homologous recombination and gene replacement at the dihydrofolate reductase-thymidylate 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. (USA), 92, 5749-5753.

Donald, R. G. K., Carter, D., Ullman, B., and Roos, D. S. (1996). Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl-transferase gene - Use as a selectable marker for stable transformation." *J. Biol. Chem.*, 271(24), 14010-14019.

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

Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970). Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol., 56(3), 447-56.

Dubey, J. P., and Beattie, C. P. (1988). Toxoplasmosis in animals and man, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Dubey, J. P., and Lindsay, D. S. (1993). Neosporosis. Parasitol. Today, 9(12), 452-458.

Dubey, J. P. (1995). Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. J. *Parasitol.*, 81, 410-415.

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(2), 267-299.
Dubremetz, J. F., and Torpier, G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an Eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). J. Ultrastruc. Res., 62, 94-109.

Dubremetz, J. F., Rodriguez, C., and Ferreira, E. (1985). *Toxoplasma gondii* : redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. Exp. Parasitol., 59(1), 24-32.

Dubremetz, J. F., Sadak, A., Taghy, Z., and Fortier, B. (1987). Characterization of a 42 kDa rhoptry antigen of *Toxoplasma gondii*. Host-parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections, D. S. K.P. Chang, ed., NATO ASI Series, 365-369.

Dubremetz, J. F., Ferreira, E., and Dissous, C. (1989). Isolation and partial characterization of rhoptries and micronemes from *Eimeria nieschulzi zoites* (Sprozoa, Coccidia). Parasitol. Res., 1989, 449-454.

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. (1998). Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol.*, 6(1), 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 special, 139-147.

Eid, J., and Sollner-Webb, B. (1991). Stable integrative transformation of *Trypanosoma brucei* that occurs exclusively by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 88, 2118-2121.

Ellis, J. T., Luton, K., Braverstock, P. R., Whitworth, G., Tenter, A. M., and Johnson, A. M. (1995). Philogenetic relationships between *Toxoplasma* and *Sarcocystis* deduced from a comparison of 18S rDNA sequences. *Parasitol.*, 110, 521-528.

Endo, T., Sethi, K. K., and Piekarski, G. (1982). *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages." *Exp. Parasitol.*, 53(2), 179-88.

Endo, T., Yagita, K., Yasuda, T., and Nakamura, T. (1988). Detection and localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res., 75(2), 102-6.

Entzeroth, R., Kerckhoff, H., and König, A. (1992). Microneme secretion in *Coccidia*: confocal laser scanning and electron microscope study of *Sarcocystis muris* in cell culture. *Eur. J. Cell Biol.*, 59, 405-413.

Fichera, M. E., and Roos, D. S. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*, 390(6658), 407-409.

Finbarr-Tobin, J. and Wirth, D. F. (1992). A sequence insertion targeting vector for *Leishmania enriettii*. J. Biol. Chem, 267, 4752-4758.

Fischer, H. G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H. E., and Reichmann, G. (1998). GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 91, 251-262.

Fortier, B., and Ajana, F. (1992). La toxoplasmose congénitale : dépistage et traitement. Méd. Mal. Infect., 22, 838-847.

Fortier, B., and Ajana, F. (1993). Toxoplasme et Toxoplasmoses. Encycl. Med. Chir., Maladies infectieuses., 8-509-A-10.

Fortier, B., and Dubremetz, J. F. (1993). Structure et biologie de Toxoplasma gondii. Med. Mal. Infect., 23 spécial, 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. (1996a). The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 83(2), 201-210.

Fourmaux, M. N., Garcia-Réguet, N., Mercereau-Puijalon, O., and Dubremetz, J. F. (1996b). *Toxoplasma gondii* microneme proteins : gene cloning and possible function. Current Topics in Microbiology and Immunology : *Toxoplasma gondii*., U. Groos, ed., Springer, Heidelberg, Germany, 55-58.

Foussard, F., Leriche, M. A., and Dubremetz, J. F. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitol.*, 3(367), 367-370.

Frenkel, J. K., Dubey, J. P., and Miller, N. L. (1969). *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. *Science*, 164(878), 432-433.

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.

Furtado, G. C., Cao, Y., and Joiner, K. A. (1992a). Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the β 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.

Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J. Immunol., 146(1), 286-292.

Gazzinelli, R. T., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., and Sher, A. (1992a). Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma* gondii. J. Immunol., 149, 175-180.

Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L., and Sher, A. (1992b). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-c-activated macrophages. *J. Immunol.*, 148, 1792-1796.

Gazzinelli, R. T., Hieny, S., Wynn, T. A., Wolf, S., and Sher, A. (1993a). Interleukin 12 is required for the T lymphocyte independent induction of IFN- γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6115-6119.

Gazzinelli, R. T., Eltoum, I., Wynn, T. A., and Sher, A. (1993b). Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J. Immunol.*, 151, 3672-3681.

Gazzinelli, R. T., Hayashi, S., Wysocka, M., Carrera, L., Kuhn, R., Muller, W., Roberge, F., Trinchieri, G., and Sher, A. (1994). Role of IL-12 in the initiation of cell mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 41(5), S9.

Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Schartonkersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4(+) T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma, and TNF-alpha. J. Immunol., 157(2), 798-805.

Grimwood, J., and Smith, J. E. (1992). *Toxoplasma gondii* : The role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Exp. Parasitol.*, 74, 106-111.

Grimwood, J., and Smith, J. E. (1995). *Toxoplasma gondii*: Redistribution of tachyzoite surface protein during host cell invasion and intracellular development. *Parasitol. Res.*, 81(8), 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(10), 4099-4104.

Grimwood, J., and Smith, J. E. (1996). *Toxoplasma gondii*: The role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion." *Int. J. Parasitol.*, 26(2), 169-173.

Gross, U., Müller, W. A., Knapp, S., and Heesemann, J. (1991). Identification of a virulenceassociated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. *Infect. Immun.*, 59, 4511-4516.

Gross, U., Bohne, W., Lüder, C. G. K., Lugert, R., Seeber, F., Dittrich, C., Pohl, F., and Ferguson, D. J. P. (1996). Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. J. Euk. Microbiol., 43, 114S-116S.

Guay, J. M., Huot, A., Gagnon, S., Tremblay, A., and Levesque, R. C. (1992). Physical and genetic mapping of cloned ribosomal DNA from *Toxoplasma gondii*: primary and secondary structue of the 5S gene. *Gene*, 114, 165-171.

Guo, Z. G., and Johnson, A. M. (1995). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol.*, 111, 127-132.

Gwo-Shu Lee, M. and Van der Ploeg, L. H. T. (1990). Homologous recombination and stable transfection in the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. *Science*, 250, 1583-1587.

Hakim, F. T., Gazzinelli, R. T., Denkers, E., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. (1991). CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host. J. Immunol., 147, 2310-2316.

Handman, E., Goding, J. W., and Remington, J. S. (1980). Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 124, 2578-2583.

Handman, E., and Remington, J. S. (1980). Antibody response to *Toxoplasma* antigens in mice infected with strains of different virulence. *Infect. Immun.*, 29, 215-220.

Harley, C. A., Holt, J. A., Turner, R. and Tipper, D. J. (1998). Transmembrane protein insertion orientation in yeast depends on the charge difference across transmembrane segments, their total hydrophobicity, and its distribution. J. Biol. Chem., 273, 24963-24971.

Hasty, P. Revera-Pérez, J., Chang, C. and Bradley, A. (1991). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 4509-4517.

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(2), 271-282.

Hisaeda, H., Nagasawa, H., Maeda, K., Maekawa, Y., Ishikawa, H., Ito, Y., Good, R. A., and Himeno, K. (1995). $\gamma\delta$ T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune responses against infection with Toxoplasma gondii. J. Immunol., 154, 244-251.

Hisaeda, H., Sakai, T., Ishikawa, H., Maekawa, Y., Yasutomo, K., Good, R. A., and Himeno, K. (1997). Heat shock protein 65 induced by gamma delta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. J Immunol, 159(5), 2375-2381.

Holliman, R. E., and Greig, J. R. (1997). Toxoplasmosis in immunocompromised patients. Curr. Op. Infect. Dis., 10, 281-284.

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, 242-245.

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(12), 5193-5198.

Hunter, C. A., Subauste, C. S., and Remington, J. S. (1994). The role of cytokines in toxoplasmosis. *Biother.*, 7(3-4), 237-247.

Hunter, C. A., Chizzonite, R., and Remington, J. S. (1995). Interleukin-1 β is required for the ability of the IL-12 to induce production of IFN- γ by NK cells : a role for IL-1 β in the T cell independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J. Immunol.*, 155, 4347-4354.

Huskinson, J., Thulliez, P., and Remington, J. S. (1990). Toxoplasma antigens recognized by human immunoglobulin A antibodies. J. Clin. Microbiol., 28(12), 2632-2636.

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. Eukar. Microbiol., 40, 24-28.

Jacobs, D., Dubremetz, J. F., Loyens, A., Bosman, F., and Saman, E. (1998). Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 91, 237-249.

Janku, J. (1923). Pathogénèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microphtalme avec parasitémie de la rétine. *Cas. Lek. Cesk.*, 62, 1021-1027.

Johnson, A. M. (1990). Toxoplasma: biologie, pathology and immunology. Coccidiosis of man and domestic animals, P. L. Long, ed., CRC Press, Boca Raton, Chap 7.

Johnson, A. M., Dubey, J. P., and Dame, J. B. (1986). Purification and characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 351-355.

Joiner, K. A., Fuhrman, S. A., Mietinnen, H., Kasper, L. L., and Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii* : fusion competence of parsitophorous vacuoles in Fc receptor transfected fibroblasts. *Science*, 249, 641-646.

Joiner, K. A. (1991). Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue. *Parasitol. Today*, 7, 226-227.

Joiner, K. A. (1993). Cell entry by *Toxoplasma gondii*: all paths do not lead to success, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.*, 144(1), 34-38.

Joiner, K. A., and Dubremetz, J. F. (1993). Toxoplasma gondii: a protozoan for the nineties. Infect. Immun., 61(4), 1169-1172.

Jones, J. L., Hanson, D. L., Chu, S. Y., Ciesielski, C. A., Kaplan, J. E., Ward, J. W., and Navin, T. R. (1996). Toxoplasmic encephalitis in HIV-infected persons: Risk factors and trends. *AIDS*, 10(12), 1393-1399.

Jones, T. C., and Hirsch, J. G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.*, 136(5), 1173-1194.

Kasper, L. H., Crabb, J. H., and Pfefferkorn, E. R. (1983). Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.*, 130(5), 2407-12.

Kasper, L. H., Bradley, M. S., and Pfefferkorn, E. R. (1984). Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. J. Immunol., 132(1), 443-9.

Kasper, L. H. (1987). Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol., 9(4), 433-445.

Kasper, L. H. (1989). Identification of stage-specific antigens of Toxoplasma gondii. Infect. Immun., 57(3), 668-72.

Kasper, L. H., Khan, I. A., Ely, K. H., Buelow, R., and Boothroyd, J. C. (1992). Antigenspecific (p30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against Toxoplasma gondii-infected peritoneal macrophages. J. Immunol., 148, 1493-1498.

Kasper, L. H., and Khan, I. A. (1993). Role of P30 in host immunity and pathogenesis of T. gondii infection, in "48th forum in immunology". Res. Immunol., 144(1), 45-48.

Kasper, L. H., and Mineo, J. R. (1994). Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma* gondii. Parasitol. Today, 10(5), 184-188.

Kaufmann, S. H. E., and Kabelitz, D. (1991). $\gamma\delta$ T lymphocytes and heat shock proteins. *Curr.* Topics Microbiol. Immunol., 167, 191.

Khan, I. A., Smith, K. A., and Kasper, L. H. (1988). Induction of antigen-specific parasiticidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. J. *Immunol.*, 141(10), 3600-3605.

Khan, I. A., Smith, K. A., and Kasper, L. H. (1990). Induction of antigen-specific human cytotoxic Tcells by *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Invest., 85, 1879-1886.

Khan, I. A., Smith, K. A., and Kasper, L. H. (1991). A purified antigen (P30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal Toxoplasma gondii infection in mice. *J. Immunol.*, 147, 3501-3506. Khan, I. A., and Kasper, L. H. (1996). IL-15 augments CD8(+) T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.*, 157(5), 2103-2108.

Kim, K., Soldati, D., and Boothroyd, J. C. (1993). Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with Chloramphenicol Acetyltransferase as selectable marker. *Science*, 262, 911-914.

Kimata, I., and Tanabe, K. (1987). Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. *J. Cell Sci.*, 231-239.

King, C. A. (1988). Cell motility of sporozoan protozoa. Parasitol. Today, 4, 315-318.

Knoll, L. J., and Boothroyd, J. C. (1998). Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Mol. Cell. Biol.*, 18(2), 807-814.

Krug, E. C., Marr, J. J., and Berens, R. L. (1989). Purine metabolism in *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem., 264(18), 10601-7.

Kuhn, A. (1987). Bacteriophage M13 procoat protein inserts into the plasma membrane as a loop structure. *Science*, 238,1413-1415.

Kumamoto, C. A. and Francetic, O. (1993). Highly selective binding of nascent polypeptides by an *Escherichia coli* chaperone protein in vivo. *J. Bacteriol.*, 175, 2184-2188.

Labruyère-Dadaglio, E., Lingnau, M., Mercier, C., Ferguson, D., and Sibley, L. D. (1999). *Toxoplasma gondii* secretory proteins GRA2, GRA4 and GRA6 form a macromolecular complex associated with the intravacuolar network memebranes within the parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, in press.

Lane, A., Soête, M., Dubremetz, J. F., and Smith, J. E. (1996). Toxoplasma gondii: Appearance of specific markers during the development of tissue cysts in vitro. Parasitol. Res., 82(4), 340-346.

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.

Lecordier, L., Mercier, C., Sibley, L. D., and Cesbron-Delauw, M. F. (1999). Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell.*, 10, 1277-1287

Lefebvre-Van Hende, S. (1998). Contribution au développement d'un système d'expression chez *Toxoplasma gondii* : Caractérisation des régions régulatrices des gènes GRA et production d'antigènes recombinants GRA2 et SAG1. *Thèse de Doctorat (Facultés Universitaires Namur, Belgique)*.

Leport, C., and Remington, J. S. (1992). Toxoplasmose au cours du SIDA. Presse Med., 21, 1165-1171.

Leriche, M. A., and Dubremetz, J. F. (1990). Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol. Res.*, 76, 559-562.

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(2), 249-259.

Levine, N. D., Corliss, J. O., and Cox, F. E. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool., 27, 37-58.

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., and Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin. Infect. Dis., 15, 211-222.

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(4), 853-861.

Lyons, R. E. and Johnson, A. M. (1998). Gene sequence and transcription differences in 70 kDa heat shock protein correlate with murine virulence of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, 27, 1041-1051.

Makioka, A., and Ohtomo, H. (1995). An increased DNA polymerase activity associated with virulence of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol., 81(6), 1021-1022.

Makioka, A., Stavros, B., Ellis, J. T., and Johnson, A. M. (1993). Detection and characterization of DNA polymerase activity in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.*, 107, 135-139.

Manger, I. D., Helh, A. B., and Boothroyd, J. C. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.*, 66(5), 2237-2244.

Marx-Chemla, C., Thelliez, E., Foudrinier, F., Aubert, D., Bonhomme, A., Ducasse, A., and Pinon, J. M. (1993). Toxoplasmose oculaire : mise en évidence de toxoplasmes libres dans l'humeur aqueuse. *Presse Méd.*, 15, 734.

May, T., Rabaud, C., Katlama, C., Leport, C., Ambroise-Thomas, P., Canton, P., and Groupe d'étude. (1993). Toxoplasmose extra-cérébrale au cours du SIDA : résultats d'une enquête nationale. *Méd. Mal. Infect.*, 23(Spécial), 190-200.

Mc Leod, R., Mack, D., and Brown, C. (1991). Toxoplasma gondii-new advances in cellular and molecular biology. Exp. Parasitol., 72(1), 109-121.

Meisel, R., Stachelhaus, S., Mevelec, M. N., Reichmann, G., Dubremetz, J. F., and Fischer, H. G. (1996). Identification of two alleles in the GRA4 locus of *Toxoplasma gondii* determining a differential epitope which allows discrimination of type I versus type II and III strains. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 81(2), 259-263.

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(2), 421-428.

Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F., and Sibley, L. D. (1998a). The amphipathic alpha helices of the Toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. J. Cell Sci., 111, 2171-2180.

Mercier, C., Howe, D. K., Mordue, D., Lingnau, M., and Sibley, L. D. (1998b). Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. *Infect. Immun.*, 66(9), 4176-4182.

Messina, M., Niesman, I., Mercier, C., and Sibley, L. D. (1995). Stable DNA transformation of *Toxoplasma gondii* using phleomycin selection. *Gene*, 165(2), 213-217.

Mévelec, M.-N., Chardès, T., Mercereau-Puijalon, O., Bourguin, I., Achbarou, A., Dubremetz, J.-F., and Bout, D. (1992). Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 56, 227-238.

Mineo, J. R., McLeod, R., Mack, D., Khan, I. A., Ely, K. H., Smith, J. E., and Kasper, L. H. (1993). Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol.*, 150, 3951-3964.

Mineo, J. R., and Kasper, L. H. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol.*, 79, 11-20.

Mirlesse, V., Jacquemart, F., and Daffos, F. (1993). Toxoplasmose au cours de la grossesse. Diagnostic et nouvelles thérapeutiques. *Presse Méd.*, 22(6), 258-262.

Mondragon, R., and Frixione, E. (1996). Ca2+-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma* gondii tachyzoites. J. Eukaryot. Microbiol., 43(2), 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.

Morisaki, J. H., Heuser, J. E., and Sibley, L. D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. J. Cell. Sci., 108(Part 6), 2457-2464.

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 spécial, 183-89.

Morrissette, N. S., Murray, J. M., and Roos, D. S. (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. J. Cell Sci., 110, 35-42.

Murray, H. W., Rubin, B. Y., Carriero, S. M., Harris, A. M., and Jaffee, E. A. (1985a). Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygenindependent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 134(3), 1982-1988.

Murray, H. W., Spitalny, G., and Nathan, C. F. (1985b). Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon- γ . *J. immunol.*, 134, 1619-1622.

Murray, H. W., Szurol-Sudol, A., Wellner, D., Oca, M. J., Granger, A., Libby, D. M., Rotthermel, C. D., and Rubin, B. Y. (1989). Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon stimulated human macrophages. *Infect. Immun.*, 57, 845-850.

Nagasawa, H., Hisaeda, H., Maekawa, Y., Fujioka, H., Ito, Y., Aikawa, M., and Himeno, K. (1994). gamma delta T cells play a crucial role in the expression of 65000 MW heat-shock protein in mice immunized with Toxoplasma antigen. *Immunol.*, 83(3), 347-352.

Nagasawa, H., Oka, M., Maeda, K. I., Jian-Guo, C., Hisaeda, H., Ito, Y., Good, R. A., and Himeno, K. (1992). Induction of heat shock protein closely correlates with protection against *Toxoplasma gondii* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 89, 3155-3158.

Nagel, S. D., and Boothroyd, J. C. (1988). The alpha- and beta-tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 29(2-3), 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(10), 5569-5574.

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.

Nathan, C. F. (1983). Mechanisms of macrophage antimicrobial activity. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 77(5), 620-30.

Nichols, B. A., and O'Connor, G. R. (1981). Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab. Invest.*, 44(4), 324-335.

Nichols, B. A., Chiappino, M. L., and O'Connor, G. R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. J. Ultrastruct. Res., 83(1), 85-98.

Nichols, B. A., and Chiappino, M. L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. J. Protozool., 34(2), 217-226.

Nichols, B. A., Chiappino, M. L., and Pavesio, C. E. N. (1994). Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res., 80, 91-98.

Nicolas, J. A., and Pestre-Alexandre, M. (1993). Toxoplasmose : Une zoonose transmissible à l'homme. *Méd. Mal. Infect.*, 23, (Spécial), 129-138.

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.

Nicolle, C., and Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi (Toxoplasma gondii N. Gen.). Arch. Inst. Past. Tunis, 1, 97-103.

Norrby, R., and Lycke, E. (1967). Factors enhancing the host-cell penetration of *Toxoplasma* gondii. J Bacteriol, 93(1), 53-8.

Odaert, H., Soête, M., Fortier, B., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1996). Stage conversion of *Toxoplasma gondii* in mouse brain during infection and immunodepression. *Parasitol. Res.*, 82(1), 28-31.

Ödberg-Ferragut, C., Soête, 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 bradyzoïte specific surface protein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 82, 237-244.

Omata, Y., Igarashi, M., Ramos, M. I., and Nakabayashi, T. (1989). Toxoplasma gondii: antigenic differences between endozoites and cystozoites defined by monoclonal antibodies. *Parasitol. Res.*, 75(3), 189-93.

Ossorio, P. N., Schwartzman, J. D., and Boothroyd, J. C. (1992). A Toxoplasma gondii rhoptry protein associated with host-cell penetration has unusual charge asymetry. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 50, 1-16.

Ossorio, P. N., Dubremetz, J. F., and Joiner, K. A. (1994). A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. J. Biol. Chem., 21, 15350-15357.

Parker, S. J., Roberts, C. W., and Alexander, J. (1991). CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 84(2), 207-212.

Parmley, S. F., Sgarlato, G. D., Mark, J., Prince, J. B., and Remington, J. S. (1992). Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen-P22 of *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol., 30, 1127-1133.

Parmley, S. F., Gross, U., Sucharczuk, A., Windeck, T., Sgarlato, G. D., and Remington, J. S. (1994a). Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma* gondii. J. Parasitol., 80(2), 293-301.

Parmley, S. F., Yang, S., Harth, G., Sibley, L. D., Sucharczuk, A., and Remington, J. S. (1994b). Molecular characterisation of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix tissue cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 66, 283-296.

Parmley, S. F., Weiss, L. M., and Yang, S. M. (1995). Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 73(1-2), 253-257.

Peetermans, W. E., Raats, C. J. I., Vanfurth, R., and Langermans, J.A.M. (1995). Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein induces tumor necrosis factor alpha and interleukin 6, reactive nitrogen intermediates, and toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.*, 63(9), 3454-3458.

Perkins, M. E. (1992). Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitol. Today*, 8, 28-32.

Pfefferkorn, E. R., and Pfefferkorn, L. C. (1977a). *Toxoplasma gondii*: specific labeling of nucleic acids of intracellular parasites in Lesch-Nyhan cells. *Exp. Parasitol.*, 41(1), 95-104.

Pfefferkorn, E. R., and Pfefferkorn, L. C. (1977b). *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to 5-fluorodeoxyuridine. *Exp. Parasitol.*, 42(1), 44-55.

Pfefferkorn, E. R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 81(3), 908-912.

Pfefferkorn, E. R., Eckel, M., and Rebhun, S. (1986). Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 20(3), 215-24.

Pfefferkorn, E. R., Nothnagel, R. F., and Borotz, S. E. (1992). Parasiticidal effect of clindamycin on *Toxoplasma gondii* grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 1091-1096.

Pfefferkorn, E. R., and Borotz, S. E. (1994). *Toxoplasma gondii*: Characterization of a mutant resistant to 6-thioxanthine. *Exp. Parasitol.*, 79(3), 374-382.

Pinon, J. M., Toubas, D., Marx, C., Mougeot, G., Bonnin, A., Bonhomme, A., Villaume, M., Foudrinier, F., and Lepan, H. (1990). Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. J. Clin. microbiol., 28(8), 1739-1743.

Porchet, E., and Torpier, G. (1977). [Freeze fracture study of *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infective stages] Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodecapage. Z. Parasitenk., 54(2), 101-124.

Prince, J. B., Koven, Q. M., Remington, J. S., and Sharma, S. D. (1985). Cell free synthesis of Toxoplasma gondii antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 17(2), 163-170.

Prince, J. B., Araujo, F. G., Remington, J. S., Burg, J. L., Boothroyd, J. C., and Sharma, S. D. (1989). Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol., 34(1), 3-13.

Prince, J. B., Auer, K. L., Huskinson, J., Parmley, S. F., Araujo, F. G., and Remington, J. S. (1990). Cloning, expression, and cDNA sequence of the surface antigen P22 from *Toxoplasma* gondii. Mol. Biochem. Parasitol., 43(1), 97-106.

Rabjeau, A., Foussard, F., Mauras, G., and Dubremetz, J. F. (1997). Enrichment and biochemical characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite plasmalemma. *Parasitol.*, 114, 421-426.

Ragnaud, J. M., Morlat, P., Dupon, M., Lacoste, D., Pellegrin, J. L., Chene, G., and le groupe d'épidémiologie clinique du SIDA en Aquitaine (1993). Toxoplasmose cérébrale au cours du SIDA. *Presse Méd.*, 22(19), 903-908.

Rayner, J. C. and Pelham, R. B. (1997). Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *EMBO J.*, 16, 1832-1841).

Remington, J. S., and Krahenbuhl, J. L. (1982). Immunology of *Toxoplasma gondii*. Comprehensive immunology, R.J.O.R.A.J. Nahmias, ed., Plenum Publishing Company, New York, London, 327-371.

Remington, J. S., and Desmonts, G. (1983). Toxoplasmosis. Infectious Diseases of the fetus and the Newborn infants, J. S. Remington and J. O. Klein, eds., Saunders, W.B., Philadelphia, 143.

Ridel, P. R., Auriault, C., Darcy, F., Pierce, R. J., Leite, P., Santoro, F., Neyrinck, J. L., Kusnierz, J. P., and Capron, A. (1988). Protective role of IgE in immunocompromised rat toxoplasmosis. J. Immunol., 141, 978-983.

Rinder, H., Thomschke, A., Darde, M. L., and Loscher, T. (1995). Specific DNA polymorphisms discriminate between virulence and non-virulence to mice in nine Toxoplasma gondii strains. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 69(1), 123-126.

Robert, R., de la Jarrige, P. L., Malhaza, C., Cottin, J., Marot-Leblond, A., and Senet, J. M. (1991). Specific binding of neoglycoproteins to *Toxoplasma gondii* tachyzoïtes. *Infect. Immun.*, 59, 4670-4673.

Robson, K. J. H., Hall, J. R. S., Jennings, M. W., Harris, T. J. R., Marsh, K., Newbold, C. I., Tate, V. E., and Weatherhall, D. J. (1988). A highly conserved sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stage of human malaria parasite. *Nature*, 335, 79-82.

Rodriguez, C., Afchain, D., Capron, A., Dissous, C., and Santoro, F. (1985). Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur. J. Immunol.*, 15(7), 747-749.

Rondanelli, E. G., and Scaglia, M. (1993). *Toxoplasma gondii* : Taxonomy. Atlas of human Protozoan, Masson, ed., 334-357.

Roos, D. S. (1993). Primary structure of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem., 268(9), 6269-6280.

Roos, D. S., Donald, R. G., Morrissette, N. S., and Moulton, A. L. (1994). Molecular tools for genetic dissection of the Ptotozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Meth. Cell. Biol., 45, 27-63.

Roos, D. S., Sullivan, W. J., Striepen, B., Bohne, W., and Donald, R. G. K. (1997). Tagging genes and trapping promoters in *Toxoplasma gondii* by insertional mutagenesis. *Methods* : A Companion to Methods in Enzymology, 13, 112-122.

Sabin, A. B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. J. Am. Med. Assoc., 116, 801-807.

Sabin, A. B., and Feldman, H. A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108, 660-663.

Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B., and Dubremetz, J. F. (1988). Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol., 29(2-3), 203-211.

Saffer, L. D., Long, K. S., and Schwartzman, J. D. (1989). The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 40(2), 145-149.

Saffer, L. D., and Schwartzman, J. D. (1991). A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. J. Protozool., 38(5), 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(4), 526-530.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et al. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sam-Yellowe, T. Y. (1996). Rhoptry organelles of the *Apicomplexa*: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today*, 12(8), 308-316.

Santoro, F., Afchain, D., Pierce, R., Cesbron, J. Y., Ovlaque, G., and Capron, A. (1985). Serodiagnosis of Toxoplasma infection using a purified parasite protein (P30). *Clin. Exp. Immunol.*, 62(2), 262-269.

Santoro, F., Charif, H., and Capron, A. (1986). The immunodominant epitope of the major membrane tachyzoite protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.*, 8(6), 631-639.

Schartonkersten. (1995). Role of IL12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma* gondii - Reply. Res Immunol, 146(7-8), 545.

Schartonkersten, T., Denkers, E. Y., Gazzinelli, R., and Sher, A. (1995). Role of IL12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Res. Immunol.*, 146(7-8), 539-544.

Schmitz, J. L., Carlin, J. M., Borden, E. C., and Byrne, G. I. (1989). Beta interferon inhibits *Toxoplasma gondii* growth in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.*, 57(10), 3254-6.

Schwab, J. C., Beckers, C. J. M., and Joiner, J. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, 91, 509-513.

Schwab, J. C., Afifi, M. 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(1-2), 59-69.

Schwartzberg, P. L., Goff, S. P., and Robertson, E. J. (1989). Germ-line transmission of a cabl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science*, 246, 799-803.

Schwartzman, J. D., and Pfefferkorn, E. R. (1981). Pyrimidine synthesis by intracellular Toxoplasma gondii. J. Parasitol., 67(2), 150-8.

Schwartzman, J. D., and Pfefferkorn, E. R. (1982). *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp. Parasitol.*, 53(1), 77-86.

Schwartzman, J. D., and Krug, E. C. (1989). Toxoplasma gondii: characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. Exp. Parasitol., 68(1), 74-82.

Schwarz, R. T., and Tomavo, S. (1993). The current status of the glycobiology of *Toxoplasma* gondii: glycosylphosphatidylinositols, N- and O-linked glycans, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.*, 144(1), 24-31.

Sedivy, J. M. Sharp, P. A. (1989). Positive genetic selection for gene disruption in mammalian cells by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86, 227-231.

Seeber, F., and Boothroyd, J. C. (1996). *Escherichia coli* beta-galactosidase as an *in vitro* and *in vivo* reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene*, 169(1), 39-45.

Seed, B., and Sheen, J.-Y. (1988). A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene*, 67, 271-277.

Senaud, J. (1967). Contribution à l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes (*Toxoplasma*). *Protistol.*, 3, 167-232.

Shen, P. and Huang, H. V. (1986). Homologous recombination in *Escherichia coli* : dependence on substrate length and homology. *Genetics*, 112, 441-457.

Sher, A., and Coffman, R. L. (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cellderived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, 10, 385-409.

Sher, A., Oswald, I. P., Hieny, S., and Gazzinelli, R. T. (1993). Toxoplasma gondii induces a T-independant IFN- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor- α . J. Immunol., 150(9), 3982-3989.

Sibley, L. D., Weidner, E., and Krahenbuhl, J. L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 315, 416-419.

Sibley, L. D., and Krahenbuhl, J. L. (1988). Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. *Eur. J. Cell Biol.*, 47(1), 81-87.

Sibley, L. D., Pfefferkorn, E. R., and Boothroyd, J. C. (1991a). Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Today, 7, 327-328.

Sibley, L. D., Adams, L. B., Fukutomi, Y., and Krahenbuhl, J. L. (1991b). Tumor necrosis factor- α triggers antitoxoplasmal activity of IFN- γ primed macrophages. J. Immunol., 147, 2340-2345.

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., Leblanc, A. J., Pfefferkorn, E. R., and Boothroyd, J. C. (1992b). Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics*, 132, 1003-1015.

Sibley, L. D., and Boothroyd, J. C. (1992c). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, 359, 82-85.

Sibley, L. D., Adams, L. B., and Krahenbuhl, J. L. (1993). Macrophage interactions in toxoplasmosis, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.*, 144(1), 38-40.

Sibley, L. D., Niesman, I. R., Asai, T., and Takeuchi, T. (1994a). *Toxoplasma gondii*: secretion of a potent Nucleoside Triphosphate Hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.*, 79, 301-311.

Sibley, L. D., Messina, M., and Neisman, I. R. (1994b). Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 91, 5508-5512.

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 Sci., 108, 1669-1677.

Sibley, L. D., and Howe, D. K. (1996). Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. Current Topics in Microbiology and Immunology., *Toxoplasma gondii* U. Gross, ed., Springer, Heidelberg, Germany, 3-16.

Sibley, L. D., Hakansson, S., and Carruthers, V.B. (1998). Gliding motility : an efficient mechanism for cell penetration. *Curr. Biol.*, 8(1), R12-R14.

Sims, T. A., Hay, J., and Talbot, I. C. (1988). Host-parasite relationship in the brains of mice with congenital toxoplasmosis. J. Pathol., 156(3), 255-261.

Sinai, A. P., Webster, P., and Joiner, K. A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. J. Cell. Sci., 110, 2117-2128.

Smith, J. E. (1995). A ubiquitous intracellular parasite : the cellular biology of *Toxoplasma* gondii. Int. J. Parasitol., 25(11), 1301-1309.

Smith, J. E., McNeil, G., Zhang, Y. W., Dutton, S., Biswas-Hugues, G., and Appleford, P. (1996). Serological recognition of *Toxoplasma gondii* cyst antigens." Current Topics in Microbiology and Immunology : *Toxoplasma gondii*, U. Gross, ed., Springer, Heidelberg, Germany, 67-75.

Soête, M., Fortier, B., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1993a). *Toxoplasma gondii:* kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 76, 259-264.

Soête, M., Fortier, B., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1993b). *Toxoplasma gondii* : patterns of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. Toxoplasmosis. Series H : Cell Biology, J. E. Smith, ed., 93-98.

Soête, M., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1994). Experimental induction of bradyzoitespecific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 78, 361-370.

Soête, M., and Dubremetz, J. F. (1996). During tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. Current Topics in Microbiology and Immunology : *Toxoplasma gondii*., U. Gross, ed., Springer, Heidelberg, Germany, 76-80.

Soldati, D., and Boothroyd, J. C. (1993). Transcient 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(1), 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(1), 87-97.

Soldati, D. (1996). Molecular genetic strategies in *Toxoplasma gondii*: Close in on a successful invader. *FEBS Lett*, 389(1), 80-83.

Southern, E. M. (1975). Detection of sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. J. Mol. Biol, 98, 503-517.

Speer, C. A., Tilley, M., Temple, M. E., Blixt, J. A., Dubey, J. P., and White, M. W. (1995). Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense-granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 75(1), 75-86.

Splendore, A. (1909). Sur un nouveau parasite du lapin. Deuxième note préliminaire. Bull. Soc. Path. Exot., 2, 462-465.

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(2), 88-97.

Sumyuen, M. H., Garin, Y. J. F., and Derouin, F. (1995). Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. *J. Parasitol.*, 81(2), 327-329.

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, 8413-8418.

Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., and Remington, J. S. (1988). Interferongamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, 240(4851), 516-518.

Suzuki, Y., and Remington, J. S. (1988). Dual regulation of resistance against *Toxoplasma* gondii infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice. J. Immunol., 140, 3943-3946.

Suzuki, Y., and Remington, J. S. (1990). The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. J. Immunol., 144(5), 1954-1956.

Suzuki, Y., Joh, K., Orellana, M. A., Conley, F. K., and Remington, J. S. (1991). A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. *Immunol.*, 74, 732-739.

Suzuki, Y., Orellana, M. A., Wong, S. Y., Conley, F. K., and Remington, J. S. (1993). Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. *Infect. Immun.*, 61, 2284-88.

Thulliez, P. (1993). Toxoplasmose et grossesse. Med. Mal. Infect., 23 spécial, 170-75.

Tilley, M., Fichera, M. E., Jerome, M. E., Roos, D. S., and White, M. W. (1997). Toxoplasma gondii sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. *Infect. Immun.*, 65(11), 4598-4605.

Tomavo, S. (1996). The major surface antigens of *Toxoplasma gondii* : structures and functions. Current Topics in Microbiology and Immunology : *Toxoplasma gondii*, U. Groos, ed., Springer, Heidelberg Germany, 45-54.

Tomavo, S., and Boothroyd, J. C. (1995). Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol., 25(11), 1293-1299.

Tomavo, S., Fortier, B., Soête, M., Ansel, C., Camus, D., and Dubremetz, J. F. (1991). Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, 59(10), 3750-3753.

Tomavo, S., Martinage, A., and Dubremetz, J. F. (1992). Phosphorylation of *Toxoplasma* gondii major surface antigens. *Parasitol. Res.*, 78, 541-544.

Tomavo, S., Schwarz, R. T., and Dubremetz, J. F. (1989). Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol. Cell. Biol.*, 9(10), 4576-4580.

Tomley, F. M., Clarke, L. E., Kawazoe, U., Dijkema, R., and Kok, J. J. (1991). Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 49, 227-288.

Torpier, G., Charif, H., Darcy, F., Liu, J., Dardé, M. L., and Capron, A. (1993). *Toxoplasma gondii*: differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. *Exp. Parasitol.*, 77, 13-22.

Van Dijk, M. R., Waters, A. P. and Jane, C. J. (1995). Stable transfection of malaria parasite blood stages. *Science*, 268, 1358-1362.

Vivier, E., and Petitprez, A. (1969). Le complexe membranaire superficiel et son evolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*. J. Cell Biol., 43(2), 329-342.

Vivier, E., and Petitprez, A. (1972). Données ultrastructurales complémentaires morphologiques et cytochimiques sur *Toxoplasma gondii*. *Protist.*, 8, 199-221.

Von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucl. Acid Res., 14, 4683-4690.

Wan, K. L., Carruthers, V. B., Sibley, L. D., and Ajioka, J. W. (1997). Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 84, 203-214.

Ware, P. L., and Kasper, L. H. (1987). Strain specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun., 55, 778-783.

Weiss, L. M., Udem, S. A., Tanowitz, H., and Wittner, M. (1988). Western blot analysis of the antibody response of patients with AIDS and Toxoplasma encephalitis : antigenic diversity among Toxoplasma strains. J. Infect. Dis., 157, 7-13.

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. M., Tanowitz, H. B., Cali, A., and Wittner, M. (1995). A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. J. *Eukaryot. Microbiol.*, 42(2), 150-157.

Weiss, L. M., Ma, Y. F., Takvorian, P. M., Tanowitz, H. B., and Wittner, M. (1998). Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the Hsp70 stress response. *Infect. Immun.*, 66(7), 3295-3302.

Werk, R. (1985). How does Toxoplasma gondii enter host cells. Rev. Infect. Dis., 7, 449-457.

Wilson, I. A., Niman, H., Houghten, R. A., Chereson, A. R., Connolhy, M. L., and Lerner, R. A. (1984). The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell*, 37, 767-778.

Windeck, T., and Gross, U. (1996). Toxoplasma gondii strain-specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence. Parasitol Res, 82(8), 715-719.

Woodison, G., and Smith, J. E. (1990). Identification of the dominant cyst antigens of *Toxoplasma gondii*. Parasitol., 3(389), 389-92.

Wreghitt, T. G., Hakim, M., Gray, J. J., Balfour, A. H., Stovin, P. G. I., Steward, S., Scott, J., English, T. A. H., and Allwork, J. W. (1989). Toxoplasmosis in heart and lung transplant recipients. J. Clin. Path., 42, 194-199.

Wu, Y. M., Kirkman, L. A., and Wellems, T. E. (1996). Transformation of *Plasmodium* falciparum malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93(3), 1130-1134.

Yang, S. M., and Parmley, S. F. (1995). A bradyzoite stage specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 73(1-2), 291-294.

Yang, T. H., Aosai, F., Norose, K., Ueda, M., and Yano, A. (1995). Enhanced cytotoxicity of IFN-gamma-producing CD4(+) cytotoxic T lymphocytes specific for *T-gondii*-infected human melanoma cells. *J. Immunol.*, 154(1), 290-298.

Yong, E. C., Chi, E. Y., and Henderson, W. R. (1994). *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: Role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. J. Exp. Med., 180(5), 1637-1648.

Yasuda, T., Yagita, K., Nakamura, T., and Endo, T. (1988). Immunocytochemical localization of actin in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.*, 75, 107-113.

Zhang, Y. W., 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.

Zimmer, A., Zimmer, A., and Reynolds, K. (1994). Gene targeting constructs : effects of vector topology on co-expression efficiency of positive and negative selectable marker genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201, 943-949.

