

n° d'ordre : 3918

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE

pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Parasitologie

Présentée par

Gabrielle ORIA



ETUDE DE LA O-N-ACETYLGLUCOSAMINYLATION CHEZ LE PARASITE *TOXOPLASMA GONDII* ET DE SON ROLE POTENTIEL DANS LA LOCALISATION NUCLEO-CYTOPLASMIQUE DES ENOLASES

Soutenue le 29 novembre 2006

Composition du jury :

Monsieur le Dr Jean-Claude Michalski	Président
Monsieur le Dr Gordon Langsley	Rapporteur
Madame le Pr Geneviève Milon	Rapporteur
Madame le Dr Isabelle Wolowczuk	Examineur
Monsieur le Dr Stanislas Tomavo	Directeur de thèse

Unité Mixte de Recherche 8576 du CNRS et de l'USTL
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Villeneuve d'Ascq

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans l'équipe de Parasitologie Moléculaire de *Monsieur le Docteur Stanislas Tomavo*, Directeur de recherches du C.N.R.S, sous son encadrement, au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR 8576 du CNRS) dirigée par *Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski*.

Je tiens tout d'abord à remercier *Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski* pour m'avoir accueillie au sein de l'UGSF et pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Monsieur le Docteur Stanislas Tomavo m'a accueillie dans son équipe dès le DEA, il y a déjà quatre ans. Je le remercie de m'avoir offert la possibilité de travailler sur un micro-organisme aussi passionnant qu'est le toxoplasme. Ces quatre années ont été pleines d'enseignements, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je tiens ici à lui formuler toute ma reconnaissance.

Madame le Professeur Geneviève Milon et *Monsieur le Docteur Gordon Langsley* ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, et *Madame le Docteur Isabelle Wolowczuk* a accepté d'examiner ce mémoire ; qu'ils reçoivent ici mes plus vifs remerciements.

Depuis mes balbutiements dans la recherche jusqu'à aujourd'hui, j'ai pu compter sur le savoir technique sans faille de *Madame Marlène Mortuaire*. Nous avons travaillé ensemble durant la dernière année de cette thèse et je lui exprime ici ma profonde gratitude, tant pour sa bonne humeur, sa gentillesse et sa générosité que pour son aide précieuse dans « la dernière ligne droite ».

Monsieur le Docteur Christian Slomianny m'a souvent été d'une grande aide en matière de microscopie et d'informatique. Je le remercie sincèrement pour sa gentillesse et son inconditionnelle disponibilité.

Je remercie également *Anne-Sophie Vercoutter* et *Marie-Christine Slomianny* pour m'avoir initiée à la 2D et à la spectrométrie de masse, respectivement. Un autre grand

merci à *Tony Lefebvre* pour ses encouragements et ses conseils en matière de O-GlcNAc et à *Brigitte Delrue* pour sa sympathie et ses conseils précieux pour l'avenir.

Un immense merci à mes amis et mes copains du labo : Alex (c'est toi la meilleure !), Manu (mon intermittent de recherche préféré), Edwige Me (caféinomane!), Chrystelle (chez le breton, tout est bon !), Estelle (mon Ch'ti ambulante), Thavy (si, si, en vérité !), Chantal (oyé !), Philippe (petit poussin), monsieur le CR David (copain !), Sébastien (ex-number one), Gilles (mon Gillou), Aline, Charlotte, Anne-France, Kévin, Nicolas et Eglantine. Un clin d'œil gros comme ça à Edwige Ma.

Pardon à ceux que je n'ai pas cités...

J'exprime également ma reconnaissance à tous les autres membres de l'unité pour leur sympathie.

Je remercie les enseignants qui m'ont permis de « passer de l'autre côté du bureau », ce fut pour moi une expérience extrêmement enrichissante.

Enfin, je remercie ma famille d'avoir rechargé mes batteries à chacun de mes rares passages furtifs à Cambrai. Un dernier merci pour mon Jerni...

COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES ET PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

COMMUNICATIONS ECRITES

- ✚ Présentation d'un poster au 15th Joint Meeting à Wageningen, novembre 2004

Evidence for O-N-Acetylglucosamylation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*

Gabrielle Oria and Stanislas Tomavo

- ✚ Présentation d'un poster aux Doctoriales de Lille, septembre 2005

Etude du mode d'adressage au noyau des émolases de *Toxoplasma gondii*

Gabrielle Oria, et Stanislas Tomavo

COMMUNICATIONS ORALES

- ✚ Présentation orale à la 5^{ème} Journée André Verbert organisée par l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Lille, septembre 2005

Les émolases de *Toxoplasma gondii* : mode d'adressage au noyau et fonction nucléaire

Gabrielle Oria et Stanislas Tomavo

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- ✚ Kibe, M.K., Coppin, A., Dendouga, N., Oria, G., Meurice, E., Mortuaire, M., Madec, E., and Tomavo, S. (2005) **Transcriptional regulation of two stage-specifically expressed genes in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii***. Nucleic Acid Res 33: 1722-1736.
- ✚ Daher, W., Oria, G., Caillau, K., Browaeys, E., Tomavo, S., and Khalife, J., ***Toxoplasma gondii* protein phosphatase type 1 binds a protein belonging to Leucine Rich Repeat family that negatively regulates its activity**, article soumis.
- ✚ Oria, G. and Tomavo, S., **Evidence for O-N-Acetylglucosamylation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii***, article soumis.

ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm : acide ribonucléique messenger
ARNr : acide ribonucléique ribosomal
ARNt : acide ribonucléique de transfert
BAG : bradyzoïte antigen
BET : bromure d'éthidium
Bléo : bléomycine
BSR : bradyzoïte SAG1-related sequence
CAT : chloramphénicol acétyltransférase
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
Ct : carboxy-terminale
DL 100 : dose létale 100% létale
DO : densité optique
DTT : dithiothréitol
EDTA : éthylène diamine tétra-acétate
EGF : Epidermal Growth Factor
ENO1 : émolase 1
ENO2 : émolase 2
EST : expressed sequence tag
GlcNAc : N-Acétyleglucosamine
GPI : glycosylphosphatidylinositols
HA : Hémagglutinine
HCA : hydrophobic cluster analysis
HFF : human foreskin fibroblast
HSP : heat shock protein
IFN- γ : interféron gamma
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
Kb : kilobase
kDa : kiloDalton

Km : constante de Mickaelis
LDH : lactate dehydrogenase
LDL : Low Density Lipid
LPS : lipopolysaccharide
LXA4 : lipoxine A4
MAPK : mitogen associated protein kinase
Mb : méga base
MBP-1 : c-Myc Binding Protein 1
MyD88 : Myeloid Differentiation factor 88
NCOAT : Nuclear and Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyltransferase
NFκB : nuclear factor κB
NK : natural killer
NLS : Nuclear Localization Signal
Nt : amino-terminale
O-GlcNAc : O-N-Acétylglucosaminylation
O-GlcNAcase : N-acétylglucosaminidase
OGT : O-GlcNAc transférase
ORF : open reading frame
Pb : paire de bases
PCR : polymerase chain reaction
RACE : rapid amplification of cDNA ends
RMN : resonance magnétique nucléaire
RT-PCR : reverse transcriptase-PCR
SAG : surface antigen
SAGE : serial analysis of gene expression
SDS-PAGE : sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SPY : Spindly
SRS : SAG1-related sequence
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF : sérum de veau fœtal
TAE : TRIS acétate EDTA
TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
TF : transcription factor

TLR : Toll-like receptor

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

TNT : TRIS NaCl Tween20

TPR : Tetratricopeptides Repeats

TRAP : Thrombospondin-Related Anonymous Protein

TRIS : Tri(hydroxyméthyl)aminométhane

UDP : Uracile diphosphate

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Vmax : vitesse maximale

WGA : Wheat Germ Agglutinin

PETIT CONTE ZEN

Je ne sais pas si c'est une bonne ou une mauvaise chose...

Un fermier reçoit en cadeau pour son fils un cheval blanc. Son voisin vient vers lui et lui dit : « Vous avez beaucoup de chance. Ce n'est pas à moi que quelqu'un offrirait un aussi beau cheval blanc ! » Le fermier répond : « Je ne sais pas si c'est une bonne ou une mauvaise chose... ».

Plus tard, le fils du fermier monte le cheval et celui-ci rue et éjecte son cavalier. Le fils du fermier se brise la jambe.

« Oh ! Quelle horreur ! dit le voisin. Vous aviez raison de dire que cela pouvait être une mauvaise chose. Assurément celui qui vous a offert le cheval l'a fait exprès, pour vous nuire. Maintenant votre fils est estropié à vie ! »

Le fermier ne semble pas gêné outre mesure. « Je ne sais pas si c'est une bonne ou une mauvaise chose », lance-t-il.

Là-dessus la guerre éclate et tous les jeunes sont mobilisés sauf le fils du fermier avec sa jambe brisée. Le voisin revient alors et dit : « Votre fils sera le seul du village à ne pas partir à la guerre, assurément il a beaucoup de chance. » Le fermier alors répond : « Je ne sais pas si c'est une bonne ou une mauvaise chose. »

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
GENERALITES PREMIERE PARTIE	4
<i>TOXOPLASMA GONDII</i> ET TOXOPLASMOSE	4
I) Historique et taxonomie	4
II) Le cycle évolutif complexe de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
1) La phase sexuée	5
2) La phase asexuée.....	5
III) Ultrastructure du toxoplasme : une cellule hautement différenciée	6
1) Morphologie générale des différents stades	6
2) Les organites caractéristiques d'une cellule eucaryote.....	6
3) Les organites spécifiques	7
3.1) Le complexe apical	7
• Le conoïde.....	7
• Les micronèmes et les protéines MIC	8
• Les rhoptries et les protéines ROP.....	8
• Les granules denses et les protéines GRA	9
3.2) Le complexe membranaire interne.....	10
3.3) L'apicoplaste.....	10
IV) Invasion de la cellule hôte.....	11
V) La multiplication du parasite au sein de la cellule hôte.....	13
VI) Pathogénèse : la toxoplasmose	14
1) La toxoplasmose congénitale.....	15
2) La toxoplasmose et l'immunodépression	15
2.1) Toxoplasmose et SIDA	15
2.2) Toxoplasmose et immunodépression thérapeutique.....	16
VII) La réponse immunologique de l'hôte.....	16
1) La réponse immunitaire à médiation humorale	16
2) La réponse immunitaire à médiation cellulaire	17
3) Manipulation de la réponse innée par <i>T. gondii</i>	18
VIII) Diagnostic de la toxoplasmose.....	18
GENERALITES DEUXIEME PARTIE	20
DIFFERENCIATION TACHYZOÏTE/BRADYZOÏTE CHEZ <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	20
I) Le processus d'interconversion tachyzoïte / bradyzoïte	20
1) Interconversion et pathogénèse	20
2) Interconversion et virulence	21
3) L'interconversion tachyzoïte / bradyzoïte	22
II) Expression protéique différentielle et régulation génique	23
1) Les protéines spécifiques de stade.....	23
2) Régulation génique.....	25
2.1) Régulation génique par les histones.....	25
• Acétylation des histones.....	26
• Méthylation des histones.....	27
2.2) Régulation génique transcriptionnelle.....	27
• Structure des promoteurs.....	27
• La machinerie transcriptionnelle	28
3) Les énoïases de <i>Toxoplasma gondii</i>	28
3.1) Quelques rappels sur l'énoïase.....	28
3.2) Les deux isoformes d'énoïase de <i>T. gondii</i>	29
3.3) Régulation transcriptionnelle des gènes <i>eno</i>	30
3.4) Localisation nucléaire des énoïases.....	31
GENERALITES TROISIEME PARTIE	33
LA O-N-ACETYLGLUCOSAMINYLATION	33
I) Généralités	33
1) Définition	33

2) Les protéines O-GlcNAc.....	34
3) Les sites O-GlcNAc	35
II) Les enzymes de la O-GlcNAc	35
1) La O-GlcNAc transférase.....	35
1.1) Généralités	35
1.2) Gène.....	36
1.3) Structure.....	37
2) La O-GlcNAcase	38
2.1) Généralités	38
2.2) Structure et domaines fonctionnels	38
3) Les inhibiteurs.....	39
3.1) Les inhibiteurs de l'OGT	40
3.2) Les inhibiteurs de la O-GlcNAcase.....	40
III) Les fonctions de la O-GlcNAc.....	41
1) Un simple monosaccharide et de nombreuses fonctions	41
1.1) Régulation de la phosphorylation.....	41
1.2) Dégradation des protéines.....	42
1.3) Modulation des interactions protéine/protéine	42
1.4) Médiation de la transcription	43
2) La O-GlcNAc, signal de translocation nucléaire des protéines cytosoliques ?	43
2.1) Le transport nucléaire « classique » des protéines	44
• Les échanges nucléocytoplasmiques	44
• La voie NLS	44
• Les signaux non peptidiques d'adressage nucléaire	44
2.2) La O-GlcNAc, signal de translocation nucléaire ?	45
• L'exemple de c-Myc	45
• L'exemple de Tau.....	45
• L'exemple de Sp1.....	46
• Le contre-exemple de Stat5.....	46
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	47
RESULTATS	48
<i>I) Cinétique de la localisation subcellulaire d'ENO2 au cours de la division des tachyzoïtes.....</i>	<i>48</i>
<i>II) Réalisation des constructions plasmidiques p[Tub5-eno2HA-Sag1 // Tub5-bléo-Sag1] et p[Sag1-eno1HA-Sag1 // Tub5-bléo-Sag1]</i>	<i>49</i>
<i>III) Obtention des parasites transgéniques</i>	<i>50</i>
<i>IV) Mise en évidence d'une migration différentielle des énolasses endogènes et des énolasses transgéniques ENO-HA en SDS-PAGE.....</i>	<i>51</i>
<i>V) Etude phénotypique des parasites transgéniques</i>	<i>53</i>
1) Etude de l'expression de protéines spécifiques du stade bradyzoïte.....	53
2) Tests d'invasion et de multiplication.....	54
3) Tests de virulence.....	55
<i>VI) Alignement de 4 énolasses adressées au noyau et mise en évidence de sites potentiels de O-N-Acétylglucosaminylation.</i>	<i>56</i>
<i>VII) Mise en évidence de la O-N-acétylglucosaminylation sur ENO1 et ENO2</i>	<i>57</i>
<i>VIII) ENO2 est radiomarquée métaboliquement avec de la glucosamine tritiée</i>	<i>58</i>
<i>IX) Effet des drogues alloxan et streptozotocine sur les parasites</i>	<i>59</i>
1) Tests de croissance	59
2) Localisation subcellulaire d'ENO2 en présence d'alloxan ou de streptozotocine	60
3) Fractionnement subcellulaire noyau/cytoplasme.....	61
<i>X) Mise en évidence de l'existence du gène codant l'OGT chez Toxoplasma gondii.....</i>	<i>62</i>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	65
<i>Les énolasses ENO1 et ENO2 de T. gondii, des protéines nucléaires régulant l'expression de gènes ?</i>	<i>65</i>
<i>La O-N-Acétylglucosaminylation est-elle impliquée dans la localisation nucléo-cytoplasmique des énolasses ?</i>	<i>69</i>
<i>Mise en évidence d'une OGT de type SPY chez T. gondii.....</i>	<i>72</i>
CONCLUSION	76
MATERIELS ET METHODES.....	77
<i>I) Toxoplasma gondii</i>	<i>77</i>
1) Entretien des parasites.....	77

2) Purification des parasites.....	77
II) Biochimie	78
1) Préparation d'extraits cytosoliques et nucléaires	78
2) Chromatographie d'affinité sur WGA (Wheat Germ Agglutinin).....	78
3) Immunofluorescence indirecte in vitro.....	79
4) Séparation des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide en conditions dénaturantes	80
5) Electrotransfert et immuno-empreinte (« Western Blot »)	80
6) Tests de drogues.....	81
6.1) Tests de croissance.....	81
6.2) Effet des drogues sur la localisation subcellulaire d'ENO2	82
7) Extraction au phénol / chloroforme.....	82
8) Dosage protéique par la méthode de Bradford	82
9) Marquage métabolique à la glucosamine tritiée et immunoprécipitation anti-ENO2.....	82
III) Bioinformatique	83
1) Récupération et alignement des séquences.....	83
2) Recherche de sites potentiels.....	84
3) Identification de l'ORF codant l'OGT	84
IV) Biologie moléculaire	85
1) Réalisation de la construction p[tub5-eno2HA-sag1][tub5-bléo-sag1]	85
1.1) Amplification de l'ORF eno2.....	85
1.2) Digestion de l'insert et du vecteur p[tub5-bléo-sag1]	86
1.3) Déphosphorylation du plasmide.....	86
1.4) Ligation.....	87
1.5) Transformation des bactéries XL1-blue	87
1.6) Criblage des colonies par PCR.....	87
1.7) Extraction plasmidique	88
1.8) Séquençage de l'insert	88
1.9) Clonage du promoteur Tub 5	89
1.10) Transfection transitoire des parasites	89
1.11) Clonage de la cassette de résistance.....	90
2) Réalisation de la construction p[Sag1-eno1HA-Sag1][Tub5-bléo-Sag1].....	90
V) Obtention des parasites exprimant ENO-HA de manière stable	91
1) Transfection stable	91
2) Sélection des parasites transfectés de manière stable	91
2.1) Sélection à la bléomycine	91
2.2) Clonage des mutants	91
2.3) Criblage des mutants par immuno-empreinte.....	92
VI) Etude phénotypique des mutants	92
1) Tests d'invasion et de multiplication.....	92
2) Etude de l'expression d'antigènes spécifiques de bradyzoïtes dans les parasites transgéniques	92
3) Etude de la virulence et de l'interconversion	93

SEQUENCES OLIGONUCLEOTIDIQUES **94**

ARTICLE..... **95**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES **121**

INTRODUCTION

Introduction

La toxoplasmose est une anthroponose ubiquitaire largement répandue dans le monde, devenue ces dernières années une maladie opportuniste majeure. Cette infection parasitaire est généralement asymptomatique chez les individus immunocompétents mais elle peut se révéler fatale, en l'absence de traitement, chez les patients immunodéprimés (sidéens, patients greffés ou atteints d'un cancer). La toxoplasmose encéphalique est le syndrome clinique le plus fréquent chez les sidéens, développé par 20 à 50% des patients (Luft et Remington, 1992). De plus, la toxoplasmose congénitale, consécutive à une primo-infection chez la femme enceinte, reste un risque mortel pour le fœtus malgré les dépistages prénataux.

Toxoplasma gondii est le parasite protozoaire intracellulaire obligatoire responsable de cette infection commune. Le cycle hétéroxène de ce parasite nécessite un Félin, au sein duquel s'effectue la phase sexuée (hôte définitif), et un vertébré homéotherme, siège de la phase asexuée du cycle de vie (hôte intermédiaire). Chez ses hôtes intermédiaires, le parasite existe sous deux formes asexuées. Le tachyzoïte est la forme de virulence cytolitique à multiplication active, caractéristique de la phase aiguë de la maladie. Sous la pression du système immunitaire, le tachyzoïte se différencie en une forme de résistance enkystée et latente, le bradyzoïte. Lorsque le système immunitaire de l'hôte est compromis, le bradyzoïte se re-différencie en tachyzoïte. Cette réactivation toxoplasmique engendre des lésions tissulaires, notamment encéphaliques, dont les conséquences peuvent être fatales en l'absence de traitement. Les médicaments actuellement utilisés ne sont efficaces que sur la forme tachyzoïte et permettent donc de soigner les patients dans la phase aiguë de la maladie seulement. L'enkystement est un obstacle majeur à l'élaboration d'un traitement curatif: les patients immunodéprimés subissent donc un traitement prophylactique, souvent mal toléré et engendrant, dans de nombreux cas, des allergies.

Le processus d'interconversion, définissant la différenciation du tachyzoïte en bradyzoïte et du bradyzoïte en tachyzoïte, est au centre de la pathogenèse et de la pérennité du parasite. Les bases moléculaires régissant cette différenciation parasitaire ne sont pas

encore totalement élucidées. Toutefois, il est établi que ce processus s'accompagne d'une régulation fine de gènes spécifiques de stade, engendrant l'expression de protéines spécifiques de stade, marqueurs de la différenciation.

Des travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que deux protéines homologues impliquées dans la glycolyse, les émolases ENO1 et ENO2, étaient spécifiques des stades bradyzoïte et tachyzoïte, respectivement (Dzierszinski *et al.*, 1999, 2001).

Ces enzymes, ordinairement cytoplasmiques, ont été mises en évidence dans le noyau des parasites en cours de réplication active (Ferguson *et al.*, 2002). De plus, l'isoforme ENO1 du bradyzoïte est retrouvée très précocement dans le noyau du tachyzoïte en cours de conversion dans le cerveau des souris (Ferguson *et al.*, 2002). La localisation nucléaire de l'émolase n'est pas un phénomène restreint au modèle du toxoplasme. En effet, chez l'Homme, un transcrit alternatif du gène *eno1* produit la protéine MBP-1, émolase nucléaire réprimant la transcription du proto-oncogène *c-myc* (Féo *et al.*, 2000). L'émolase LOS2 d'*Arabidopsis thaliana* est également retrouvée dans le compartiment nucléaire où elle réprime la transcription d'un gène codant pour un répresseur transcriptionnel des gènes de sensibilité au froid (Lee *et al.*, 2002). Ces données suggèrent que les émolases de *Toxoplasma gondii* pourraient être des acteurs moléculaires impliqués dans le processus de différenciation.

Nous avons tout d'abord réalisé *in vitro* la cinétique de l'adressage au noyau d'ENO2 au cours du développement du tachyzoïte intracellulaire. Les résultats obtenus ont montré que la localisation nucléaire d'ENO2 est corrélée aux stades précoces de la réplication du parasite. La production de parasites transgéniques sur-exprimant l'une ou l'autre des isoformes de l'émolase étiquetée avec un épitope HA a permis de confirmer la localisation nucléaire de ces enzymes glycolytiques.

Au cours de ce travail, nous avons abordé l'étude du mécanisme déterminant la localisation nucléo-cytoplasmique de ces enzymes qui ne possèdent pas de NLS (Nuclear Localization Signal) et dont le poids moléculaire (48 kDa) n'autorise probablement pas une diffusion passive au travers des pores nucléaires. Des recherches bioinformatiques nous ont orienté vers un mécanisme basé sur une balance O-N-Acétyleglucosaminylation (O-GlcNAc) / phosphorylation. Nous avons donc entrepris de démontrer l'existence de la modification post-traductionnelle O-GlcNAc sur les deux émolases. Une chromatographie d'affinité utilisant la lectine WGA (Wheat Germ Agglutinin), spécifique des résidus GlcNAc en position terminale, a révélé qu'ENO1 porte des résidus O-GlcNAc susceptibles

de jouer un rôle dans sa localisation nucléaire. ENO2 semble également porter ce type de résidus, mais la probable structure O-glycannique supplémentaire identifiée par bioinformatique ne permet pas de conclure catégoriquement quant à la présence de ces résidus O-GlcNAc. Le rôle potentiel de ces résidus dans la localisation nucléaire des énolases a été étudié via l'utilisation de deux drogues inhibant les deux enzymes impliquées dans l'ajout ou le retrait du monosaccharide chez les mammifères : l'alloxan, inhibant la O-GlcNAc transférase (OGT) qui transfère les GlcNAc sur les protéines, et la streptozotocine, inhibant la N-acétylglucosaminidase (O-GlcNAcase) qui retire les GlcNAc des protéines. Ces drogues se sont révélées inactives sur le parasite, suggérant que l'OGT et la O-GlcNAcase parasitaires seraient différentes des enzymes humaines. De plus, nous avons identifié un gène putatif codant pour une OGT du toxoplasme. L'analyse par Blast de cette protéine putative a révélé une homologie avec les OGT de plantes, les protéines SPY, rappelant le lien entre les Apicomplexa et le règne végétal. Une étude phylogénétique a confirmé l'appartenance de cette enzyme putative à la famille SPINDLY des OGT végétales, ce qui conforte la différence de susceptibilité du parasite aux inhibiteurs décrits ci-dessus.

Ce travail montre pour la première fois l'existence potentielle de la modification O-GlcNAc et de l'enzyme OGT chez *Toxoplasma gondii*.

GENERALITES

Généralités première partie

Toxoplasma gondii et toxoplasmose

I) Historique et taxonomie

Toxoplasma gondii fut découvert pour la première fois chez le rongeur africain *Ctenodactylus gondii* par Nicolle et Manceaux en 1908 à l'Institut Pasteur de Tunis (Nicolle et Manceaux, 1908). Au cours des années suivantes, il fut observé chez de nombreux animaux mais ce n'est qu'en 1923 qu'un ophtalmologiste découvre sa présence dans des lésions oculaires chez un enfant (Janku, 1923). Dès 1941, Sabin décrit le premier cas d'encéphalite toxoplasmique et montre que *T. gondii* est la seule espèce du genre *Toxoplasma* (Sabin, 1941). Le cycle naturel du parasite ne fut expliqué qu'en 1970 par Frenkel et Hutchinson après la découverte des oocystes et du rôle du chat comme hôte définitif (Frenkel *et al.*, 1970 ; Hutchinson *et al.*, 1970).

Le toxoplasme, micro-organisme eucaryote unicellulaire, appartient au règne des Protozoa. En 1980, Levine décrit la position taxonomique de *Toxoplasma gondii* :

Phylum	Apicomplexa , Levine <i>et al.</i> , 1980
Classe	Sporozoea , Leuckart, 1879
Sous-classe	Coccidia , Leuckart, 1879
Ordre	Eucoccidiida , Léger et Dubosc, 1910
Sous-ordre	Eimeriina , Léger, 1911
Famille	Sarcocystidae
Genre	<i>Toxoplasma</i> (du grec « toxon » qui signifie « arc », se référant à sa forme arquée.)
Espèce	<i>gondii</i> , du nom de l'hôte découvert par Nicolle et Manceaux en 1908.

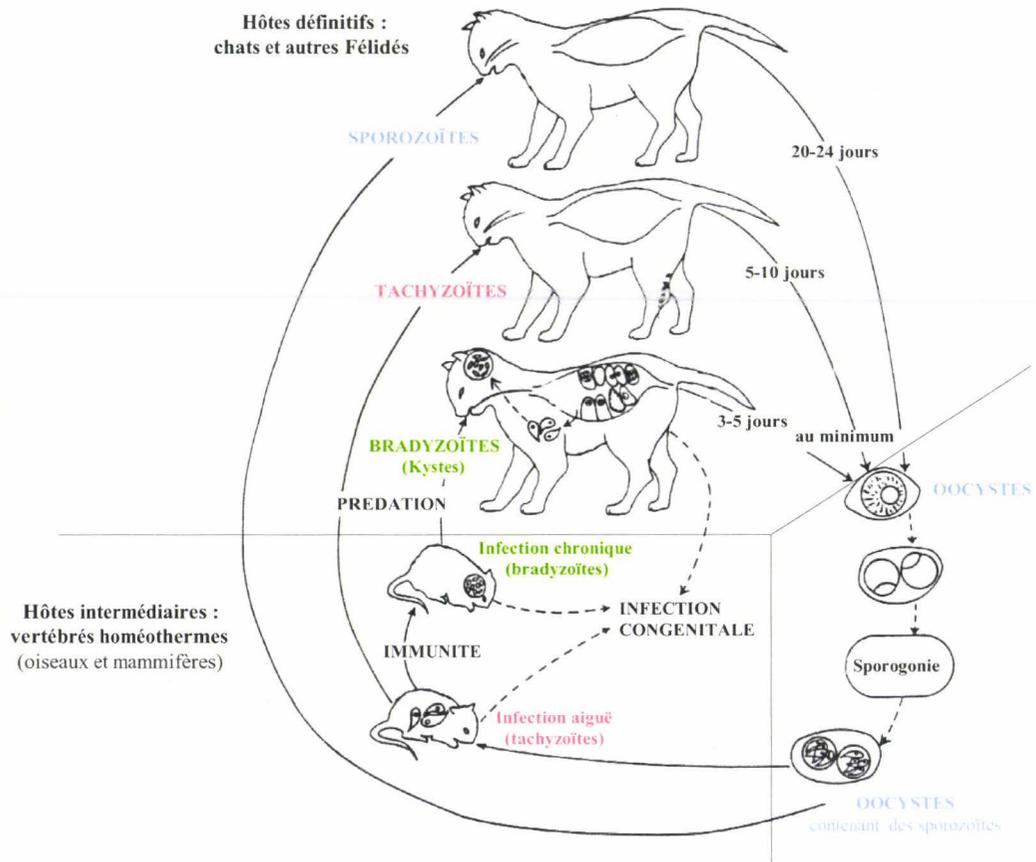


Figure 1 : Le cycle évolutif de *Toxoplasma gondii* (d'après Frenkel, 1973)

II) Le cycle évolutif complexe de *Toxoplasma gondii*

T. gondii effectue un cycle hétéroxène, comprenant une phase de multiplication sexuée spécifique de l'hôte définitif (le chat et autres Félidés) et une phase de multiplication asexuée se déroulant chez les hôtes intermédiaires (tout Vertébré homéotherme) comme chez l'hôte définitif (figure 1, d'après Frenkel, 1973).

1) La phase sexuée

L'hôte définitif, le chat, s'infeste généralement en ingérant des proies dont les tissus contiennent des kystes toxoplasmiques renfermant des bradyzoïtes. L'infestation peut également être due à l'ingestion de sporozoïtes contenus dans les oocystes disséminés dans l'environnement. Après digestion de la paroi des kystes ou des oocystes par les enzymes protéolytiques stomacales et intestinales, les bradyzoïtes ou les sporozoïtes pénètrent dans les cellules épithéliales intestinales où ils vont se multiplier par schizogonie (division asexuée) et donner les schizontes. Ces derniers subissent alors une fragmentation du cytoplasme et évoluent en mérozoïtes, capables de ré-infester les cellules intestinales. A ce stade, soit un nouveau cycle asexué s'effectue via la dissémination des parasites dans le tube digestif du chat, soit le cycle sexué propre à l'hôte définitif est initié. Dans ce cas, les mérozoïtes se différencient en gamontes : les macrogamontes femelles et les gamontes mâles qui évoluent par division en microgamètes biflagellés. La fécondation s'effectue au niveau des microvillosités intestinales et aboutit à la formation d'oocystes non infectieux, formes de résistance parasitaires entourées d'une paroi et éliminées avec les fèces du chat. Dans les cinq jours suivant leur libération dans le milieu extérieur, les oocystes sporulent : ils subissent une méiose suivie de deux divisions asexuées, générant ainsi huit sporozoïtes haploïdes infectieux. Les oocystes peuvent persister jusqu'à dix-huit mois dans des conditions environnementales favorables, notamment une forte humidité.

2) La phase asexuée

L'Homme, hôte intermédiaire potentiel, s'infeste par l'ingestion de kystes toxoplasmiques contenus dans la viande crue ou insuffisamment cuite, ou d'oocystes matures souillant des végétaux ou présents dans l'eau. Après digestion de la paroi des kystes ou des oocystes, les bradyzoïtes ou les sporozoïtes pénètrent dans les cellules intestinales, se multiplient et se différencient en tachyzoïtes, formes virulentes à multiplication rapide, caractéristiques de la phase aiguë de la maladie. Ces tachyzoïtes peuvent infecter toutes les cellules nucléées de l'hôte au sein desquelles ils se divisent par endodyogonie (les deux

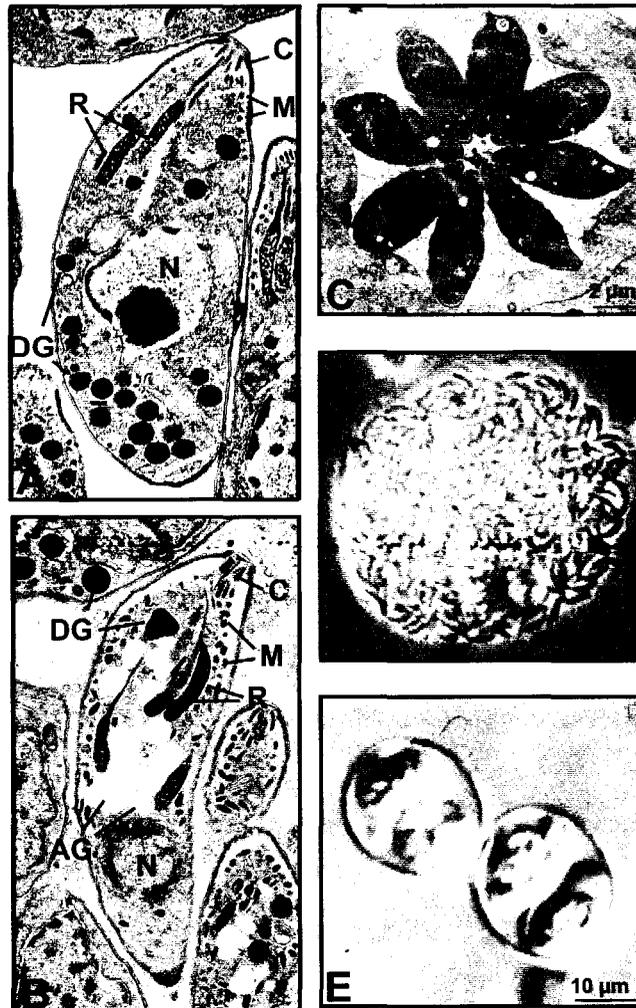


Figure 2A : Ultrastructure d'un tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* (d'après Coppin et al., 2003); C: conoïde, M: micronème, R : rhoptrie, DG: granule dense, N : noyau.

Figure 2B : Ultrastructure d'un bradyzoïte de *Toxoplasma gondii* (d'après Coppin et al., 2003); C: conoïde, M: micronème, R : rhoptrie, DG: granule dense, N : noyau, AG : grains d'amylopectine.

Figure 2C : Micrographie d'une vacuole parasitophore contenant huit tachyzoïtes (Dr J-F. Dubremetz)

Figure 2D : Kyste toxoplasmique contenant des bradyzoïtes (contraste de phase)

Figure 2E : Oocystes (contraste interférentiel différentiel)

cellules filles se forment au sein de la cellule mère) (Vivier et Petitprez, 1969). Ils vont se disséminer dans tout l'organisme via l'invasion des cellules de proche en proche et via les voies circulatoires sanguines et lymphatiques. L'hôte met rapidement en place une immunité spécifique aboutissant à l'élimination de la majeure partie de la population de tachyzoïtes. Toutefois, une faible proportion va échapper au système immunitaire en se différenciant en bradyzoïtes, formes latentes à multiplication lente, caractéristiques de la phase chronique de la maladie. Les bradyzoïtes vont s'enkyster majoritairement dans les muscles et le cerveau où ils vont persister durant toute la vie de l'hôte. Chez la souris, les kystes sont détectables dans le cerveau onze jours après l'infection (Freyre *et al.*, 1989).

III) Ultrastructure du toxoplasme : une cellule hautement différenciée

1) Morphologie générale des différents stades

Le tachyzoïte, forme asexuée invasive, est une cellule arquée de 6 à 8 μm de long et de 2 à 3 μm de large, dont l'extrémité apicale est plus effilée (Fortier *et* Dubremetz, 1993) (figure 2A).

Le bradyzoïte, forme asexuée enkystée, ressemble beaucoup au tachyzoïte mais il est un peu plus petit, son noyau plus postérieur et son contenu plus riche en micronèmes et en grains d'amylopectine, substance de réserve formée de polymères de glucose (Fortier *et* Dubremetz, 1993) (figure 2B).

Le kyste peut contenir des centaines de bradyzoïtes. Il est de forme sphérique, de 5 à 50 μm de diamètre (figure 2D).

Le sporozoïte, ressemble également au tachyzoïte, mais il est plus riche en micronèmes et possède des rhoptries plus importantes.

L'oocyste mesure 10 à 12 μm de diamètre et il est entouré d'une paroi en double couche (figure 2E).

2) Les organites caractéristiques d'une cellule eucaryote

Toxoplasma gondii possède les organites classiques d'une cellule eucaryote :

- un noyau sphérique de 1 à 2 μm de diamètre renfermant un génome haploïde de 80 Mb, composé de 11 chromosomes dont la taille varie de 2 à 6 Mb ;
- une mitochondrie unique et ramifiée (de Melo *et al.*, 2000) ;

- un réticulum endoplasmique très étroitement lié à la membrane nucléaire, un appareil de Golgi et de nombreux ribosomes.

3) Les organites spécifiques

Toxoplasma gondii possède en outre des organites et structures particulières aux Apicomplexa.

3.1) *Le complexe apical*

Le phylum des Apicomplexa doit son nom à cette structure caractéristique localisée dans la partie antérieure des parasites. Le complexe apical est constitué du conoïde et de composants sécrétoires spécialisés que sont les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Les protéines de ces organites sécrétoires sont impliquées dans l'immunomodulation, la motilité par glissement, l'invasion de la cellule hôte, la survie intracellulaire, l'acquisition des nutriments pendant la réplication et la sortie de la cellule.

✚ *Le conoïde*

Le conoïde, en forme de cône tronqué, est constitué de structures fibrillaires enroulées en spirale (figure 3). Il est délimité à l'avant par deux anneaux polaires antérieurs et à sa base par l'anneau polaire inférieur. Ce dernier sert d'ancrage à 22 microtubules longitudinaux de 26 à 30 nm arrangés en spirale et plaqués contre la face interne du complexe membranaire interne. Cet arrangement spiralé serait responsable de la torsion du parasite pendant la locomotion (Chiappino *et al.*, 1984). Le conoïde peut être pointé vers l'avant ou rétracté au niveau de la gaine des microtubules (Aikawa *et al.*, 1977).

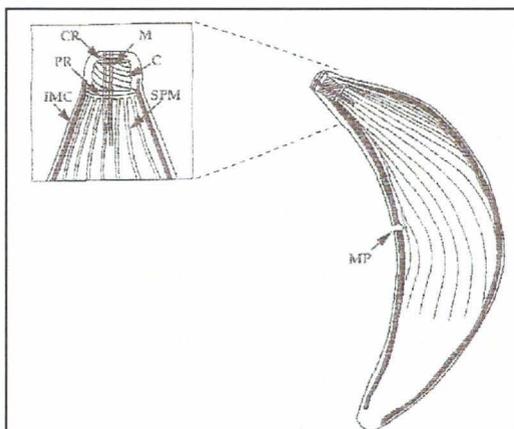


Figure 3 : Le cytosquelette de *Toxoplasma gondii* (d'après Black et Boothroyd, 2000)

Le schéma illustre l'arrangement du cytosquelette du parasite. La partie antérieure du parasite a été agrandie dans le cadre à gauche et illustre les anneaux préconoïdaux (CR), le conoïde (C), les deux microtubules apicaux (M) et l'anneau polaire (PR) duquel émanent 22 microtubules subpelliculaires (SPM). Le complexe membranaire interne (IMC) est localisé juste dessous la membrane plasmique, du pôle antérieur au pôle postérieur, et est interrompu par le micropore (MP), localisé au milieu du parasite.

✚ *Les micronèmes et les protéines MIC*

Les micronèmes sont des organites denses aux électrons, en forme de petits bâtonnets, délimités par une membrane (Fortier *et* Dubremetz, 1993) et dont la quantité varie selon le stade parasitaire (environ une centaine). Les micronèmes sont les organites du complexe apical les plus conservés parmi tous les parasites Apicomplexa, suggérant leur rôle fondamental dans l'invasion cellulaire.

Les protéines MIC contenues dans les micronèmes sont sécrétées dès le contact initial du pôle apical du parasite avec la surface de la cellule hôte (Carruthers et Sibley, 1997). Elles vont initier l'attachement apical et la pénétration dans la cellule hôte. La sécrétion des micronèmes est contrôlée par une voie de signalisation où le calcium intracellulaire est un régulateur essentiel (Carruthers et Sibley, 1999).

La plupart des protéines MIC, après sécrétion, se retrouvent à la surface du parasite grâce à une séquence transmembranaire présente à proximité de la partie carboxy-terminale (Ct). En outre, les protéines MIC possèdent des domaines d'adhésion homologues aux domaines trouvés dans certaines protéines de vertébrés, telles que les intégrines, la thrombospondine ou l'EGF (Epidermal Growth Factor). Les domaines de type intégrine fixent tout un panel de protéines de matrice extracellulaire telles que les collagènes, les laminines ou les protéoglycannes et héparanes sulfates. Ces protéines de matrice extracellulaire, exprimées par de nombreux types cellulaires et conservées parmi les vertébrés, représentent des récepteurs potentiels adéquats pour un parasite infectant un large spectre d'hôtes et de cellules.

Les protéines MIC fonctionnent souvent en complexes d'adhésion aux cellules hôtes. Les protéines MIC6, MIC1 et MIC4 forment un complexe hétérotrimérique (Reiss *et al.*, 2001). MIC1 et MIC4 sont responsables des propriétés adhésives du complexe et se fixent aux cellules (Brecht *et al.*, 2001). MIC6 est la seule protéine du complexe à posséder une séquence transmembranaire, elle permet l'ancrage du complexe à la membrane. Elle serait également responsable de l'adressage du complexe aux micronèmes (Reiss *et al.*, 2001). Un autre complexe est constitué de la protéine MIC2 avec M2AP (MIC2 Associated Protein) (Rabenau *et al.*, 2001). Ce complexe permet l'attachement apical et se déplace en même temps que la jonction mobile. Dès la fin de l'invasion, le complexe est éliminé par protéolyse.

✚ *Les rhoptries et les protéines ROP*

Les rhoptries sont des organites en forme de massues allongées, au nombre d'une dizaine, entourés par une membrane et mesurant 1 à 4 μm . Elles sont situées dans le tiers

antérieur du parasite et leur col est prolongé par un pédicule étroit qui traverse l'intérieur du conoïde pour rejoindre une vésicule située juste sous l'extrémité apicale (Fortier *et* Dubremetz, 1993).

Le contenu des rhoptries est sécrété dans le cytoplasme de la cellule hôte, juste après l'adhésion apicale du parasite et le largage des protéines MIC et avant la pénétration du parasite à l'intérieur de la cellule (Carruthers *et* Sibley, 1997). Le contenu des rhoptries est constitué de lipides et de protéines (les protéines ROP), impliqués dans la formation de la vacuole parasitophore et le recrutement des organites de la cellule hôte.

Une dizaine de protéines ROP ont aujourd'hui été décrites. Les protéines ROP subissent généralement un processus de maturation qui produirait des molécules actives à partir de pré-protéines (Soldati *et al.*, 1998).

La protéine ROP1 a d'abord été décrite comme étant le PEF « Penetrating Enhancing Factor », pour ses capacités à stimuler la pénétration parasitaire dans la cellule hôte (Norrby *et* Lycke, 1967). Cette protéine de 60,5 kDa est associée à la membrane de la vacuole parasitophore en formation et disparaît quelques heures après l'invasion. Son rôle exact dans l'invasion n'a pas été confirmé puisque les mutants nuls ROP1 présentent un pouvoir invasif identique à celui des parasites sauvages (Soldati *et al.*, 1995).

Les protéines ROP2, 3, 4 et 8 présentent des épitopes antigéniques communs et ont probablement des fonctions redondantes. La redondance de ces protéines pourrait assurer la réussite de l'invasion. Après maturation, ROP2 est insérée dans la membrane de la vacuole parasitophore et exposée du côté du cytoplasme de la cellule hôte (Beckers *et al.*, 1994), suggérant un rôle potentiel de cette protéine dans l'association intime de la vacuole parasitophore avec le réticulum endoplasmique et les mitochondries de la cellule.

Les granules denses et les protéines GRA

Les granules denses sont des organites présents dans le tachyzoïte et le bradyzoïte et sont distribués partout dans la cellule. Ils sont de forme sphérique, mesurant 200 à 300 nm de diamètre et leur contenu homogène est particulièrement dense aux électrons.

Lorsque le parasite est complètement installé dans la vacuole parasitophore, les granules denses déversent leur contenu dans la vacuole afin d'en réaliser la maturation (Carruthers *et* Sibley, 1997). Les protéines GRA sont solubles dans les granules denses mais une fois libérées, certaines s'associent à la vacuole parasitophore, ce qui permet au parasite de prélever des nutriments de la cellule hôte. Les protéines GRA seraient également impliquées

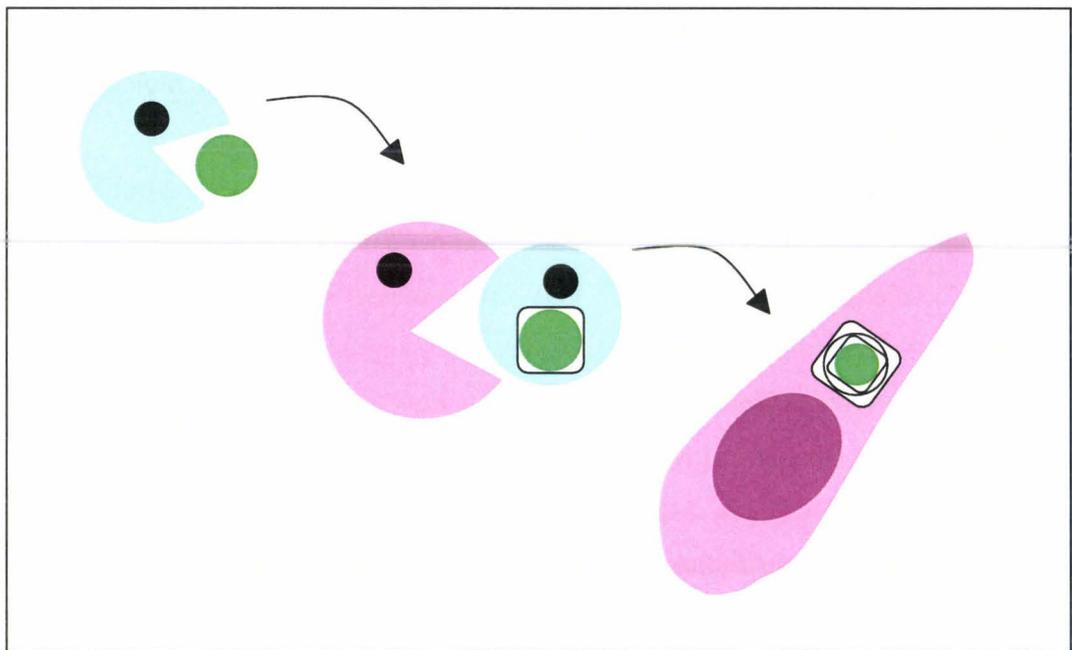


Figure 4 : Origine de l'apicoplaste par endosymbiose secondaire.

L'ancêtre du phylum des Apicomplexa (en rose) aurait ingéré une algue rouge unicellulaire (en bleu) (d'après Roos et al., 1999)

dans la survie intracellulaire et la réplication. Une dizaine de protéines GRA ont été identifiées et caractérisées.

GRA1 reste soluble dans la vacuole et serait impliquée dans l'homéostasie calcique de la vacuole. Les autres protéines GRA sont associées à la membrane de la vacuole parasitophore et/ou au réseau membranaire intravacuolaire. La fonction exacte des différentes protéines ROP n'a pas encore été élucidée, à cause de l'absence d'homologie avec d'autres protéines caractérisées.

3.2) Le complexe membranaire interne

T. gondii est délimité par une pellicule trimembranaire, composée d'une membrane plasmique externe classique doublée intérieurement d'un complexe membranaire interne discontinu, formé de vésicules aplaties juxtaposées, qui s'arrête au niveau du conoïde. Le complexe membranaire interne pourrait représenter une région spécialisée du réticulum endoplasmique (de Melo *et de Souza*, 1997). La pellicule trimembranaire est interrompue par une petite invagination circulaire de la membrane externe, dans la partie médiane du parasite, et qui traverse le complexe membranaire interne : le micropore (Fortier *et Dubremetz*, 1993).

3.3) L'apicoplaste

L'apicoplaste (pour plaste des Apicomplexa) est une organelle entourée de quatre membranes. L'apicoplaste proviendrait du chloroplaste d'une algue rouge qui aurait été ingérée par l'ancêtre des Apicomplexa (Roos *et al.*, 1999) (figure 4). *Cryptosporidium parvum* est le seul Apicomplexe qui ne possède pas d'apicoplaste. La perte de l'apicoplaste serait conséquente à une divergence des autres Apicomplexa. L'apicoplaste semble essentiel au parasite même si son rôle n'est pas encore bien défini. Il possède son propre génome de 35 kb codant pour de nombreux gènes, notamment des gènes ribosomiaux et un gène codant pour une ARN polymérase, mais la grande majorité des protéines plastidiales sont codées par le génome nucléaire. Ces dernières sont adressées à l'apicoplaste par une séquence bipartite située à l'extrémité amino-terminale (Nt).

L'apicoplaste n'a aucune fonction photosynthétique puisqu'il s'agit d'une relique de chloroplaste ne possédant pas de thylakoïdes. Sa fonction a été attribuée à la synthèse d'acides gras et autres lipides essentiels à la formation de la vacuole parasitophore. Ces voies de synthèse sont beaucoup plus proches des voies procaryotiques que des voies eucaryotiques, ce qui fait des protéines ou enzymes de l'apicoplaste des cibles thérapeutiques potentielles.

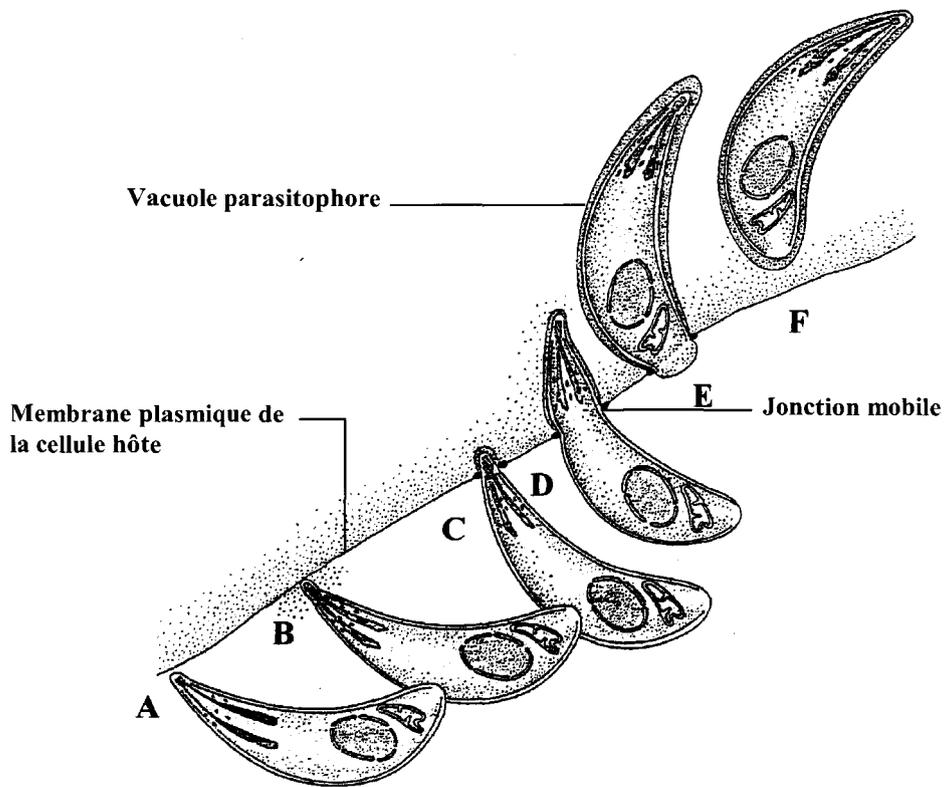


Figure 5 : L'invasion d'une cellule hôte par *Toxoplasma gondii* (d'après Pfefferkorn, 1986)

A : reconnaissance, réorientation et attachement du parasite; expulsion du contenu des micronèmes; **B** : protusion du conoïde et expulsion du contenu des rhoptries; **C-E** : formation de la jonction mobile entre la membrane plasmique de la cellule hôte et la pellicule du parasite, progression de la jonction mobile vers le pôle postérieur du parasite; **F** : phase de terminaison et soudure de la membrane plasmique pour former la vacuole parasitophore, exocytose du contenu des granules denses.

Quelques antibiotiques efficaces ont ainsi été testés : les fluoroquinolones, le triclosan, le chloramphénicol et les macrolides.

IV) Invasion de la cellule hôte

La forme particulière de motilité du parasite, le glissement (« gliding »), ainsi que la sécrétion des protéines contenues dans les organites du complexe apical (rhoptries, micronèmes et granules denses) sont les armes majeures développées par le parasite, permettant l'accomplissement du cycle de vie.

L'invasion est un processus actif dirigé par le parasite comportant plusieurs étapes dont le déroulement ne dure pas plus de 45 secondes. Les organites du complexe apical interviennent séquentiellement au cours de l'invasion, qui a pour finalité la formation d'un nouveau compartiment intracellulaire, la vacuole parasitophore (figure 5).

L'invasion active est basée sur l'existence chez le parasite d'un moteur actine-myosine couplé à la translocation d'adhésines de surface de type TRAP (Thrombospondin-Related Anonymus Protein), ce qui permet au parasite de se mouvoir par glissement (« gliding »). Ces adhésines sont des protéines libérées suite à l'exocytose des micronèmes, premiers organites du complexe apical à entrer en action dans le processus d'invasion.

Cette motilité par glissement permet au parasite d'envahir la cellule hôte mais aussi de traverser les barrières biologiques (épithélium intestinal par exemple) et de faciliter la dissémination active du parasite dans tout l'organisme.

Les adhésines de surface parasitaires vont reconnaître et se fixer à des molécules de type héparine sulfate à la surface de la cellule hôte (Carruthers *et al.*, 2000). Ces adhésines parasitaires sont alors déplacées le long de l'axe du parasite, de l'avant (pôle apical) à l'arrière : juste après sa sécrétion au pôle apical, l'adhésine MIC2 associée à M2AP est rapidement redistribuée au pôle postérieur du parasite avant d'être éliminée par protéolyse (Carruthers *et al.*, 2000 ; Brossier *et al.*, 2005).

La coordination de la sécrétion, de la migration à la surface et de la protéolyse de certaines adhésines permettent au parasite de se mouvoir en se fixant à la cellule hôte. Le parasite va se mouvoir dans le sens inverse du sens de migration des adhésines de surface (figure 6) (Jewett et Sibley, 2003). Cette propulsion en avant est possible grâce à la liaison de ces adhésines de surface (les protéines MIC) au cytosquelette du parasite, via un complexe constitué de l'aldolase, une enzyme de la glycolyse. Cette enzyme relie donc les adhésines avec des filaments d'actine (monomérique chez le toxoplasme), qui sont polymérisés *de novo*

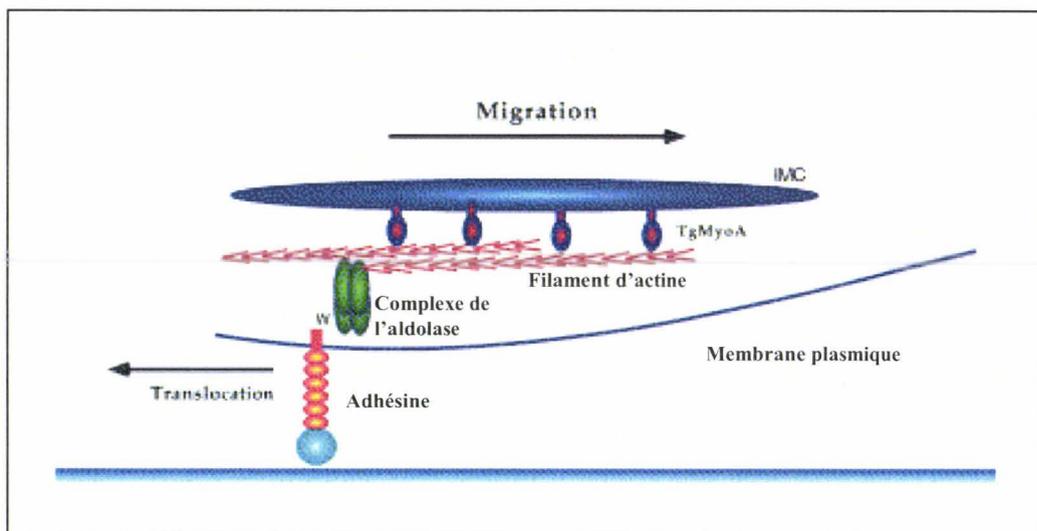


Figure 6 : Modèle du mécanisme de motilité de *Toxoplasma gondii* (d'après Jewett et Sibley, 2003)

L'adhésine de surface (MIC2 par exemple) est déplacée vers la partie postérieure du parasite d'une manière actine-dépendante. Le moteur TgMyoA est ancré dans le complexe membranaire. La myosine interagit avec les filaments d'actine tandis qu'un tétramère d'aldolase établit un pont entre les filaments d'actine et le domaine cytoplasmique de l'adhésine de surface. La translocation de l'adhésine vers l'arrière du parasite, fixée à son récepteur cellulaire, est responsable de l'avancée du parasite.

localement (Dobrowolski *et Sibley*, 1996). Ces filaments d'actine sont eux-mêmes directement reliés à un petit moteur de myosine appelé TgMyoA situé juste sous la membrane plasmique et attaché au complexe de la membrane interne (Meissner *et al.*, 2002).

Ce processus va avoir pour conséquence la réorientation du parasite, permettant l'attachement à la cellule hôte (via le pôle apical), et la pénétration dans la cellule hôte.

La protusion du conoïde induit l'invagination de la membrane plasmique de la cellule hôte : il se forme alors une jonction mobile sur laquelle le parasite prend appui pour se glisser à l'intérieur de la cellule. Les protéines des rhoptries sont alors libérées pour participer à l'élaboration de la vacuole parasitophore. La jonction mobile coulisse vers le pôle postérieur du parasite tout en l'entourant tandis que la vacuole parasitophore s'agrandit. Cette jonction mobile jouerait le rôle de tamis moléculaire permettant l'élimination des protéines membranaires de la cellule hôte, empêchant ainsi certains marqueurs conduisant à la fusion lysosomiale de persister sur la membrane de la vacuole parasitophore en formation (Mordue *et al.*, 1999). L'exocytose de ROP1 marque la formation précoce de la vacuole parasitophore (Carruthers *et Sibley*, 1997). Les protéines ROP, libérées dans le cytoplasme de la cellule, pourraient également affecter la signalisation cellulaire. A la fin du processus, la membrane de la vacuole se referme et cette dernière se détache alors du plasmalemme, isolant le parasite du cytoplasme de la cellule.

Une fois la vacuole parasitophore refermée, l'exocytose des granules denses est amorcée : la vacuole va alors subir un processus de maturation, ce qui va permettre au parasite d'accéder aux nutriments de la cellule hôte.

La perméabilisation de la membrane vacuolaire autorise la diffusion simple de petites molécules telles que des sucres simples, des acides aminés, des bases nucléiques et des cofacteurs (Schwab *et al.*, 1994). De nombreuses protéines secrétées par les rhoptries et les granules denses sont adressées à la membrane de la vacuole où elles formeraient des complexes responsables de la perméabilité de la membrane. L'élaboration d'un réseau tubulo-membranaire permettrait d'accroître la surface disponible de la membrane et ainsi d'augmenter les échanges nutritifs (Carruthers *et Sibley*, 1997).

Le parasite a également développé un système pour acquérir une variété de précurseurs lipidiques de la cellule, tels que des constituants phospholipidiques et des lipides neutres comme le cholestérol (Charron *et Sibley*, 2002). L'acquisition du cholestérol est possible par le détournement de la voie de récupération des LDL de la cellule (Coppens *et al.*, 2000).

Afin de récupérer d'autres sources nutritives, le parasite va recruter les mitochondries de l'hôte et envelopper la vacuole parasitophore dans le réticulum endoplasmique de la cellule. L'ancrage des mitochondries de la cellule hôte à la vacuole parasitophore résulterait de la présence de ROP2 à la surface de la vacuole (Sinai et Joiner, 2001). En effet, ROP2 possède dans sa partie N-terminale une séquence peptidique mimant la séquence d'importation à la mitochondrie permettant ainsi l'interaction de la mitochondrie avec la vacuole.

V) La multiplication du parasite au sein de la cellule hôte

Les tachyzoïtes, au sein de la vacuole, se divisent par endodyogénie (figure 7) : deux cellules filles se forment à l'intérieur de chaque parasite. On observe une duplication des rhoptries, de l'apicoplaste et de la mitochondrie. Le noyau reste différencié, s'étrangle sans qu'il y ait rupture de l'enveloppe nucléaire et les chromosomes ne se condensent pas. Le complexe apical et la pellicule trimembranaire de la cellule mère restent intacts jusqu'à l'individualisation des deux cellules filles. La pellicule interne maternelle disparaît et la membrane plasmique est réutilisée par les cellules filles (Pfefferkorn *et al.*, 1986).

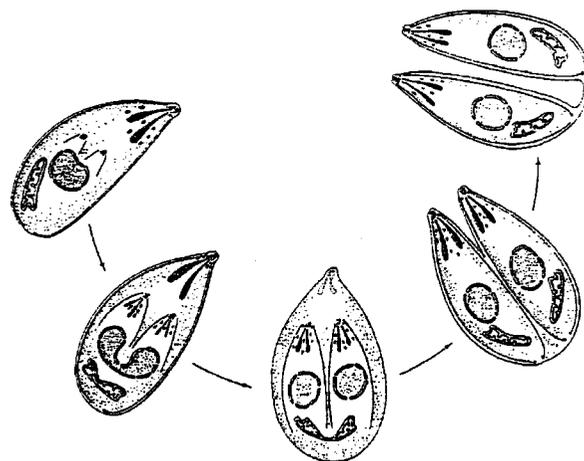


Figure 7 : Endodyogénie chez *Toxoplasma gondii* (d'après Pfefferkorn, 1986)

Le cycle du tachyzoïte dure de cinq à dix heures selon les souches toxoplasmiques. Au sein d'une même vacuole parasitophore, les divisions sont synchrones, au moins jusqu'à la troisième ou quatrième division.

Pendant cette phase intracellulaire, il a été observé que la translocation nucléaire de certains facteurs de transcription impliqués dans la réponse immunitaire de la cellule était altérée lors de l'infection de macrophages par le toxoplasme (Denkers *et al.*, 2003). Le

parasite serait activement impliqué dans ce subterfuge empêchant la destruction précoce de la cellule.

Le cycle lytique dure généralement de 24 à 48H et produit 16 à 128 progénies issues d'un seul parasite ayant envahi la cellule hôte, selon le type cellulaire infecté.

Le volume de la vacuole parasitophore augmente avec le nombre de divisions du parasite mais cette augmentation de volume n'altère pas l'intégrité de la cellule et n'est pas responsable de la sortie des parasites. En effet, des études utilisant l'ionophore calcique A23187 ont montré qu'un flux intracellulaire de calcium était suffisant pour déclencher la motilité et la sortie des parasites (Endo *et al.*, 1982). Ce n'est que récemment que le déclencheur naturel de la reprise de motilité et de la sortie des parasites a été mis en évidence. L'utilisation de cellules infectées semi-perméabilisées a montré que l'évènement critique détecté par le parasite était la chute drastique de la concentration en potassium accompagnant la rupture de la membrane plasmique de la cellule (Moudy *et al.*, 2001). Cette perméabilisation serait due à la sécrétion par le parasite d'une molécule encore non identifiée (Black *et al.*, 2000). La sortie de la cellule est donc un évènement dirigé par le parasite, tout comme la pénétration de la cellule.

Les parasites sortis de la cellule, très mobiles, infectent immédiatement les cellules avoisinantes et recommencent leur cycle lytique.

VI) Pathogenèse : la toxoplasmose

Chez les sujets immunocompétents, la toxoplasmose est fréquemment asymptomatique. Les rares formes apparentes associent une fièvre souvent modérée à 38°C, une asthénie, une polyadénopathie souvent cervicale et un syndrome mononucléosique. Ces signes persistent plusieurs jours ou semaines avant de disparaître.

Les pourcentages de séropositivité pour la toxoplasmose varient largement selon les populations ethniques, en fonction des habitudes nutritionnelles (consommation de viande crue ou insuffisamment cuite et de crudités) et socio-culturelles : de 3 à 45% aux Etats-Unis, 50% en Allemagne et 80% en France (moyenne de 40 à 60% en Europe centrale). Dans les pays chauds et humides (Madagascar, Congo, Guatemala), la contamination est essentiellement due aux oocystes et la prévalence de la toxoplasmose est de près de 90% à 50 ans. Dans les pays désertiques ou semi-arides, comme le Mali ou le Niger, la prévalence dans la population ne dépasse pas 20%.

L'infection constitue un important problème de santé publique dans les cas de toxoplasmoses congénitales et oculaires (choriorétinites), d'immunodépression acquise

(SIDA) ou thérapeutique (traitements immunodépresseurs préalables aux greffes, traitements anti-cancéreux).

1) La toxoplasmose congénitale.

En France, malgré les tests de dépistage prénuptiaux et prénataux obligatoires, on recense encore 700 à 3000 cas de toxoplasmose congénitale par an. Une primo-infection toxoplasmique chez la femme enceinte engendre dans 30 à 40% des cas la contamination du fœtus possédant un système immunitaire immature. La transmission materno-fœtale s'effectue 4 à 8 semaines après colonisation du placenta mais le passage du parasite du placenta au fœtus n'est pas systématique. La transmission par voie transplacentaire est fonction de l'état immunitaire de la mère, du développement et de l'intégrité du placenta, ainsi que de la virulence de la souche parasitaire (Fricker-Hidalgo *et al.*, 1996).

L'avancée dans la grossesse favorise une élévation de la fréquence des infections fœtales car le flux sanguin placentaire augmente, mais la gravité des atteintes diminue avec l'âge de la grossesse. En début de grossesse, l'infection du fœtus peut avoir des conséquences sévères : mort *in utero*, avortement spontané, atteintes multiviscérales, hydrocéphalie, chorioretinite et calcification cérébrale (Lebech *et al.*, 1996). Si le parasite est transmis au fœtus durant le dernier mois de grossesse, l'enfant pourra paraître sain à la naissance mais il présentera fréquemment une toxoplasmose congénitale latente se développant quelques années plus tard en toxoplasmose oculaire (choriorétinite, strabisme ou cécité).

La toxoplasmose est également un problème économique en agriculture, notamment en Angleterre et en Nouvelle Zélande, dans les cas de primo-infection chez les Ovins et les Bovins, entraînant des avortements spontanés (Duncanson *et al.*, 2001). Un vaccin commercial destiné aux brebis a été commercialisé (Buxton et Innes, 1995).

2) La toxoplasmose et l'immunodépression

La toxoplasmose peut être fatale en l'absence de traitement chez les sujets immunodéprimés et correspond le plus souvent à des réactivations d'infections antérieures.

2.1) Toxoplasmose et SIDA

Environ 80% des Sidéens meurent de maladies opportunistes majeures qui apparaissent le plus souvent lorsque le taux de lymphocytes T CD4+ a fortement chuté.

La toxoplasmose constituait, jusqu'à l'apparition des tri-thérapies, la principale cause parasitaire de mortalité (10 à 20% de mortalité et 30% de séquelles neurologiques) avec le

recul des autres infections parasitaires opportunistes et notamment l'infection à *Pneumocystis carinii*.

La toxoplasmose associée au SIDA touche particulièrement le système nerveux central. La toxoplasmose encéphalique est le syndrome clinique le plus fréquent, développé par 20 à 47% des malades aux Etats-Unis, 25 à 50% en Europe et en Afrique (Luft et Remington, 1992). 25% des sujets infectés de façon latente par *T. gondii* développeront une toxoplasmose encéphalique au cours du SIDA (Luft et Remington, 1992). La prophylaxie médicamenteuse a largement réduit les risques de réactivation toxoplasmique chez les patients.

2.2) Toxoplasmose et immunodépression thérapeutique

Dans le cas des transplantés, la transmission du parasite par l'organe greffé a été mise en évidence (61% des transplantations), surtout en cas de greffes cardiaques : une primo-infection sévère suit alors l'immunodépression. Dans 7% des cas, il y a une réactivation des kystes latents en réponse au traitement immunodépresseur destiné à limiter le rejet de greffe (Gallino *et al.*, 1996).

La toxoplasmose chez les patients atteints d'un cancer est associée à des désordres lymphoprolifératifs, des tumeurs solides et des leucémies (Israelski et Remington, 1993).

VII) La réponse immunologique de l'hôte

Chez un individu immunocompétent, le système immunitaire contrôle rapidement la phase aiguë de la maladie, ce qui a pour conséquence l'élimination de la quasi-totalité des tachyzoïtes mais également la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes. Ces derniers s'enkystent dans le cerveau et les muscles afin d'échapper au système immunitaire.

1) La réponse immunitaire à médiation humorale

L'infection par *T. gondii* induit la production d'IgG, IgM, IgA et IgE spécifiques des protéines membranaires et des antigènes excrétés et sécrétés (Wong et Remington, 1993). Ces anticorps constituent la première étape de défense contre l'infection. Les tachyzoïtes extracellulaires peuvent être lysés en présence des anticorps spécifiques et du complément ou opsonisés afin d'augmenter la phagocytose par les macrophages.

Ces anticorps circulants permettent notamment un suivi sérologique de l'infection dans les tests de diagnostics.

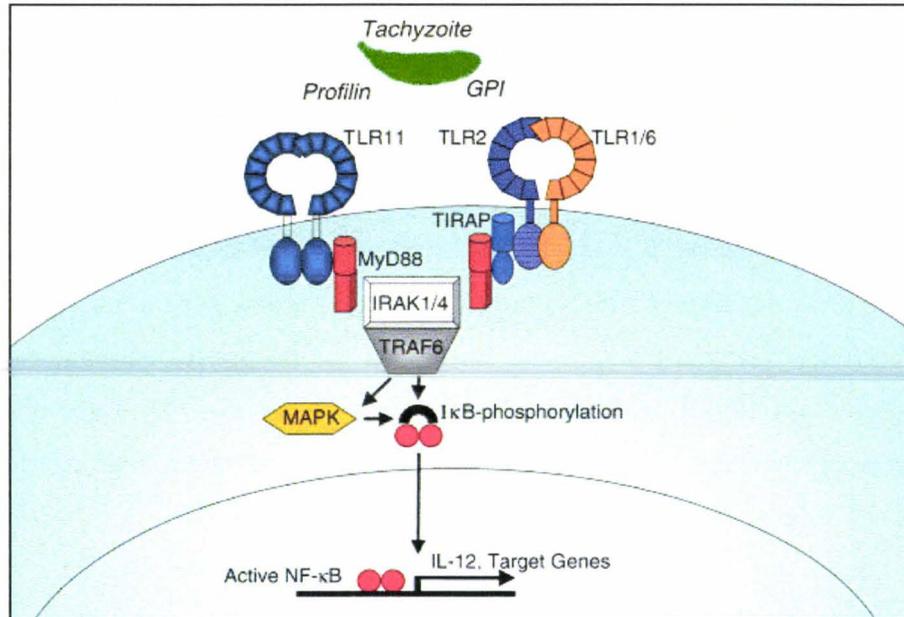


Figure 8 : Modèle de la reconnaissance des récepteurs Toll-like (TLR) chez *Toxoplasma gondii* (d'après Yarovinsky et Sher, 2006)

Les cellules de l'immunité innée expriment les récepteurs TLR11 et TLR2, reconnaissant spécifiquement la profiline et les ancras GPI, respectivement. La formation de l'homodimère TLR11 est suffisante pour l'activation de NF-κB alors que le TLR2 nécessite une association avec le TLR1 ou le TLR6 pour être activé. Généralement, l'activation des TLR conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-12: l'activation de MyD88 et son association à IRAK1 ou 4 (IL-1 ou 4 receptor associated kinase) et à TRAF6 (TNF receptor associated protein) induit l'activation de NF-κB et donc la production d'IL-12.

Seul le TLR11 induit la production d'IL-12. TLR2 induit la production d'autres cytokines.

2) La réponse immunitaire à médiation cellulaire

Les composants cellulaires de la réponse immunitaire jouent un rôle crucial dans la résistance à *T. gondii*.

Le parasite suscite en effet une forte réponse immune de type I. L'infection provoque l'induction de régulateurs intracellulaires de la différenciation Th1 tels que STAT1 et STAT4, et la génération ultérieure de cellules T sécrétant de l'IFN- γ et de lymphocytes T CD8+ libérant de l'IFN- γ et manifestant une activité cytolytique contre les cellules infectées (Gavrilescu et Denkers, 2003 ; Cai *et al.*, 2000). L'IFN- γ est le médiateur essentiel de la résistance à *T. gondii* (Scharton-Kersten *et al.*, 1996). La principale source d'IFN- γ est fournie par les lymphocytes T mais les cellules NK (Natural Killer), les macrophages et les cellules dendritiques sont également des sources non négligeables (Gazzinelli *et al.*, 1992 ; Sher *et al.*, 1993 ; Hunter *et al.*, 1994 ; Fukao *et al.*, 2001). La production d'IFN- γ est dépendante de l'interleukine 12 (IL-12) dont la fonction clé est d'activer STAT4 et donc de promouvoir une différenciation Th1. L'IFN- γ active à son tour STAT 1, générant une protection antimicrobienne (production d'oxyde nitrique notamment) (Gavrilescu et Denkers, 2003).

A ce jour, les voies de signalisation engendrant la production d'IL-12 et d'autres cytokines suite à l'infection par le toxoplasme ne sont pas encore complètement élucidées. La voie principale mise en évidence est commune à la grande majorité des agents microbiens et fait intervenir les TLRs (Toll-Like Receptors) (figure 8).

Le parasite possède des GPI (glycosylphosphatidylinositols) permettant l'ancrage de protéines à sa surface (Tomavo *et al.*, 1989) et ces GPI sont les ligands d'un complexe formé par l'association du TLR2 et du TLR1 ou 6 (Yarovinsky et Sher, 2006). L'association des GPI avec le TLR2 induit la production de la chimiokine CCL2. Une protéine toxoplasmique de type profiline est un ligand se fixant au TLR11 (Yarovinsky *et al.*, 2005).

La partie intracellulaire du TLR est associée à MyD88 (Myeloid Differentiation factor 88), protéine activant les voies de signalisation NF κ B et MAPK dont l'une des finalités est d'activer la production d'IL-12. Des souris déficientes pour le gène codant MyD88 montrent une déficience dans la réponse IL-12 pendant l'infection parasitaire et une susceptibilité accrue vis-à-vis du parasite (Scanga *et al.*, 2002).

Le toxoplasme possède en outre une autre voie de signalisation : le tachyzoïte extracellulaire sécrète une molécule mimant une chimiokine, la cyclophiline-18, se fixant au récepteur CCR5 (Aliberti *et al.*, 2003). Cette interaction induit l'activation d'une voie de signalisation dépendante de la protéine G conduisant à la production d'IL-12.

3) Manipulation de la réponse innée par *T. gondii*

Le parasite a développé différentes stratégies afin d'échapper à la réponse innée du système immunitaire.

Durant les premières 24 heures suivant l'infection, les macrophages ne produisent pas de TNF- α et la production d'IL-12 est nulle malgré la stimulation des cellules via la cyclophiline ou les ligands des TLR. Il a été observé que des cellules infectées par *T. gondii*, contrairement à des cellules non infectées, ne produisent ni TNF- α , ni IL-12 après une stimulation avec du LPS, indiquant clairement un mécanisme inhibiteur dirigé par le parasite. L'inhibition de la translocation nucléaire de NF κ B serait la clé de ce mécanisme (Butcher et Denkers, 2002). Après 24 heures, les cellules infectées et non infectées (mais stimulées par la cyclophiline) produisent de l'IL-12 alors que les macrophages infectés ne produisent toujours pas de TNF- α , suggérant deux mécanismes d'inhibition différents (Butcher et Denkers, 2002). L'inhibition de la production d'IL-12 serait également induite par la production de LXA4 (lipoxine A4) au début de l'infection, molécule diminuant l'expression du récepteur CCR5 (Aliberti *et al.*, 2002), mais aussi en induisant la production d'IL-10, cytokine ayant des effets inhibiteurs sur la synthèse de l'IL-12.

Il semblerait donc que le parasite, au début de l'infection, se protège de l'élimination en inhibant les voies de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires. Par la suite, le toxoplasme adopte un comportement pouvant paraître paradoxal puisqu'il « autorise » à nouveau la production d'IL-12. Cette stratégie permettrait au tachyzoïte de se disséminer dans l'organisme dans un premier temps, puis d'assurer sa survie à long terme en incitant le système immunitaire à produire des molécules qui induiront sa différenciation en bradyzoïte.

Le parasite inhibe également la translocation nucléaire de STAT1, empêchant ainsi l'expression des molécules du CMH de classe I et II à la surface des macrophages infectés (Luder *et al.*, 1998). Il est aussi capable d'inhiber l'apoptose cellulaire des cellules qu'il infecte. En effet, l'infection induit la production de molécules pro-apoptotiques que le parasite doit inhiber afin de poursuivre un développement intracellulaire efficace (Nash *et al.*, 1998).

VIII) Diagnostic de la toxoplasmose

De nombreux tests de dépistage ont été développés ces dernières années mais la persistance d'IgM ne permet pas de différencier une infection aiguë d'une infection latente ou d'une réactivation, ce qui pose problème notamment pendant la grossesse ou chez les patients immunodéprimés risquant une toxoplasmose encéphalique (Pour revue, Gross *et al.*, 2004).

La recherche d'anticorps spécifiques constitue la base du dépistage de la toxoplasmose chez les sujets immunocompétents (tests ELISA, western blot). La quantification des IgG1, IgG3 et IgM permet de différencier l'infection persistante (bradyzoïtes enkystés) de l'infection aiguë (tachyzoïtes). La combinaison « IgG positif, IgM et IgA négatifs » indique une infection chronique tandis que la détection des trois types indique une infection aiguë.

Ce type de test n'est pas applicable en cas de grossesse (persistance d'IgM) et dans les cas d'immunodépression.

Chez les patients immunodéprimés, la réactivation toxoplasmique peut conduire à une encéphalite toxoplasmique si elle n'est pas diagnostiquée et traitée à temps. Le dépistage précoce de cette réactivation permettrait donc d'éviter des lésions cérébrales graves chez les patients qui ne sont pas sous prophylaxie ou sous traitement. La détection directe du parasite dans le liquide cébrospinal par PCR permet de différencier les deux formes parasitaires à partir des transcrits du parasite mais l'obtention d'ARN intact est très délicate. Des anticorps monoclonaux spécifiques de stade permettraient un meilleur diagnostic sur des extraits tissulaires de patients.

En sérodiagnostic, la combinaison d'antigènes recombinants (P22/P25/P29/P35 par exemple) est très utile pour distinguer l'infection chronique de l'infection aiguë à l'aide des IgG présents dans les échantillons de patients.

Généralités deuxième partie

Différenciation tachyzoïte/bradyzoïte chez *Toxoplasma gondii*

*Le processus d'interconversion du toxoplasme est au centre de la pathogenèse. Les drogues actuellement disponibles sont actives sur les tachyzoïtes uniquement et la plupart ne préviennent pas la réactivation toxoplasmique. Les recherches fondamentales sur *T. gondii* sont centrées sur l'étude des processus permettant la conversion de stade, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Les éléments marquants de l'interconversion sont présentés dans ce chapitre.*

Lors de l'infection d'un hôte intermédiaire immunocompétent, *Toxoplasma gondii* subit une conversion de stade entre la forme virulente à multiplication rapide (le tachyzoïte) et la forme latente enkystée à multiplication lente (le bradyzoïte). Ce phénomène, appelé interconversion, est au centre de la pathogenèse et de la longévité de l'infection.

L'interconversion tachyzoïte/bradyzoïte est accompagnée d'une régulation de l'expression de gènes et protéines spécifiques de stade. Un grand nombre de ces protéines a été mis en évidence ces dernières années, notamment deux isoformes de l'énolase, les protéines ENO1 et ENO2. Les bases moléculaires régissant le processus d'interconversion ne sont pas encore totalement élucidées.

Récemment, de nouvelles techniques ont été développées afin de mieux caractériser l'expression des gènes au cours de l'interconversion et d'élucider les événements complexes conduisant à ce changement de stade.

Outre son importance au niveau clinique, l'étude de l'interconversion de stade chez *Toxoplasma gondii*, organisme modèle des Apicomplexa, pourrait apporter des éléments concernant la différenciation chez les Protozoaires en général.

D) Le processus d'interconversion tachyzoïte / bradyzoïte

1) Interconversion et pathogenèse

L'infection initiale et la phase aiguë de la maladie sont caractérisées par la présence dans l'organisme des tachyzoïtes, formes invasives à multiplication rapide. Dix à quatorze

jours après l'infection, les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes, forme de résistance à multiplication lente formant des kystes dans les tissus de l'hôte.

Les kystes tissulaires persistent à vie chez l'hôte et ne sont pas associés à la maladie. Cependant, chez les personnes présentant une immunodéficience due au SIDA ou au cancer, la rupture des kystes et la transformation des bradyzoïtes en tachyzoïtes entraîne une réactivation de la maladie. De plus, les individus infectés *in utero* présentent un risque de réactivation répétée, notamment au niveau cérébral ou oculaire. A ce jour, il n'existe aucun traitement permettant l'élimination des kystes tissulaires et donc aucun moyen d'éliminer le risque d'une éventuelle réactivation. Le dépistage de la réactivation toxoplasmique est encore à l'étude et les patients immunodéprimés subissent donc généralement un traitement prophylactique dirigé contre la phase aiguë de la maladie. Ce traitement, généralement une combinaison d'anti-folates (par exemple, pyriméthamine et sulfadiazine), est très mal toléré par les patients et de nombreux cas d'allergie sont répertoriés.

L'interconversion tachyzoïte / bradyzoïte joue non seulement un rôle pivot dans l'établissement de l'infection chronique mais elle est également responsable de la réactivation de la maladie. Une meilleure caractérisation du phénomène d'interconversion permettrait de trouver de nouvelles drogues capables d'éliminer les kystes tissulaires.

2) Interconversion et virulence

Les différentes souches de toxoplasmes sont classées essentiellement en fonction de leur virulence dans le modèle murin, généralement corrélée avec leur temps de génération. Seules les souches avirulentes vont produire massivement des kystes dans le cerveau des souris infectées.

Une souche est considérée comme virulente lorsqu'un seul tachyzoïte injecté par voie intrapéritonéale chez la souris équivaut à une dose létale 100% (DL_{100}). Ce type de souche se multiplie rapidement et ne produit que rarement des formes kystiques. Pour une souche avirulente, la DL_{50} est supérieure ou égale à cent parasites chez la souris, la multiplication est plus lente, l'infection chronique est généralement établie et des kystes peuvent se former spontanément *in vitro*.

Les souches virulentes forment une population clonale (Sibley et Boothroyd, 1992). Leurs profils RFLP (« Restriction Fragment Length Polymorphism ») sont homogènes (Sibley *et al.*, 1992). Les souches avirulentes produisent deux types de profils RFLP (Sibley *et al.*, 1992).

Toxoplasma gondii rassemble trois types de lignées (Howe et Sibley, 1995) : les souches de génotype I, II et III. Les souches de type I sont les souches virulentes (comme la souche RH, largement utilisée en laboratoire) et représentent moins de 10% des souches rencontrées dans la nature. Ces souches de type I sont uniformément létales dans les souris. Les souches de type II, kystogéniques (comme la 76K), sont prépondérantes dans les isolats humains (81%). Elles seraient responsables de la quasi-totalité des toxoplasmoses en France métropolitaine. Les souches de type III sont également des souches kystogéniques, associées aux infections animales.

Les différents types de souches ne diffèrent que de 1% génétiquement (Howe et Sibley, 1995). Des croisements génétiques entre une souche de type I et une souche de type III ont été réalisés afin d'identifier les loci génétiques responsables de la virulence (Su *et al.*, 2002). Les phénotypes des descendants du croisement ont été analysés par cartographie par liaison génétique. Les résultats obtenus ont mis en évidence l'existence d'un locus majeur sur le chromosome VII, responsable de la virulence de 50% des descendants. Un autre locus mineur, lié au gène ROP1, a été identifié sur le chromosome IV. Ces deux loci sont conservés dans toutes les souches de type I.

3) L'interconversion tachyzoïte / bradyzoïte

Soumis à des conditions de stress environnementaux, le tachyzoïte d'une souche kystogénique va se différencier en bradyzoïte.

In vivo, certaines circonstances physiologiques peuvent jouer un rôle dans la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte : la présence d'oxyde nitrique (un inhibiteur des fonctions mitochondriales) ou un choc thermique. Des facteurs immunologiques tels que l'IFN- γ et le TNF- α induiraient également l'enkystement. La différenciation n'est pas un processus synchrone puisque tachyzoïtes, bradyzoïtes et des formes intermédiaires co-existent dans le cerveau des souris (Odaert *et al.*, 1996). Il a ainsi été montré que les protéines P36, P18 et P34 étaient des marqueurs précoces de la différenciation en bradyzoïtes (apparition dès 24H) alors que la P21 est un marqueur de bradyzoïte mature (apparition à partir du 7^{ème} jour) (Soète *et al.*, 1994 ; Gross *et al.* 1996). Récemment, il a été montré que l'isoforme ENO1 de l'énolase est le marqueur de différenciation le plus précoce mis en évidence à ce jour. En effet, ENO1 est exprimée dans le tachyzoïte en cours de conversion bien avant la P36, qui était considérée précédemment comme le marqueur le plus précoce du stade bradyzoïte (Ferguson *et al.*, 2002).

In vitro, des systèmes d'induction de la différenciation ont été développés dans les années 90. Des bradyzoïtes peuvent être obtenus par un traitement des cellules par l'IFN- γ (Bohne *et al.*, 1993), une élévation de pH (8,0) ou de température (43°C) (Soète *et al.*, 1994) ou encore par l'emploi d'inhibiteurs mitochondriaux tels que l'oligomycine et l'antimycine A (Bohne *et al.*, 1994) ou l'atovaquone, le myxothiazol et la roténone (Tomavo et Boothroyd, 1995). Plus récemment, un stress induit par l'élévation d'AMPc dans le milieu de culture a permis d'obtenir la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte (Kirkman *et al.*, 2001). Des études utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines spécifiques de stade ont montré que la conversion de stade *in vitro* est asynchrone dans une même vacuole parasitophore et qu'il existe une hiérarchie temporelle de l'expression des protéines spécifiques de bradyzoïte dans les tachyzoïtes en cours de conversion. Cette dernière observation est à corrélérer avec la co-existence dans une même culture des stades tachyzoïtes et bradyzoïtes et de stades intermédiaires (Soète *et al.* 1993).

La réactivation des kystes, c'est-à-dire la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes, et la reprise de la multiplication active ont lieu *in vitro* de manière spontanée. *In vivo*, c'est la déficience du système immunitaire qui permet cette réactivation, avec notamment la diminution des taux d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-12.

II) Expression protéique différentielle et régulation génique

Des changements morphologiques et moléculaires et des altérations du métabolisme sont associés à la conversion de stade entre les formes tachyzoïte et bradyzoïte (Ferguson et Hutchison, 1987 ; Denton *et al.*, 1996). Ces modifications incluent l'expression de protéines spécifiques du stade parasitaire, marqueurs du processus de différenciation. Cette expression protéique différentielle découle de la régulation de l'expression des gènes spécifiques de stade. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation n'ont pas encore été élucidés mais des recherches récentes ont mis en évidence de nombreux acteurs de ce processus.

1) Les protéines spécifiques de stade

Différentes approches ont permis l'identification de protéines exprimées spécifiquement selon le stade parasitaire : la production d'anticorps monoclonaux spécifiques (Gross *et al.*, 1995 ; Odberg-Ferragut *et al.*, 1996 ; Parmley *et al.*, 1994, 1995 ; Yang et Parmley, 1995, 1997), le développement d'un système de « gene trap » (Knoll et Boothroyd, 1998), les projets EST (Expressed Sequence Tag) (Wan *et al.*, 1996 ; Manger *et al.*, 1998) et

la caractérisation d'une banque soustractive enrichie en transcrits de bradyzoïtes (Yahiaoui *et al.*, 1999). Le tableau suivant présente une liste non exhaustive de protéines spécifiques de stade caractérisées à ce jour.

Stade	Protéine	Référence
Tachyzoïte	SAG1	Manger <i>et al.</i> , 1998
	SRS1-SRS3	Manger <i>et al.</i> , 1998
	SAG2A	Lekutis <i>et al.</i> , 2000
	SAG2B	Lekutis <i>et al.</i> , 2000
	LDH1	Yang et Parmley, 1997
	ENO2	Dzierszinski <i>et al.</i> , 1999
Bradyzoïte	SAG2C	Lekutis <i>et al.</i> , 2000
	SAG2D	Lekutis <i>et al.</i> , 2000
	SAG4A	Odberg-Ferragut <i>et al.</i> , 1996
	SAG5A	Spano <i>et al.</i> , 2002
	BSR4	Manger <i>et al.</i> , 1998
	LDH2	Yang et Parmley, 1997
	ENO1	Dzierszinski <i>et al.</i> , 1999
	BAG1	Bohne <i>et al.</i> , 1995
	BRP1	Schwarz <i>et al.</i> , 2005
	SRS9	Cleary <i>et al.</i> , 2002
	P21	Tomavo <i>et al.</i> , 1991

Un certain nombre de protéines spécifiques de stade identifiées sont des protéines de surface qui appartiennent aux familles de SAG1 ou SAG2. Les tachyzoïtes expriment à leur surface les protéines SAG1, SRS1-SRS2, SAG2A et SAG2B, absentes chez les bradyzoïtes, alors que les bradyzoïtes expriment spécifiquement les protéines SAG2C, SAG2D, SAG4A, SAG5A et SRS9. Les protéines de la famille SAG1 (regroupant SAG3, BSR4, les SRS et SAG5) sont caractérisées par une ancre GPI et seraient impliquées dans le processus d'invasion de la cellule, comme cela a été démontré pour SAG3 par exemple (Dzierszinski *et al.*, 2000).

De nombreuses protéines spécifiques de stade sont des enzymes de la glycolyse et de la synthèse d'amylopectine.

Le parasite possède en effet deux isoformes spécifiques d'énolase (Dzierszinski *et al.*, 1999, 2001), de lactate déshydrogénase (Yang et Parmley, 1997) et de glucose-6-phosphate isomérase (Dzierszinski *et al.*, 1999). Ces isoformes possèdent des propriétés enzymatiques différentes répondant aux modifications du métabolisme accompagnant la différenciation. Pour exemple, l'isoforme ENO1 de l'énolase exprimée chez le bradyzoïte présente une Vmax

plus lente que l'isoforme ENO2 du tachyzoïte, ce qui est concordant avec la vitesse de multiplication des deux stades.

Les enzymes impliquées dans la dégradation de l'amylopectine (α -glucosidase, R1 protein et α -amylase) sont spécifiques du stade bradyzoïte, alors que celles procédant à la synthèse de ce polysaccharide sont présentes dans les deux stades (Coppin *et al.*, 2005).

L'expression différentielle de ces protéines est la conséquence d'une régulation fine de l'expression de gènes spécifiques de stades. Ces dernières années, des travaux ont apporté des réponses préliminaires quant aux mécanismes moléculaires régissant cette régulation génique.

2) Régulation génique

Afin de s'adapter aux variations de leur environnement, de nombreux organismes ont recours au contrôle et à la régulation fine de l'expression de leurs gènes. L'étude du transcriptome de *T. gondii*, basée sur l'analyse sérielle de l'expression de gènes (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE), a révélé que le processus de différenciation entre les différents stades était associé à des modifications significatives de l'expression du génome (Radke *et al.*, 2005). Cette étude a d'ailleurs confirmé les résultats obtenus lors de l'analyse de mutants de la différenciation tachyzoïte / bradyzoïte (Singh *et al.*, 2002), à savoir l'induction hiérarchisée de gènes spécifiques.

La régulation génique s'opère le plus souvent au niveau transcriptionnel, via des motifs ADN (régulateurs cis) et de nombreux facteurs protéiques (régulateurs trans) permettant le recrutement de l'ARN polymérase. D'autres stratégies sont également employées pour réguler l'expression des gènes, notamment le remodelage de la chromatine grâce aux histones.

Le contrôle de l'expression des gènes chez *T. gondii* est un processus encore trop méconnu mais depuis quelques années, grâce au séquençage du génome de plusieurs Apicomplexa et au développement de nouvelles techniques, des éléments de réponse ont pu être apportés.

2.1) Régulation génique par les histones

Chez les Eucaryotes, l'expression des gènes peut être contrôlée par la position et la densité des nucléosomes sur les éléments cis des promoteurs. Les nucléosomes sont formés par les histones, protéines interagissant avec l'ADN. De récentes études ont montré

l'implication des histones dans la régulation fine de l'expression des gènes intervenant lors du processus de différenciation chez *T. gondii*.

L'architecture nucléaire de *T. gondii* présente en effet une organisation nucléosomale similaire à celle des Eucaryotes supérieurs. L'analyse du génome a mis en évidence l'existence de gènes codant pour des sous-unités d'histones très conservées, les protéines H2A, H2B, H3 et H4. Seul l'homologue du gène codant pour la sous-unité H1 n'a pu être identifié (Sullivan et Hakimi, 2006).

La régulation de l'expression des gènes par les nucléosomes s'effectue via la modification des histones : ces protéines peuvent notamment être méthylées, acétylées ou phosphorylées. Ces modifications altèrent l'interaction des histones avec l'ADN modifiant ainsi l'accessibilité et l'activité des promoteurs. La combinaison de ces modifications sur les histones constitue une sorte de code, le « code histone », pouvant être « lu » par d'autres protéines. Les modifications des histones sont effectuées par des enzymes spécifiques, et les homologues de leurs gènes ont pu être retrouvés dans le génome du toxoplasme.

✚ Acétylation des histones

L'acétylation des histones permet l'activation de la transcription tandis que la désacétylation l'inactive.

Des études récentes ont permis de caractériser chez *T. gondii* des protéines impliquées dans le processus d'acétylation / désacétylation des histones : l'acétyltransférase TgGCN5-A (Sullivan et Smith, 2000), et la désacétyltransférase TgHADC3 (Saksouk *et al.*, 2005). Une étude basée sur la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et utilisant des parasites transgéniques exprimant ces deux protéines étiquetées, a démontré l'implication du couple TgGCN5-A / TgHADC3 dans la régulation de l'expression des gènes spécifiques de stade (Saksouk *et al.*, 2005). En effet, les résultats obtenus ont montré que dans le stade tachyzoïte, TgGCN5-A est associée uniquement aux promoteurs des gènes spécifiques de ce stade (promoteurs hyperméthylés), activant leur expression, alors que TgHADC3 est associée uniquement aux promoteurs des gènes spécifiques du stade bradyzoïte (promoteurs hypométhylés), inhibant leur expression. Inversement, dans le stade bradyzoïte, les promoteurs des gènes spécifiques de tachyzoïtes sont hypométhylés alors que ceux des bradyzoïtes sont hyperméthylés. En revanche, les promoteurs des gènes constitutifs sont acétylés quelque soit le stade considéré. Ces résultats démontrent clairement l'implication des histones dans la régulation de l'expression des gènes chez *T. gondii*.

D'autres protéines impliquées dans l'acétylation des histones du toxoplasme ont également pu être identifiées et caractérisées (pour revue, Sullivan et Hakimi, 2006).

✚ Méthylation des histones

La méthylation des histones est également un processus permettant l'activation ou la répression de l'expression de gènes. La méthylation de l'histone H3 est en effet associée à l'activation des gènes chez *T. gondii*, dans les deux stades tachyzoïte et bradyzoïte (Saksouk *et al.*, 2005). Deux familles de protéines procédant à la méthylation des histones ont été identifiées chez le toxoplasme : ce sont les PRMTs (Protein Arginin Methyltransferases) et les HKMT (Histone lysine (K) Methyltransferases). Quelques-unes de ces protéines ont été caractérisées, tout comme deux enzymes procédant à la déméthylation des histones (pour revue, Sullivan et Hakimi, 2006).

2.2) Régulation génique transcriptionnelle

✚ Structure des promoteurs

Chez les Eucaryotes supérieurs, les promoteurs comportent des séquences cis activatrices telles que les boîtes TATA ou CAAT ou l'élément initiateur (Inr). A ces séquences vont s'associer des éléments trans activateurs spécifiques permettant la transcription du gène considéré.

Chez *T. gondii*, les éléments cis classiques des Eucaryotes ne sont pas conservés, exception faite de la présence de l'élément Inr au site d'initiation de la transcription du gène de la nucléoside triphosphate hydrolase (Nakaar *et al.*, 1998).

Très peu d'études de promoteurs ont été réalisées à ce jour et l'identification des éléments cis des promoteurs de *T. gondii* est assez sommaire. L'étude du promoteur du gène *sag1* a mis en évidence l'existence d'un élément cis constitué de six répétitions en tandem d'un motif de 27 pb, dont le motif central a été retrouvé dans d'autres promoteurs de gènes du toxoplasme (Soldati et Boothroyd, 1995). Notre laboratoire a procédé à une étude approfondie des promoteurs des gènes *eno1* et *eno2*, codant pour les émolases ENO1 et ENO2 exprimées spécifiquement selon le stade parasitaire (Kibe *et al.*, 2005). Ces promoteurs possèdent des éléments de réponse au stress (Stress Response Element, STRE), des éléments de choc thermique (Heat Shock Element, HSE) et d'autres éléments cis connus chez les Eucaryotes supérieurs. La présence de ces éléments de réponse au stress est en adéquation avec les techniques d'induction de la différenciation développées *in vitro* (choc thermique, pH basique, privation en CO₂...).

🚩 La machinerie transcriptionnelle

La transcription de l'ADN chez les Eucaryotes s'effectue grâce à trois complexes multi-enzymatiques, possédant chacun une ARN polymérase différente : l'ARN polymérase I pour la transcription des ARN ribosomiaux, l'ARN polymérase II pour la transcription de la plupart des gènes et l'ARN polymérase III pour la transcription des ARN de transfert.

Récemment, la plupart des orthologues des facteurs généraux de transcription associés à l'ARN polymérase II ont été prédits par HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) chez *Plasmodium falciparum* (Callebaut *et al.*, 2005). Jusqu'à lors, très peu de ces facteurs avaient été identifiés par les analyses classiques à cause de la richesse en bases A et T du génome de *Plasmodium*. Les résultats obtenus par HCA démontrent la similarité des machineries transcriptionnelles des Apicomplexa et des Eucaryotes supérieurs, contrairement à ce qui avait été avancé précédemment. L'étude HCA a notamment mis en évidence la grande sous-unité de TFIIA et certaines sous-unités de TFIID (TAF1, TAF2, TAF7 et TAF10), TFIID étant un complexe essentiel à la transcription chez les Eucaryotes. Toutefois, certains TAFs (TATA-binding protein associated factors) classiques possédant un domaine HFD (Histone Fold Domain) n'ont pu être prédits par HCA, suggérant une architecture du TFIID de *Plasmodium* différente du TFIID des Eucaryotes.

La comparaison des génomes de *Plasmodium falciparum* et de *Toxoplasma gondii* suite à ces études montre que le toxoplasme possède également une machinerie comparable à celle des Eucaryotes. Toutefois, certaines différences existent comme le confirment les travaux de Meissner et ses collaborateurs (Meissner *et al.*, 2005). En effet, la caractérisation de deux domaines artificiels transactivateurs de *T. gondii* a montré que ces domaines sont capables d'activer la transcription chez *Plasmodium falciparum* mais pas dans les cellules HeLa.

Des approches génétiques et biochimiques s'avèrent nécessaires pour identifier la totalité des protéines constituant la machinerie transcriptionnelle de *P. falciparum* et de *T. gondii*.

3) Les émolases de *Toxoplasma gondii*

3.1) Quelques rappels sur l'émolase

L'émolase ou 2-phospho-D-glycerate hydrolase procède à la déshydratation du 2-phosphoglycérate pour produire le phosphoénolpyruvate. C'est une enzyme active sous la forme de dimère, dont les sous-unités ont un poids moléculaire d'environ 45-48 kDa. La

présence de cations divalents (Mg^{2+} ou Mn^{2+}) est nécessaire à la stabilisation du dimère et à l'activité catalytique de l'enzyme.

L'énolase participe à la glycolyse, réaction cytoplasmique permettant la production d'ATP. La glycolyse est une voie métabolique quasiment universelle dans les systèmes biologiques. Les enzymes glycolytiques ont évolué lentement et la plupart possèdent des isoformes codées par un seul gène ou par des gènes distincts. Les isoenzymes permettraient de répondre aux variations dans les besoins énergétiques, selon les organismes ou les tissus.

3.2) Les deux isoformes d'énolase de *T. gondii*

En 1998, notre laboratoire a mis en évidence l'existence d'une isoforme d'énolase spécifique du stade bradyzoïte (ENO1), à partir d'une banque soustractive construite pour isoler les transcrits exprimés spécifiquement dans ce stade (Yahiaoui *et al.*, 1998). L'isoforme spécifique du tachyzoïte (ENO2) sera mise en évidence un an plus tard (Dzierszinski *et al.*, 1999).

Le transcrit et la protéine issus du gène *eno1* sont détectés uniquement chez le bradyzoïte alors que le transcrit et la protéine issus du gène *eno2* sont retrouvés uniquement chez le tachyzoïte (Dzierszinski *et al.*, 2001). Les deux stades tachyzoïte et bradyzoïte possèdent donc leur propre isoforme d'énolase, ce qui fait de ces enzymes glycolytiques des marqueurs de la différenciation parasitaire.

L'alignement des séquences primaires des deux isoformes avec les énolases de mammifères a mis en évidence l'existence d'un pentapeptide et d'un dipeptide supplémentaires chez *T. gondii* (Dzierszinski *et al.*, 1999), également mis en évidence chez *Plasmodium falciparum* (Read *et al.*, 1994). Ces insertions peptidiques sont en outre communes aux énolases de plantes. La superposition des structures tridimensionnelles des énolases ainsi que des analyses phylogénétiques ont montré que les énolases de *T. gondii* sont fortement homologues aux énolases de plantes (Dzierszinski *et al.*, 1999). La fonction de ces peptides a été élucidée par mutagenèse dirigée sur l'isoforme ENO1. La délétion du dipeptide seul n'affecte pas le K_m de l'énolase alors que la délétion du pentapeptide augmente cinq fois le K_m de l'enzyme par rapport aux valeurs obtenues avec l'enzyme native. La double délétion du dipeptide et du pentapeptide implique une augmentation de quinze fois le K_m , suggérant que ces deux boucles peptidiques sont fortement impliquées dans l'affinité de l'enzyme pour son substrat (Dzierszinski *et al.*, 2001).

Les caractéristiques principales des deux isoformes de l'énolase ont été étudiées grâce à la production de protéines recombinantes. Si leurs K_m sont identiques, ENO1 et ENO2

présentent des V_{max} différentes, ENO2 possédant une V_{max} trois fois plus élevée que celle d'ENO1. Ces résultats suggèrent que les deux isoformes ont la même affinité pour leur substrat, le 2-phosphoglycérate, mais que leur vitesse de réaction est différente. Ces études ont également montré que la température de dénaturation d'ENO1 est plus élevée que celle d'ENO2. Les différences observées reflètent l'adaptation métabolique et physiologique du bradyzoïte, forme latente de résistance : ENO1 est plus résistante à la température et possède une V_{max} inférieure à celle d'ENO2.

3.3) Régulation transcriptionnelle des gènes *eno*

Les deux gènes codant les deux isoformes d'énolase sont localisés sur le même chromosome et sont organisés en tandem (Kibe *et al.*, 2005). Les deux gènes sont sous le contrôle de deux promoteurs complètement différents, ne contenant aucun élément initiateur de transcription connu tel que la boîte TATA ou la boîte CCAAT. Les sites d'initiation de la transcription ont été cartographiés : le promoteur du gène *eno2* possède deux sites d'initiation de la transcription, alors que le promoteur du gène *eno1* en possède huit dont deux majeurs (Kibe *et al.*, 2005).

Les éléments cis-régulateurs de ces promoteurs ont pu être mis en évidence grâce à la réalisation de plusieurs constructions comportant les promoteurs plus ou moins délétés en fusion avec le gène rapporteur CAT. Les délétions dans le promoteur du gène *eno2* ont montré l'existence d'éléments cis-régulateurs positifs, c'est-à-dire permettant la transcription du gène *eno2* chez le tachyzoïte. Au contraire, des délétions dans le promoteur du gène *eno1* ont mis en évidence l'existence d'éléments cis-régulateurs négatifs, empêchant la transcription du gène *eno1* dans le stade tachyzoïte. Les tachyzoïtes transfectés avec les diverses constructions ont ensuite été soumis à une privation en CO₂, induisant la différenciation en bradyzoïtes. L'analyse du promoteur *eno2* dans ces conditions a montré qu'il existait deux sites de répression dans ce promoteur, suggérant que la régulation transcriptionnelle du promoteur *eno2* dans les bradyzoïtes est fondamentalement différente de celle existant dans les tachyzoïtes. Inversement, l'analyse du promoteur *eno1* entier dans les bradyzoïtes induits a montré une régulation transcriptionnelle positive du gène dans ces conditions.

Des expériences de retard sur gel ont mis en avant l'implication d'éléments trans-régulateurs se fixant sur le promoteur du gène *eno1*, notamment le STRE (Stress Response Element), rappelant les conditions de stress nécessaires à la différenciation en bradyzoïte. De nombreuses protéines se fixent également au promoteur du gène *eno2*.

3.4) Localisation nucléaire des émolases

Des expériences d'immunofluorescence indirecte réalisées *in vivo* à l'aide d'anticorps polyclonaux spécifiques d'ENO1 et d'ENO2 ont confirmé l'expression spécifique de stade des deux émolases. Ces études ont également mis en évidence la localisation nucléaire de ces enzymes glycolytiques, dans les parasites en cours de division (figure 9).

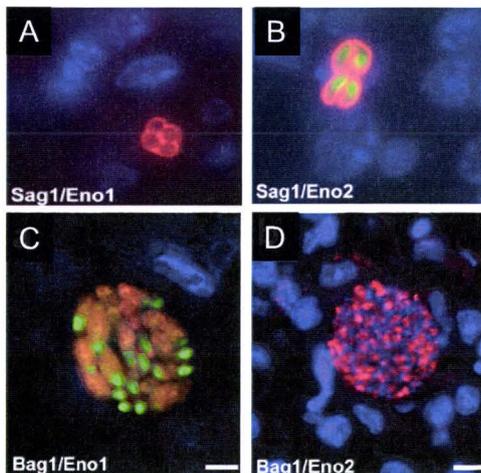


Figure 9 : Mise en évidence de la localisation nucléaire des émolases de *Toxoplasma gondii* *in vivo*

A : tachyzoïtes; double marquage SAG1 (surface) (rhodamine) et ENO1 (FITC)

B : tachyzoïtes; double marquage SAG1 (surface) (rhodamine) et ENO2 (nucléaire) (FITC)

C : bradyzoïtes; double marquage BAG1 (cytoplasmique) (rhodamine) et ENO1 (nucléaire et cytoplasmique)(FITC)

D : bradyzoïtes; double marquage BAG1 (cytoplasmique) (rhodamine) et ENO2 (FITC)

(D'après Ferguson *et al.*, 2002)

Cette localisation nucléaire a été confirmée par des études ultrastructurales immunocytochimiques et est corrélée à la répllication active du parasite (Ferguson *et al.*, 2002).

Il a également été observé que l'isoforme ENO1 apparaissait très précocement dans le tachyzoïte en cours de conversion (figure 10). En effet, des formes intermédiaires, présentant encore à leur surface l'antigène SAG1 spécifique du stade tachyzoïte, expriment ENO1 avant tout autre antigène spécifique de bradyzoïte connu. De plus, cette enzyme est observée dans le noyau de ces formes intermédiaires.

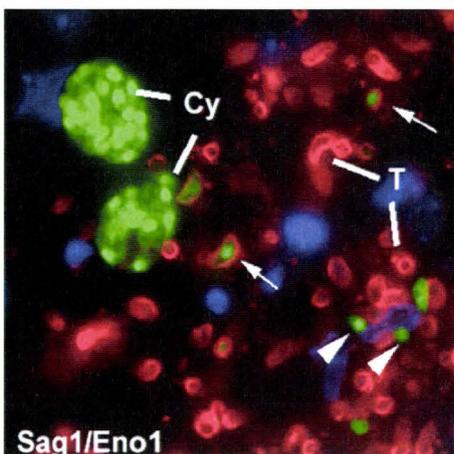


Figure 10 : Mise en évidence *in vivo* de l'expression précoce de l'isoforme ENO1 du bradyzoïte dans le noyau de tachyzoïtes en cours de conversion dans le cerveau de souris

Une double immunofluorescence SAG1 (rouge) / ENO1 (vert) a été réalisée sur une coupe de cerveau de souris 12 jours après l'infection.

On peut observer des kystes (Cy, pour cysts) contenant des bradyzoïtes présentant uniquement un signal nucléocytoplasmique pour ENO1. Des tachyzoïtes présentant uniquement un signal de surface pour SAG1 sont également observés. Au centre de la photographie, un tachyzoïte, exprimant SAG1 à sa surface, exprime déjà l'isoforme ENO1 du bradyzoïte, localisée au sein de son noyau.

(D'après Ferguson *et al.*, 2002)

Tous ces résultats suggèrent des fonctions nucléaires alternatives de ces enzymes glycolytiques au cours de la division du parasite mais aussi au cours du processus d'interconversion. Cette hypothèse est appuyée sur des travaux précédents réalisés sur l'énolase LOS2 d'*Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2002) et sur l'énolase humaine MBP-1 (Féo *et al.*, 2000). MBP-1 a été identifiée comme un répresseur transcriptionnel du promoteur du gène c-Myc, et LOS2 est également un répresseur transcriptionnel impliqué dans la régulation de la sensibilité au froid chez la plante. Le site de fixation nucléaire ainsi que le domaine de l'énolase impliqué dans cette fonction de régulation transcriptionnelle ont été identifiés chez l'Homme (Subramanian et Miller, 2000). L'énolase LOS2 des plantes se fixe à l'ADN sur des motifs similaires à ceux identifiés chez l'Homme (Lee *et al.*, 2002).

Les énolases de *T. gondii*, de par leur localisation nucléaire, pourraient également être des acteurs moléculaires dans la régulation transcriptionnelle ou dans toute autre fonction nucléaire. Les cibles nucléaires de ces deux énolases sont en cours d'identification dans notre laboratoire.

*Lors de ce travail, nous nous sommes notamment intéressés au mécanisme autorisant la localisation nucléaire de ces enzymes qui ne possèdent pas de signal de localisation nucléaire et qui ne peuvent diffuser librement vers le noyau. Récemment, il a été montré que la localisation nucléo-cytoplasmique de certaines protéines était modulée par une balance O-N-Acétyleglucosaminylation / phosphorylation (pour revues, Zachara et Hart, 2006 ; Guinez et al., 2006). Des études préliminaires de bioinformatique ont révélé la présence de sites potentiels de O-N-Acétyleglucosaminylation (O-GlcNAc) et de phosphorylation sur les énolases de *Toxoplasma gondii*, suggérant que leur localisation nucléaire pourrait être déterminée par une balance O-GlcNAc / phosphorylation.*

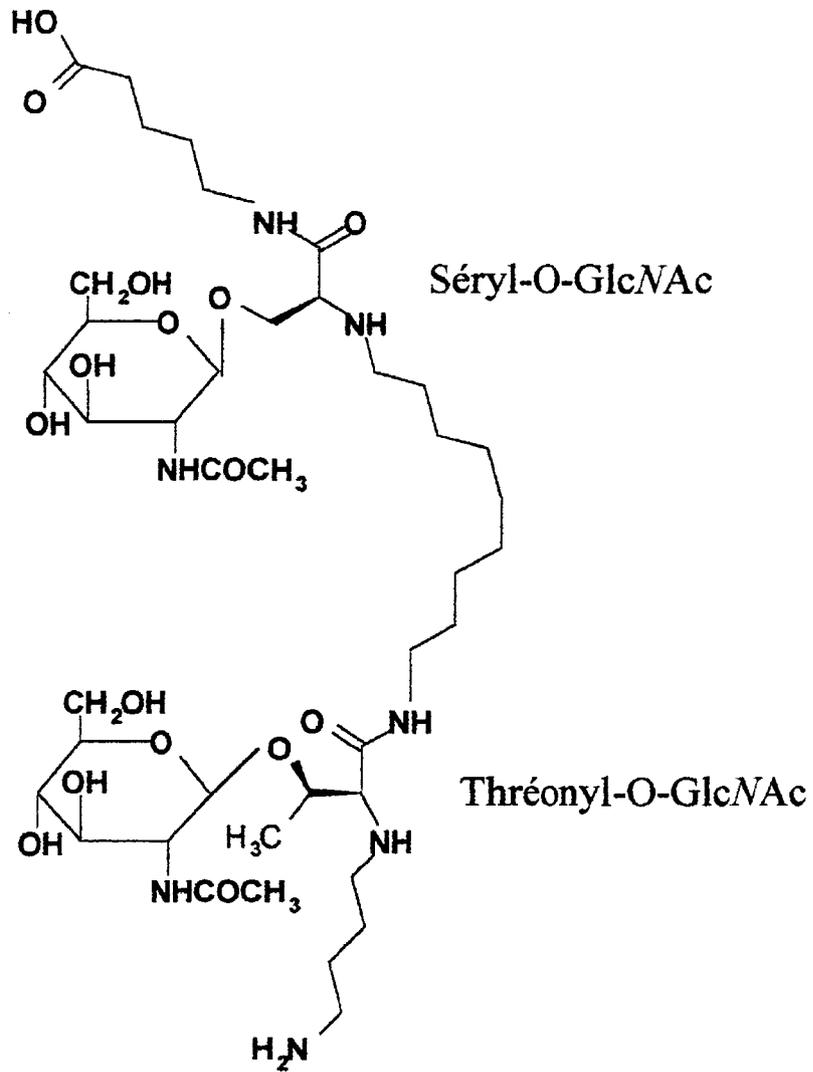
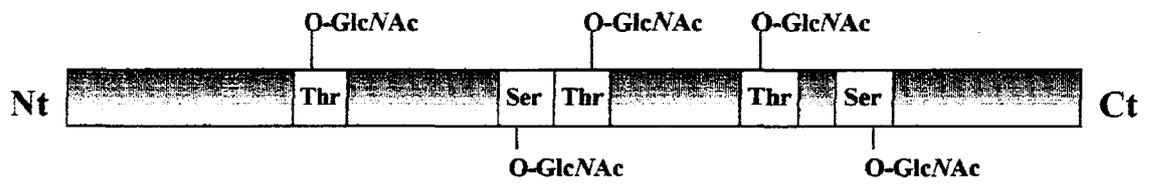


Figure 11 : Schémas de la O-N-Acétylglucosaminylation

Généralités troisième partie

La O-N-Acétylglucosaminylation

En 1984, Torres et Hart décrivent la présence de monosaccharides GlcNAc liés de manière O-glycosidique sur des protéines de surface et suggèrent que la majorité des protéines modifiées par la O-GlcNAc sont à l'intérieur de la cellule (Torres *et* Hart, 1984). Deux ans plus tard, Holt et Hart confirmeront l'existence de protéines nucléocytoplasmiques modifiées par la O-GlcNAc (Holt *et* Hart, 1986). Le dogme stipulant que seules les protéines de membranes ou sécrétées peuvent être modifiées par des glycosylations est ainsi réfuté. Cette découverte révolutionne le monde de la glycobiologie, d'autant plus qu'en 1991, Kears et Hart montrent que cette modification post-traductionnelle est à la fois abondante et dynamique, comme le processus de phosphorylation/déphosphorylation (Kears *et* Hart, 1991). Cette glycosylation est donc très différente des glycosylations classiques (*N*- et *O*-glycosylations) qui sont des structures figées sur les protéines.

L'engouement des scientifiques pour cette modification est immédiat et depuis 20 ans, les nombreuses études réalisées ont contribué à la caractérisation de la O-GlcNAc, des enzymes responsables de l'addition ou du retrait du monosaccharide sur les protéines mais également des fonctions possibles de cette glycosylation dans la vie cellulaire.

Après avoir présenté de manière générale la O-GlcNAc, nous décrirons les enzymes impliquées dans ce processus ainsi que leurs inhibiteurs connus. Le dernier paragraphe concernera les fonctions de cette glycosylation et plus particulièrement son rôle dans la modulation de la localisation subcellulaire des protéines.

I) Généralités

1) Définition

Ce type de glycosylation consiste en l'addition d'un unique monosaccharide, la *N*-Acétylglucosamine (GlcNAc), selon une configuration anomérique β (β -O-linked GlcNAc), sur des résidus sérine et thréonine de protéines nucléaires et cytoplasmiques (figure 11). Contrairement aux glycosylations conventionnelles, la O-GlcNAc n'évolue pas en structures complexes par le biais d'une élongation polysaccharidique. Cette glycosylation est très

conservée phylogénétiquement puisqu'on la retrouve chez l'Homme, les mammifères, les plantes, les bactéries et les virus (Hart *et al.*, 1996).

En 1993, une étude a démontré l'existence de la β -O-GlcNAc chez *Plasmodium falciparum* (Dieckmann-Schuppert *et al.*, 1993). Toutefois, l'enzyme putative caractérisée à partir d'un lysat parasitaire s'est révélée dépendante aux ions Mn^{2+} , contrairement aux O-GlcNAc transférases greffant des β -O-GlcNAc sur les protéines. De plus, le gène codant pour la O-GlcNAc transférase n'a pu être identifié dans le génome de *Plasmodium*. Chez *Trypanosoma cruzi*, des résidus O-GlcNAc ont également été mis en évidence mais l'anomérisation mise en évidence par RMN est une anomérie α (Previato *et al.*, 1998).

Ni l'enzyme O-GlcNAc transférase ni la O-GlcNAc elle-même n'ont été retrouvées chez la levure jusqu'à présent.

La O-GlcNAc présente de nombreux points communs avec la phosphorylation. Outre la modification spécifique des résidus sérine et thréonine, il s'agit d'un processus dynamique orchestré par des enzymes spécifiques et répondant rapidement à des stimuli extracellulaires. Comme la phosphorylation, la O-GlcNAc est essentielle à la vie cellulaire et de nombreuses expériences ont démontré son importance. Le blocage des sites O-N-Acétyleglucosaminylés par « capping » avec du galactose via une galactosyltransférase soluble (empêchant toute labilité du résidu O-GlcNAc), déclenche l'apoptose de la cellule dans les dix-huit heures, soulignant l'importance de la dynamique de cette glycosylation pour la cellule (Snow *et al.*, 1996). De plus, l'inactivation génique du locus unique du gène codant la O-GlcNAc transférase (l'enzyme greffant les GlcNAc sur les protéines) dans des cellules souches embryonnaires est létal, suggérant que la fonction de l'OGT est vitale pour la cellule chez les mammifères (Shafi *et al.*, 2000).

Depuis sa découverte en 1984, la O-GlcNAc a été mise en évidence sur de nombreuses protéines.

2) Les protéines O-GlcNAc

La O-GlcNAc est présente sur un grand nombre de protéines appartenant à des groupes fonctionnels très divers : kinases, phosphatases, protéines chaperonnes, protéines de structure, facteurs de transcription, protéines neuronales, protéines du cytosquelette et enzymes métaboliques (Zachara et Hart, 2006).

Les protéines appartenant au protéome O-GlcNAc sont généralement des phosphoprotéines et sont souvent des composants de complexes macromoléculaires tels que les complexes de transcription ou les pores nucléaires (Zachara et Hart, 2006).

3) Les sites O-GlcNAc

Il n'existe pas de séquence consensus propre à la O-GlcNAc mais l'analyse des sites glycosylés des protéines O-GlcNAc caractérisées a mis en évidence certaines exigences peptidiques et ces sites ont pu être classés en deux catégories (Ku *et* Omary, 1995) :

Les sites de type I sont des sites de type P-X1-X2-X3 où P est une proline et où le triplet X1-X2-X3 contient au moins un acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine) et un petit acide aminé aliphatique (valine, alanine, glycine) ou une autre proline. Les sérines et thréonines glycosylées sont parfois 4 ou 5 résidus après la proline (C-terminal) et sont rarement retrouvées à l'extrémité N-terminale de la proline. Il est à noter que certains sites correspondant au site de type I ne sont pas glycosylés, suggérant que d'autres facteurs que la séquence primaire déterminent la glycosylation d'un site (Haltiwanger *et al.*, 1997).

Les sites de type II ne contiennent pas de proline et sont très riches en sérine et/ou thréonine. Ces sites ne peuvent porter de O-GlcNAc que s'il existe dans la protéine concernée au moins un site de type I, qui n'est pas forcément modifié par un résidu O-GlcNAc. La O-GlcNAc transférase reconnaît d'abord un site de type I contenant une proline pour modifier les sérines et/ou thréonines des sites de type II accessibles dans la structure tridimensionnelle de la protéine.

II) Les enzymes de la O-GlcNAc

1) La O-GlcNAc transférase

1.1) Généralités

La O-GlcNAc transférase (uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine : polypeptide β -*N*-acetylglucosaminyltransférase) catalyse l'addition de la *N*-acetylglucosamine, à partir de l'UDP-GlcNAc, sur le groupe hydroxyl des résidus sérine ou thréonine des protéines cibles, selon une anomérie β .

Elle fut mise en évidence pour la première fois dans le foie de rat (Haltiwanger *et al.*, 1992) et décrite comme un complexe hétérotrimérique de 340 kDa comprenant deux sous-unités de 110 kDa et une sous-unité de 78 kDa. La sous-unité de 110 kDa possède le site actif de l'enzyme. L'activité de l'enzyme augmente avec la concentration d'UDP-GlcNAc et des études cinétiques utilisant un peptide issu d'une protéine O-GlcNAc (le CTD10mer de l'ARN polymérase II) ont montré que l'enzyme n'était jamais saturée par l'UDP-GlcNAc, même avec des concentrations dépassant largement les valeurs physiologiques (Comer et Hart,

2001). Le K_m apparent de l'enzyme est très bas (≈ 500 nM), ce qui implique une haute affinité de l'OGT pour son substrat, l'UDP-GlcNAc. Cette haute affinité donne à l'OGT un avantage compétitif vis-à-vis des transporteurs d'UDP-GlcNAc existant dans le réticulum endoplasmique et le Golgi et permettant de transférer l'UDP-GlcNAc du cytosol vers la lumière du réticulum endoplasmique (Haltiwanger *et al.*, 1992). Des données plus récentes ont démontré que l'OGT possède en fait un K_m variable pour l'UDP-GlcNAc (entre 0,05 μ M et 4,8 mM) (Kreppel et Hart, 1999). L'OGT possède donc une activité directement liée au taux d'UDP-GlcNAc, sucre-nucléotide dont la concentration change rapidement en réponse à des signaux environnementaux et nutritifs (Haltiwanger *et al.*, 1990). L'OGT semble donc capable de détecter les variations de concentration de l'UDP-GlcNAc puis de transmettre l'information aux protéines appartenant aux réseaux de régulation cellulaire.

L'OGT est une protéine hautement conservée (Iyer et Hart, 2003) et porte des modifications post-traductionnelles. En effet, l'OGT est modifiée par la O-GlcNAc et est reconnue par des anticorps anti-phosphotyrosines. Les sites modifiés ne sont pas encore connus à ce jour et l'implication de ces modifications sur l'activité de l'enzyme n'a pas encore été élucidée (Kreppel *et al.*, 1997).

1.2) Gène

L'organisation génomique de l'OGT est très conservée chez les Mammifères. Le gène humain codant l'enzyme est localisé sur le chromosome X (Xq13.1), s'étend sur 43 kb et contient 23 exons (Nolte et Muller, 2002). Des isoformes multiples de l'OGT sont générées à partir de la copie unique du gène, grâce à un processus d'épissage alternatif combiné à l'existence de plusieurs codons start (Hanover *et al.*, 2003) (figure 12). Trois isoformes majeures ont été identifiées, et ont été nommées selon leur localisation subcellulaire : ncOGT (nuclear/cytoplasmic) (116 kDa), mOGT (mitochondrial) (103 kDa) et sOGT (short isoform) (70 kDa). Ces 3 isoformes possèdent des parties N-terminales différentes mais des parties C-terminales identiques.

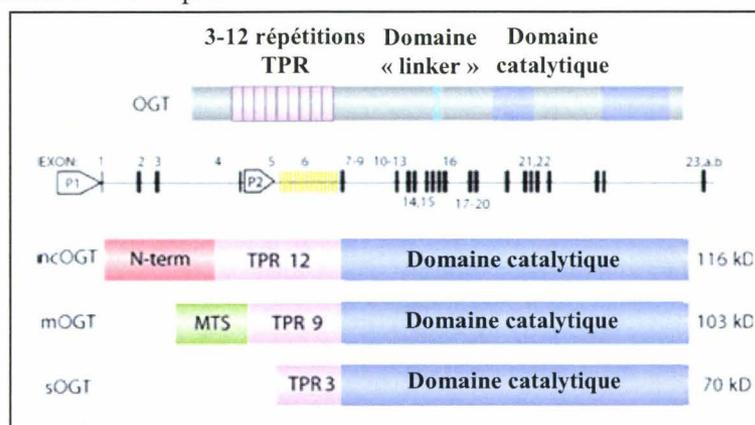


Figure 12 : Structure de la O-GlcNAc transférase (d'après Love et Hanover, 2005)

L'OGT possède 3 à 12 répétitions TPR, un domaine « linker » et un domaine catalytique très conservé. L'OGT est codée par un gène unique situé sur le chromosome X. Les 23 exons sont représentés ainsi que les trois isoformes issues de l'épissage alternatif.

Chez les plantes, deux gènes codant pour des protéines homologues à l'OGT ont été identifiés. Ces protéines sont les protéines SPY (SPINDLY) et SEC (Secret Agent). L'activité transférasiq ue de résidus GlcNAc de la protéine SPY a été démontrée grâce à la production de la protéine recombinante dans les baculovirus (Thornton *et al.*, 1999). De plus, des mutations du gène *spy* conduisent à une diminution des taux de protéines de O-GlcNAc. En outre, la double délétion des deux gènes *spy* et *sec* est létale, ce qui rappelle les résultats obtenus avec la délétion du gène de l'OGT dans les cellules souches embryonnaires de souris (Hartweck *et al.*, 2002).

1.3) Structure

L'organisation de l'OGT est assez conservée dans tous les organismes possédant cette enzyme. La molécule possède un domaine en N-terminal contenant un signal d'adressage, un domaine TPR (Tetratricopeptide Repeats), une région centrale faisant office de « lien », et enfin un domaine en C-terminal porteur du domaine catalytique de l'enzyme (figure 12).

La partie N-terminale de la protéine semble déterminante pour la localisation subcellulaire des différentes isoformes chez l'Homme (Love *et al.*, 2003). La partie N-terminale de la mOGT possède une courte séquence d'adressage à la mitochondrie suivie d'un domaine membranaire en α -hélice (localisation dans la membrane interne de la mitochondrie). Les deux autres isoformes, ncOGT et sOGT, sont nucléocytoplasmiques et ne possèdent pas ce signal. Ces multiples isoformes, de par leur différence de localisation subcellulaire, font que l'OGT interagit avec une multitude de substrats et permet la transmission des signaux dans tous les compartiments cellulaires.

Un motif TPR est une répétition de 34 acides aminés contenant la séquence consensus W-L-G-Y-A-F-A-P. Ce motif est retrouvé dans une large gamme de protéines, de la bactérie aux humains, et est impliqué dans de nombreux processus biologiques. Le domaine TPR de l'OGT facilite les interactions de l'enzyme avec les divers substrats mais aussi l'interaction entre les différentes sous-unités du complexe enzymatique. Ce domaine TPR est constitué de 3 à 12 répétitions selon les différentes isoformes de l'OGT. La structure du domaine TPR de la ncOGT a montré que ce domaine TPR est homodimérique (interactions hydrophobiques) et contient 11.5 répétitions TPR formant une superhélice allongée (Jinek *et al.*, 2004). La surface concave de cette superhélice comporte des asparagines très conservées permettant à l'OGT d'interagir avec les substrats (Jinek *et al.*, 2004). La mOGT et la sOGT possèdent 9 et 3 répétitions TPR, respectivement. Récemment, il a été démontré que le nombre de répétitions TPR détermine la spécificité de substrat de l'enzyme (Lazarus *et al.*, 2006). La sOGT qui ne

possède que 3 répétitions TPR ne présente pas d'activité de glycosylation (Lazarus *et al.*, 2006).

Le domaine central de l'OGT est un lien flexible entre le domaine TPR et le domaine catalytique de l'enzyme. Cette région est la plus divergente dans l'OGT, que ce soit en terme de longueur ou en séquence d'acides aminés.

Le domaine C-terminal de l'OGT comporte deux domaines conservés, CD I et CD II (Conserved Domain), retrouvés dans la plupart des glycosyl-transférases. Ces deux domaines sont des motifs de type Rossman, signant l'appartenance de l'OGT à la superfamille des Glycogène Phosphorylase GlycosylTransférases (Wrabl et Grishin, 2001). Le CD I de l'OGT est le site catalytique à proprement dit, puisqu'il est le site de fixation de l'UDP-GlcNAc. Le CD II est un domaine de type lectine, impliqué dans la reconnaissance spécifique du sucre GlcNAc. L'activité catalytique de ce domaine C-terminal de l'OGT a été démontrée par des délétions de ce domaine, détruisant l'activité enzymatique de la protéine (Lubas et Hanover, 2000). Des mutants site-spécifiques ont révélé l'existence de résidus catalytiquement essentiels entourant le site unique de fixation de l'UDP-GlcNAc (Lazarus *et al.*, 2005).

2) La O-GlcNAcase

2.1) Généralités

La O-GlcNAcase (β -O-linked N-acetylglucosaminidase) est une enzyme nucléocytoplasmique de 130 kDa qui retire de manière spécifique les résidus O-GlcNAc des protéines. C'est une enzyme très conservée de *C. elegans* aux Mammifères. Elle fut d'abord identifiée comme une hyaluronidase associée au méningiome et fut nommée MGEA5 (meningioma expressed antigen 5) (Heckel *et al.*, 1998). Le gène *mgea5* est situé sur le chromosome X (q24.1-q24.3). Un épissage alternatif du gène génère au moins deux transcrits. L'isoforme la plus longue a été désignée comme étant la O-GlcNAcase et possède en plus de son activité O-GlcNAcase une activité histone acétyltransférase (HAT) (Toleman *et al.*, 2004). Cette isoforme a été récemment rebaptisée NCOAT pour Nuclear and Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyltransferase. L'isoforme la plus courte (protéine de 75 kDa) possède uniquement une activité O-GlcNAcase et est localisée seulement dans le noyau (Comtesse *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2006).

2.2) Structure et domaines fonctionnels

La NCOAT possède deux domaines fonctionnels séparés par une séquence « linker ».

La partie N-terminale de la NCOAT est faiblement homologue à un domaine hyaluronidase (Heckel *et al.*, 1998). La structure secondaire de ce domaine est constituée d'une alternance d'hélices α et de feuillets β . Les feuillets β forment un tonneau interne protégé par les hélices α (Schultz et Pils, 2002).

La partie C-terminale, homologue des acétyltransférases de la famille GCN5, possède une activité acétyltransférase dont la fonctionnalité a été vérifiée par des études enzymatiques *in vitro* (Schultz et Pils, 2002 ; Toleman *et al.*, 2004). Récemment, il a été démontré que l'OGT et la NCOAT formaient un complexe appelé O-GlcNAczyme au sein duquel les deux enzymes participent au processus de remodelage de la chromatine associé à la répression transcriptionnelle via l'activité histone désacétylase (HDAC) de l'OGT et l'activité histone acétyltransférase (HAT) de la NCOAT (Yang *et al.*, 2002 ; Whisenhunt *et al.*, 2006).

La partie centrale de la NCOAT possède un site de clivage de la caspase 3. Lors de l'induction de l'apoptose, la O-GlcNAcase est clivée par la caspase : l'enzyme garde intacte sa fonction de O-GlcNAcase mais la partie possédant le domaine acétyltransférase est perdue. Il a été supposé que cette partie acétyltransférase est transférée dans le noyau pour acétyler les protéines nucléaires telles que les histones. Le clivage de l'enzyme pourrait déréguler son activité O-GlcNAcase, ce qui va dans le sens du processus d'apoptose.

3) Les inhibiteurs

Très peu d'inhibiteurs des enzymes de la O-GlcNAc ont été identifiés à ce jour. La découverte d'inhibiteurs spécifiques et réversibles de ces enzymes permettrait de mieux comprendre le rôle de ces protéines essentielles dans la régulation de nombreux processus cellulaires.

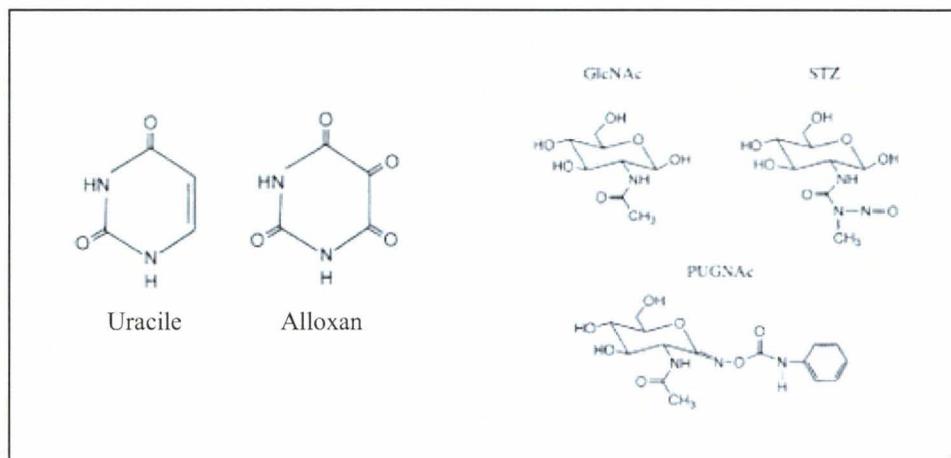


Figure 13 : Formules chimiques des inhibiteurs des enzymes de la O-GlcNAc

3.1) Les inhibiteurs de l'OGT

Les inhibiteurs de l'OGT conduisent à une diminution du taux de protéines O-GlcNAc.

Le premier inhibiteur de l'OGT décrit est l'alloxan, un analogue de l'uracile (Konrad *et al.*, 2002) (figure 13). Des tests *in vitro* sur l'OGT recombinante ont montré que l'alloxan inhibe l'enzyme à partir d'une concentration de 0,1 mM. L'inhibition est complète pour une concentration de 1 mM. L'alloxan entre probablement en compétition avec l'UDP-GlcNAc au niveau du site actif de fixation du sucre-nucléotide, suggérant une inhibition peu spécifique. De plus, son effet sur les autres types de glycosylation n'a pas été étudié.

Un autre inhibiteur de l'OGT, le vanadate, a récemment été identifié (Marshall et Okuyama, 2004). Le vanadate inhibe spécifiquement l'OGT à une concentration de 2 μ M et n'affecte pas l'activité d'une enzyme similaire à l'OGT, l'UDP-galactosyltransférase. Les OGT nucléaires et cytoplasmiques semblent ne pas posséder la même sensibilité au vanadate (l'OGT cytoplasmique est plus sensible). Le vanadate est un inhibiteur des tyrosines phosphatases. Deux mécanismes d'action de la drogue peuvent être avancés. D'une part, l'OGT porte des phosphotyrosines donc le vanadate, en inhibant les tyrosines phosphatases, modifierait les modifications post-traductionnelles de l'OGT et par ce biais l'activité de l'enzyme. D'autre part, il a été montré que l'OGT était associée à la PP1, une phosphatase pouvant être inhibée par le vanadate. Le mécanisme exact d'action du vanadate reste à élucider.

De nouveaux inhibiteurs de l'OGT ont été identifiés en 2005 par HTS (High-Throughput Screening) mais ils n'ont pas encore été testés (Gross *et al.*, 2005).

3.2) Les inhibiteurs de la O-GlcNAcase

Deux inhibiteurs principaux de la O-GlcNAcase ont été identifiés (figure 13).

Le mieux caractérisé est le O-(2-acetamido-2-deoxy D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc) (Haltiwanger *et al.*, 1998). C'est un inhibiteur spécifique non toxique dont l'utilisation amène à l'augmentation du taux de protéines O-GlcNAc dans les cellules traitées.

Un autre inhibiteur de la O-GlcNAcase est la streptozotocine, un analogue de la N-acétylglucosamine. Cet inhibiteur est irréversible et conduit à l'accumulation démesurée de protéines O-GlcNAc. Il a été montré que cette molécule avait un effet toxique sur les cellules, en provoquant notamment une alkylation de l'ADN (Gao *et al.*, 2000).

III) Les fonctions de la O-GlcNAc

1) Un simple monosaccharide et de nombreuses fonctions

L'addition dynamique de la O-GlcNAc sur les protéines est impliquée dans la modulation de la fonction protéique via différents mécanismes (Zachara et Hart, 2006) :

- ✓ La régulation de la phosphorylation sur les protéines,
- ✓ L'altération du processus de dégradation des protéines,
- ✓ La modulation des interactions protéine/protéine,
- ✓ La médiation de la transcription.

1.1) Régulation de la phosphorylation

Sur certaines protéines, la modification O-GlcNAc entre directement en compétition avec la phosphorylation, puisque les deux modifications peuvent être portées par le même résidu de manière réciproque (figure 14). L'hypothèse de la réciprocité entre les deux modifications est appuyée par une étude réalisée par Wells et ses collaborateurs, démontrant que l'OGT et la phosphatase 1 (PP1) forment un complexe (Wells *et al.*, 2004). Un exemple concret démontrant cette hypothèse est apporté par les travaux de Comer et Hart sur le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II. Des essais enzymatiques *in vitro* ont en effet révélé que l'addition d'un seul résidu de O-GlcNAc bloque l'addition de la phosphorylation et inversement, que l'addition d'un phosphate bloque l'addition de la modification O-GlcNAc (Comer et Hart, 2001).

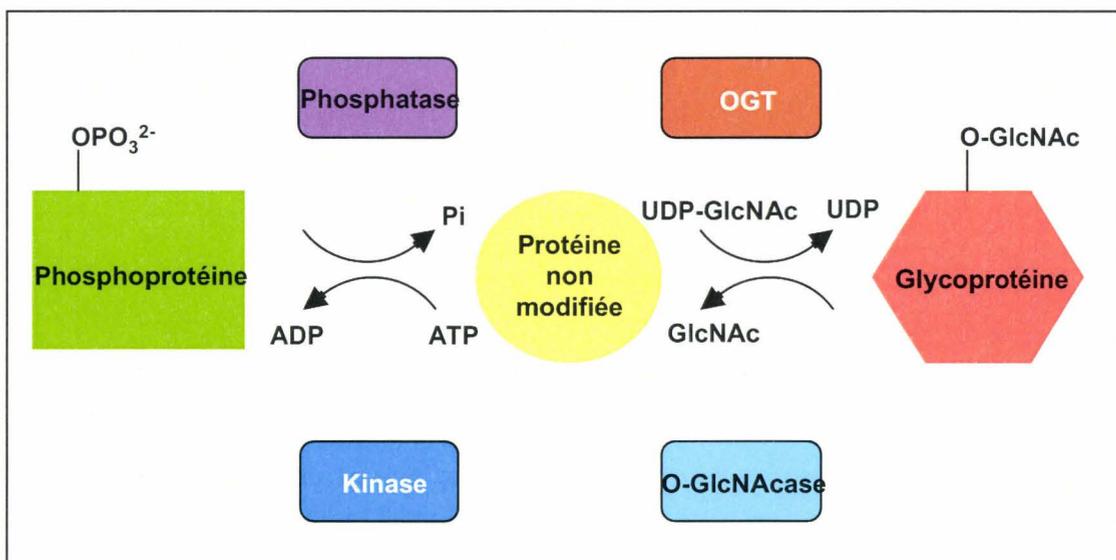


Figure 14 : Relation réciproque entre la O-GlcNAc et la phosphorylation sur les protéines

Dans ce modèle, la O-GlcNAc et la phosphorylation sont en compétition pour le même site (Ser ou Thr) et régulent ainsi de manière réciproque leurs taux respectifs.

D'après Zachara et Hart, 2006.

La panoplie de combinaisons possibles de résidus modifiés par la O-GlcNAc ou la phosphorylation sur une séquence protéique offre à la protéine la possibilité d'interagir avec différents substrats, d'activer ou inactiver ses propriétés enzymatiques ou de modifier sa localisation subcellulaire.

1.2) Dégradation des protéines

La O-GlcNAc altère le processus de dégradation des protéines de deux manières : en modifiant l'adressage des protéines vers le protéasome mais aussi en modifiant l'activité du protéasome.

Il a été montré que l'addition de O-GlcNAc sur ER- β (Estrogen Receptor) empêche la phosphorylation éventuelle de certains sites impliqués dans la dégradation de la protéine. La O-GlcNAc serait un signal de stabilité protéique. En effet, un mutant de ce récepteur présentant une phosphorylation constitutive a une demi-vie plus courte que le récepteur sauvage (Cheng et Hart, 2001).

Le facteur de transcription Sp1, lorsqu'il est hypoglycosylé, est rapidement dégradé via le protéasome. L'addition de glucosamine extracellulaire inhibe ce processus, ce qui suggère que la O-GlcNAc altère l'adressage de Sp1 vers le protéasome (Han et Kudlow, 1997).

De nombreuses protéines du complexe protéasomal sont modifiées par la O-GlcNAc. La modification par la O-GlcNAc de ces sous-unités du protéasome inhibe l'activité adénosine triphosphate du protéasome, empêchant ainsi la dégradation des protéines (Zhang *et al.*, 2003).

1.3) Modulation des interactions protéine/protéine

Le domaine SpE du facteur de transcription Sp1 est important pour l'association et la fixation au TAF110 (TATA-binding protein associated factor 110). La modification par la O-GlcNAc de SpE inhibe l'association et la fixation de Sp1 à TAF110 (Yang *et al.*, 2001).

La O-GlcNAc peut également réguler de manière positive les interactions protéine/protéine. STAT 5 fait partie de la famille des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), facteurs de transcription cytoplasmiques latents. Après activation hormonale, STAT5 est phosphorylée, se dimérise, migre dans le noyau et active la transcription de ses gènes cibles. Stat 5 est modifiée par la O-GlcNAc après son entrée dans le noyau, et cette modification est nécessaire à sa fixation au co-activateur transcriptionnel CBP (CREB-Binding Protein) (Gewinner *et al.*, 2004).

1.4) Médiation de la transcription

De nombreux facteurs de transcription sont modifiés par la O-GlcNAc et la transcription de nombreux gènes est régulée positivement ou négativement suite à des variations des concentrations extracellulaires du glucose ou de la glucosamine (Zachara et Hart, 2006).

Une diminution des taux de O-GlcNAc, par la sur-expression de la O-GlcNAcase ou par RNAi de l'OGT, a pour conséquence la diminution de la transcription de PAI-1 qui est contrôlée par Sp1. *A contrario*, l'augmentation des taux de O-GlcNAc par l'utilisation de PUGNAc augmente la transcription de PAI-1 (Goldberg *et al.*, 2006). Les contrôles de cette expérience ont montré que ni la fixation à l'ADN, ni la localisation nucléaire, ni le taux de Sp1 ne sont altérés, suggérant que la O-GlcNAc régule l'activation de la transcription par Sp1.

Il semblerait donc que la O-GlcNAc, via ses multiples fonctions, soit impliquée d'une manière générale dans la signalisation cellulaire.

Chez les mammifères, de nombreuses voies sont régulées par la O-GlcNAc, notamment la signalisation de l'insuline, le cycle cellulaire et la réponse au stress (pour revue, Zachara et Hart, 2006).

2) La O-GlcNAc, signal de translocation nucléaire des protéines cytosoliques ?

Parmi les différents rôles attribués à la O-GlcNAc, la fonction de signal de translocation nucléaire des protéines cytosoliques a été supposée. Le résidu O-GlcNAc pourrait intervenir de deux manières différentes dans le transport nucléaire :

- Soit par la O-N-Acétyleglucosaminylation des protéines du pore nucléaire (protéines identifiées O-GlcNAc), qui ferait alors plutôt partie de la machinerie de transport des protéines (Guinez *et al.*, 2005).
- Soit par la O-N-Acétyleglucosaminylation des protéines elles-mêmes. Dans ce cas, la O-GlcNAc serait considérée comme signal de transport.

2.1) Le transport nucléaire « classique » des protéines

Les échanges nucléocytoplasmiques

La compartimentation noyau/cytoplasme mise en place chez les Eucaryotes implique un système de transport efficace permettant aux molécules de transiter d'un compartiment à l'autre, c'est-à-dire de passer la double membrane nucléaire. Les ARNm, synthétisés dans le noyau, sont exportés vers le cytoplasme et les protéines synthétisées dans le cytoplasme sont importées dans le noyau. Ces échanges bi-directionnels sont assurés par des structures supramoléculaires, les NPC (Nuclear Pores Complexes), ancrées dans la bicouche lipidique constituant l'enveloppe nucléaire (pour revue, Kiseleva *et al.*, 2000).

Les protéines de masse moléculaire inférieure à 40 kDa pénètrent dans le noyau par simple diffusion passive à travers le pore nucléaire. Les protéines dont la masse moléculaire est supérieure à 40 kDa nécessitent un signal de translocation nucléaire, le NLS (Nuclear Localization Signal), ainsi que de l'énergie.

La voie NLS

Le premier NLS fut mis en évidence sur l'antigène Large T du SV 40 (Sieman Virus) (pour revue, Görlich et Mattaj, 1996). Il s'agit d'une séquence peptidique faisant partie intégrante de la protéine et riche en acides aminés basiques. Il n'existe pas de séquence consensus stricte.

La première étape du processus de transport nucléaire est NLS-dépendante et ATP-indépendante : au sein du cytoplasme, la protéine possédant le NLS s'associe avec les PTAC 58 et 97 (Pore TArgeting Complex) (Moore et Blobel, 1992) et le complexe ainsi formé s'ancre sur les pores nucléaires. La deuxième étape, dite de translocation, est NLS-indépendante et ATP-dépendante. Elle fait intervenir deux facteurs solubles : la GTPase Ran (petite protéine G) ; et le P10/NTF2 (Nuclear Transport Factor), associé à Ran-GDP/PTAC 58 et 97 et à des séquences peptidiques des nucléoporines (pour revue, Kiseleva *et al.*, 2000).

Les signaux non peptidiques d'adressage nucléaire

Brièvement, la localisation nucléaire d'une protéine peut être due à diverses modifications post-traductionnelles telles que la sumoylation (Pichler et Melchior, 2002), la O-phosphorylation (Hood et Silver, 1999) ou l'acétylation (Valacco *et al.*, 2006)).

L'équipe de Monsigny (Duverger *et al.*, 1993, 1995, 1996) a démontré que les résidus O-GlcNAc étaient impliqués dans la localisation nucléaire de néoglycoprotéines. En effet,

l'addition artificielle de résidus GlcNAc sur des protéines ordinairement cytoplasmiques induit leur translocation dans le compartiment nucléaire.

Récemment, plusieurs études ont apporté des éléments de réponse quant à l'implication de la O-GlcNAc dans la translocation nucléaire des protéines cytosoliques.

2.2) La O-GlcNAc, signal de translocation nucléaire ?

Il a été observé que les formes nucléaires de c-Myc, Tau et Sp1 portent plus de O-GlcNAc que leurs formes cytoplasmiques, suggérant un rôle de cette modification dans la localisation nucléaire de ces protéines.

L'exemple de c-Myc

c-Myc, le produit du proto-oncogène *c-myc*, est une protéine nucléaire impliquée dans la régulation transcriptionnelle au cours des processus de prolifération cellulaire et d'apoptose. Les modifications post-traductionnelles de cette protéine ont été largement étudiées : c-Myc peut être phosphorylée sur une douzaine de résidus Ser et Thr, notamment la Thr-58 et la Ser-62 situées dans le domaine TAD (Transcriptional Activation Domain), en N-terminal de la protéine (Kamemura et Hart, 2003). La Thr-58 est également le site majeur de la protéine à être modifié par la O-GlcNAc (Chou *et al.*, 1995). La Thr-58 peut donc être alternativement modifiée par la phosphorylation et la O-GlcNAc. Il a été montré que la mutation de la Thr-58 perturbe la translocation nucléaire de c-Myc, suggérant que l'alternance phosphorylation / O-GlcNAc de la Thr-58 modulerait le trafic subcellulaire de c-Myc (Kamemura et Hart, 2003).

L'exemple de Tau

La protéine Tau, protéine associée aux microtubules, est abondamment modifiée par la phosphorylation mais aussi par la O-GlcNAc. En 2003, Lefebvre *et al* ont montré qu'il existait une compétition entre la phosphorylation et la O-GlcNAc sur cette protéine, et que cette compétition avait des répercussions sur la localisation nucléaire de Tau (Lefebvre *et al.* 2003). En effet, l'hyperphosphorylation de Tau, impliquant une diminution de la glycosylation O-GlcNAc, diminue significativement le transport vers le noyau de la protéine. L'hypothèse émise suite à ce travail est qu'une balance phosphorylation/O-GlcNAc pourrait réguler la translocation nucléaire d'une protéine.

✚ L'exemple de Sp1

Le facteur de transcription Sp1 possède des résidus O-GlcNAc. L'utilisation de l'alloxan, inhibiteur de l'OGT, diminue la quantité de résidus O-GlcNAc sur Sp1, ce qui implique une redistribution partielle de cette protéine du noyau vers le cytoplasme. De plus, la sous-expression de l'OGT par siRNA entraîne la redistribution partielle de Sp1 dans le cytoplasme mais aussi celle de la phosphoprotéine alpha4, protéine nucléaire portant des O-GlcNAc (Dauphinée *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent donc que la O-GlcNAc joue un rôle dans la localisation nucléaire de Sp1.

✚ Le contre-exemple de Stat5

Il a été montré que Stat5 était modifié par la O-GlcNAc après son adressage dans le noyau, suggérant que sa localisation nucléaire est indépendante de la présence de O-GlcNAc (Gewinner *et al.*, 2004). De plus, chez *C. elegans*, l'invalidation génique de l'OGT n'a aucune conséquence sur la localisation nucléaire de nombreux facteurs de transcription modifiés par la O-GlcNAc (Hanover *et al.*, 2005).

Il semblerait donc que la O-GlcNAc puisse jouer un rôle dans la localisation subcellulaire des protéines, par le biais d'une balance O-GlcNAc / phosphorylation. Cette hypothèse a été la base du travail concernant l'étude du mécanisme permettant une localisation nucléo-cytoplasmique des deux émolases de T. gondii.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Problématique et objectifs

La toxoplasmose reste aujourd'hui une infection sévère chez les patients immuno-déprimés. Le processus d'enkystement et la réactivation parasitaire, les événements constituant l'interconversion de stade, sont au cœur de la pathogenèse. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant cette interconversion permettrait de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. L'élaboration de nouveaux traitements spécifiques permettant l'éradication des kystes de l'organisme infecté serait le meilleur moyen d'éviter la réactivation toxoplasmique.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont contribué à la caractérisation des acteurs moléculaires impliqués dans le processus d'interconversion. Les émolases de *Toxoplasma gondii* pourraient faire partie de ce panel de protéines permettant au parasite de changer de stade selon les conditions environnementales. En effet, ces protéines glycolytiques localisées au sein du noyau du parasite, à des moments-clés du cycle parasitaire, sont potentiellement impliquées dans la régulation de la transcription de gènes spécifiques, comme leurs homologues chez l'Homme et *Arabidopsis thaliana*. La présence très précoce de l'isoforme ENO1 du bradyzoïte dans le tachyzoïte en cours de conversion suggère un rôle potentiel de cette enzyme dans la régulation de l'expression des gènes spécifiques de stade. Au cours de ce travail, nous avons sur-exprimé de manière stable cette isoforme ENO1 dans le tachyzoïte, afin de mettre en évidence le rôle potentiel de cette protéine dans l'induction de la transcription des gènes spécifiques de bradyzoïte.

Chez l'Homme et chez *Arabidopsis thaliana*, le mécanisme permettant l'adressage au noyau des émolases n'a pas été élucidé. L'identification de ce processus permettrait d'inhiber la translocation nucléaire de l'enzyme glycolytique, et par là-même d'inhiber sa fonction nucléaire, ce qui pourrait potentiellement empêcher le processus d'interconversion. Nous avons donc entrepris d'élucider ce mécanisme au cours de la thèse. En nous basant sur des recherches bioinformatiques nous avons testé l'hypothèse d'une localisation nucléo-cytoplasmique due à une balance O-N-Acétyleglucosaminylation / phosphorylation sur les émolases.

RESULTATS

RESULTATS

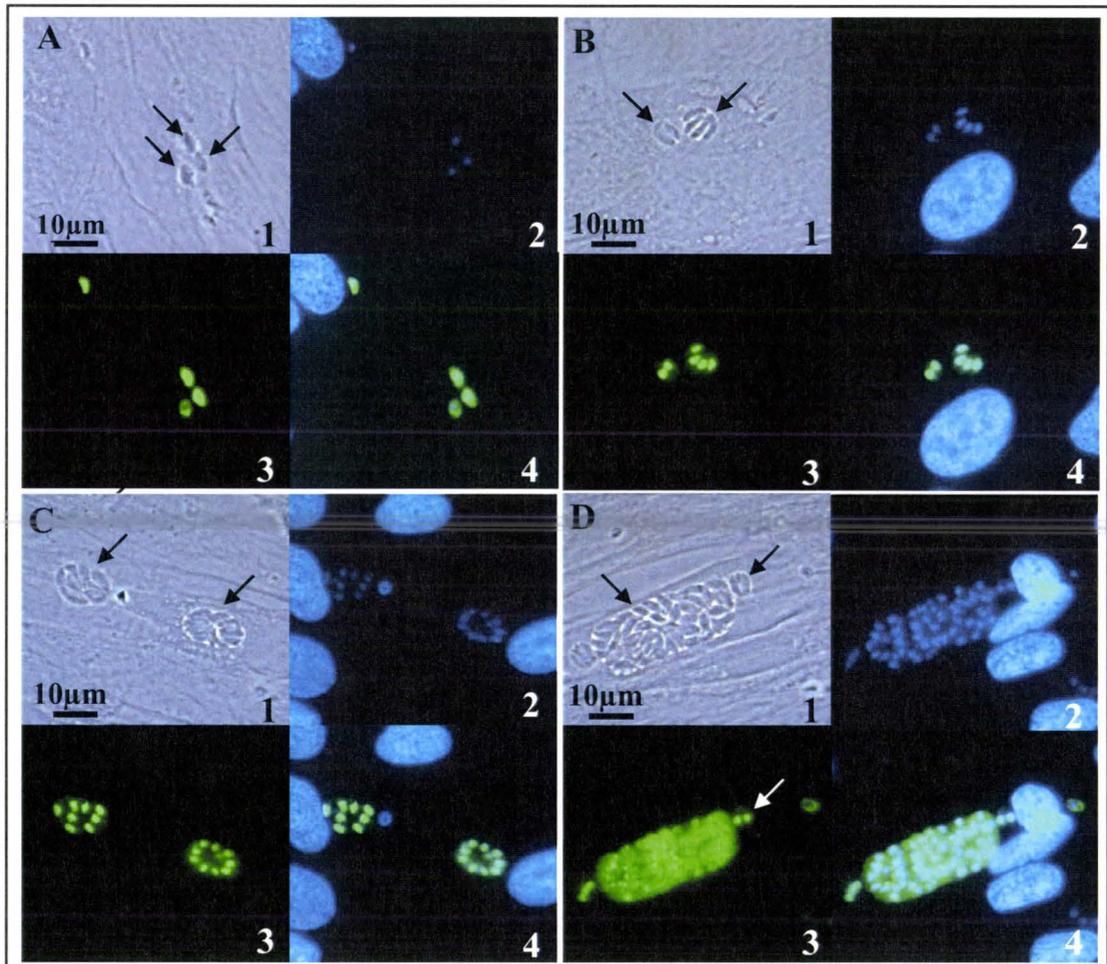


Figure 15 : ENO2 est adressée au noyau des tachyzoïtes pendant les stades précoces de la division.

Les tachyzoïtes se développent au sein de cellules HFFs (Human Foreskin Fibroblasts) pendant 4 heures (panneau A), 24 heures (panneau B), 32 heures (panneau C) ou 48 heures (panneau D) après l'infection. L'immunofluorescence a été réalisée avec un anticorps de lapin anti-ENO2 et un anti-lapin de chèvre conjugué au FITC. Les noyaux des cellules sont colorés au DAPI. Les lamelles sont observées avec un microscope Zeiss Axioplan et les images ont été prises avec une caméra.

1 : Photos en lumière blanche des tachyzoïtes intracellulaires; 2 : DAPI; 3 : FITC; 4 : superposition des images DAPI et FITC.

Résultats

I) Cinétique de la localisation subcellulaire d'ENO2 au cours de la division des tachyzoïtes

Afin de déterminer la localisation subcellulaire d'ENO2 dans le tachyzoïte en cours de division, de l'immunofluorescence indirecte a été réalisée comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes » à l'aide de l'anticorps α -ENO2. Quatre heures après l'invasion des cellules HFFs (figure 15A), les tachyzoïtes, qui ne se sont pas encore multipliés et qui sont seuls au sein de la vacuole (voir flèches noires), présentent un signal ENO2 faible et diffus localisé dans le cytoplasme. Le signal observé dans les tachyzoïtes 24 ou 32 heures après l'invasion (figure 15B et 15C) est très différent : dans les 2, 4 ou 8 tachyzoïtes intravacuolaires provenant de la division d'un seul tachyzoïte, on observe un signal intense fortement localisé dans le noyau des parasites en cours de division, ce qui est confirmé par la superposition du signal FITC avec le DAPI. On observe également un signal cytoplasmique faible, équivalent à celui observé dans les tachyzoïtes 4 heures après l'invasion. Le signal observé dans les tachyzoïtes 48 heures après l'invasion (figure 15D) est diffus et cytoplasmique dans tous les parasites contenus dans les vacuoles parasitophores. La flèche blanche montre un parasite issu d'une vacuole éclatée qui a envahi une nouvelle cellule hôte et a déjà commencé à se diviser (vacuole contenant deux parasites) : le signal ENO2 redevient nucléaire (flèche blanche, figure 15D, panel 3).

Ces observations montrent que l'énolase est adressée vers le compartiment nucléaire du parasite pendant les stades précoces de la division par endodyogénie.

Afin de démontrer avec certitude que le signal observé correspond effectivement à une reconnaissance spécifique de l'anticorps anti-ENO2, et non à une réaction croisée de l'anticorps avec une autre protéine nucléaire, nous avons décidé de produire des tachyzoïtes transgéniques exprimant de manière stable l'énolase ENO2 en fusion avec l'épitope HA. Nous avons également produit des tachyzoïtes exprimant de manière stable l'énolase ENO1 du bradyzoïte, également étiquetée avec l'épitope HA, afin d'étudier par la suite le rôle nucléaire de cette enzyme glycolytique que l'on retrouve dans le noyau des tachyzoïtes en cours de conversion dans le cerveau des souris infectées.

II) Réalisation des constructions plasmidiques p[Tub5-eno2HA-Sag1 // Tub5-bléo-Sag1] et p[Sag1-eno1HA-Sag1 // Tub5-bléo-Sag1]

Le détail des étapes des constructions est décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes ». Brièvement, les deux constructions réalisées sont des plasmides bi-fonctionnels permettant d'une part l'expression de la protéine marquée avec l'épitope HA (ENO1-HA ou ENO2-HA) et d'autre part la résistance à la bléomycine qui sera utilisée pour sélectionner les parasites ayant intégré dans leur génome la construction plasmidique. La figure 33 du chapitre « Matériels et Méthodes » décrit les étapes majeures de la stratégie de clonage.

Avant l'intégration de la cassette de résistance à la bléomycine à la construction, les deux plasmides ont été testés pour vérifier la bonne expression de la protéine étiquetée avec l'épitope HA et pour confirmer la localisation nucléaire des énoases. Pour cela, des tachyzoïtes de la souche 76K ont été transfectés de manière transitoire (plasmides circulaires). Une double immunofluorescence avec les anticorps α -HA et α -ENO2 a ensuite été réalisée pour les tachyzoïtes transfectés avec la construction eno2-HA (figure 16, A et B). Pour les parasites transfectés avec la construction eno1-HA, une double immunofluorescence avec les anticorps α -HA et α -GRA2 a été réalisée (figure 16, C et D).

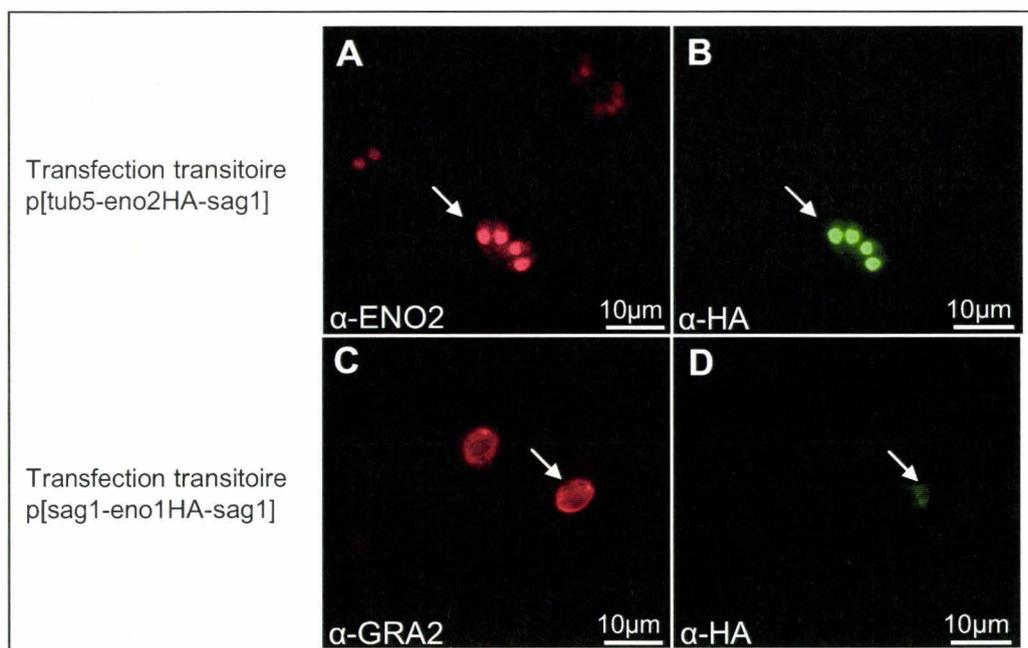


Figure 16 : Transfection transitoire de tachyzoïtes 76K avec les plasmides p[tub5-eno2HA-sag1] et p[sag1-eno1HA-sag1]

Des cellules HFF cultivées sur des lamelles sont infectées avec des parasites ayant été transfectés avec les plasmides sous forme circulaire. Le tapis cellulaire est fixé 24H après l'infection et une double immuno-fluorescence α -ENO2 ou α -GRA2 et α -HA est effectuée. Les lamelles sont alors observées au microscope à fluorescence.

L'image 16A montre que tous les tachyzoïtes présents dans le champ observé sont positifs pour le signal ENO2 (rouge). Le signal ENO2 observé est un signal nucléaire, ce qui valide notre première expérience. Parmi les quatre vacuoles contenant des tachyzoïtes positifs pour ENO2, une seule (voir flèche blanche) présente des tachyzoïtes positifs pour le signal nucléaire ENO2-HA (vert) (image 16B). Ces tachyzoïtes sont issus d'un seul parasite ayant intégré dans son noyau la construction p[Tub5-eno2HA-Sag1], contrairement aux parasites ayant généré les vacuoles avoisinantes. Il est à noter que le signal nucléaire ENO2 est beaucoup plus intense dans les parasites ENO2-HA positifs par rapport aux parasites n'exprimant que l'énolase endogène. L'image 16C montre le signal GRA2 (rouge) marquant l'intérieur des vacuoles parasitophores. Sur les deux vacuoles observées en 2C, une seule (flèche blanche) contient des tachyzoïtes positifs pour le signal nucléaire ENO1-HA (vert), tachyzoïtes ayant reçu la construction p[sag1-eno1HA-sag1]. On peut noter que l'énolase ENO1 transgénique se comporte comme l'énolase ENO2 dans le tachyzoïte puisqu'on la retrouve également dans le noyau des parasites en division. On remarque que le signal HA dans les parasites transfectés avec la construction p[sag1-eno1HA-sag1] est beaucoup plus faible que celui observé pour les parasites transfectés avec la construction p[tub5-eno2HA-sag1]. Cette différence d'intensité de signal est en adéquation avec la force des deux promoteurs sag1 (ENO1) et tub5 (ENO2) utilisés pour les deux constructions plasmidiques.

Nous avons donc montré que le signal nucléaire précédemment publié par notre laboratoire (Ferguson et al., 2002) et confirmé dans la première expérience (figure 15), n'était pas du à une réaction croisée des anticorps polyclonaux utilisés mais bien à la présence des émolases dans le noyau des parasites.

L'expression des enzymes étiquetées avec l'épitope HA a également été validée. Nous avons donc ajouté aux constructions plasmidiques une cassette de résistance à la bléomycine dans le but de sélectionner des parasites transgéniques ayant intégré dans leur génome les vecteurs et exprimant de manière stable les émolases étiquetées avec l'épitope HA.

III) Obtention des parasites transgéniques

Les deux constructions plasmidiques eno1-HA et eno2-HA possédant la cassette de sélection à la bléomycine sont linéarisées par digestion avec l'enzyme de restriction KpnI

Première transfection



Deuxième transfection

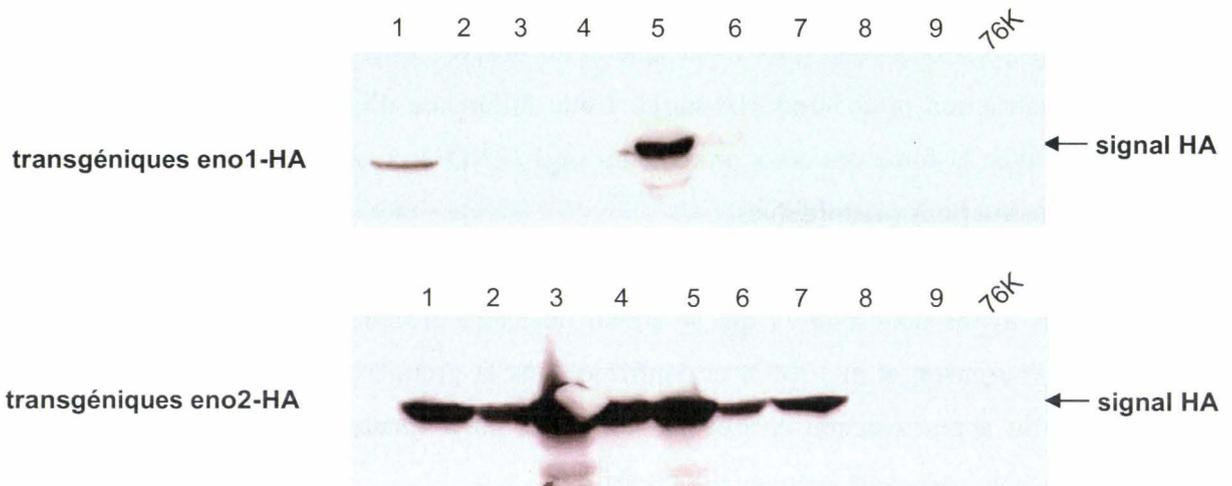


Figure 17 : Criblage par immuno-empainte α -HA des parasites transgéniques stables

Deux expériences indépendantes ont été réalisées afin d'obtenir avec certitude des clones différents pour chaque construction plasmidique. Après clonage en plaques 96 puits, les parasites transfectés sont amplifiés sur boîtes de culture 25 cm² puis purifiés pour analyse en immuno-empainte α -HA.

afin de réaliser la transfection stable de la souche 76K. Après plusieurs sélections à la bléomycine, les parasites sont clonés, amplifiés puis criblés par immuno-empreinte α -HA pour sélectionner les clones exprimant ENO-HA (figure n°17) et éliminer les éventuels faux-positifs. Deux expériences indépendantes ont été réalisées afin d'obtenir avec certitude deux clones transgéniques différents pour chaque construction. Selon l'expérience, le rendement de clones positifs s'est révélé très variable. En effet, pour la première transfection réalisée, nous avons obtenu 88% de clones ENO1-HA positifs et 100% de clones ENO2-HA positifs. Lors de la deuxième transfection, seulement 22% des clones eno1-HA et 77% des clones eno2-HA se sont révélés positifs. Un clone de chaque expérience et pour chaque construction a donc été choisi pour notre étude.

IV) Mise en évidence d'une migration différentielle des énolasses endogènes et des énolasses transgéniques ENO-HA en SDS-PAGE

Les quatre clones sélectionnés sont déposés dans un gel d'acrylamide à 7,5%, à raison de 5 millions de parasites pour les transgéniques eno2-HA et de 10 millions de parasites pour les transgéniques eno1-HA. Cinq millions de tachyzoïtes 76K et 500 kystes contenant des bradyzoïtes sont également déposés comme échantillons témoins. Les dépôts sont réalisés en double afin de réaliser deux immuno-empreintes après transfert sur membrane : α -ENO1 et α -HA pour les transgéniques eno1-HA et α -ENO2 et α -HA pour les transgéniques eno2-HA (figure n°18).

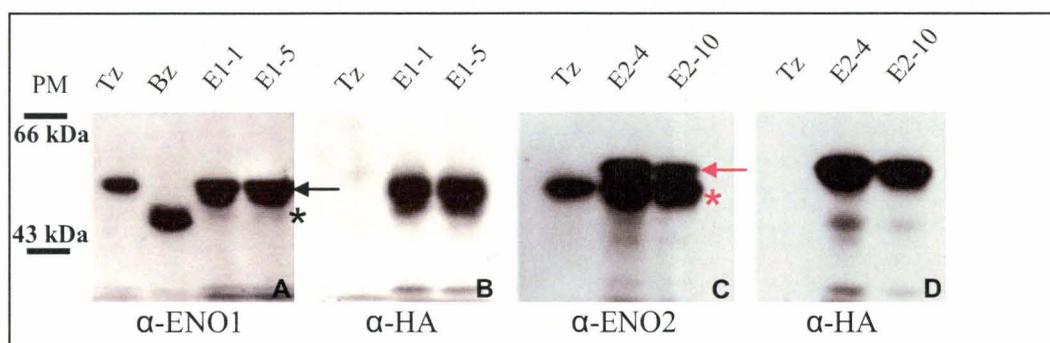


Figure 18 : Séparation en gel d'acrylamide des énolasses endogènes et transgéniques (étiquetées HA)

Les lysats des parasites transgéniques sélectionnés sont déposés dans un grand gel d'acrylamide à 7,5%. Après transfert sur nitrocellulose, des immuno-empreintes sont réalisées : α -ENO1 et α -HA pour les parasites eno1-HA et α -ENO2 et α -HA pour les parasites eno2-HA.

L'immuno-empreinte α -ENO1 (panneau A) met en évidence une bande majeure d'un poids moléculaire apparent de 48 kDa (marquée par la flèche noire) dans les parasites

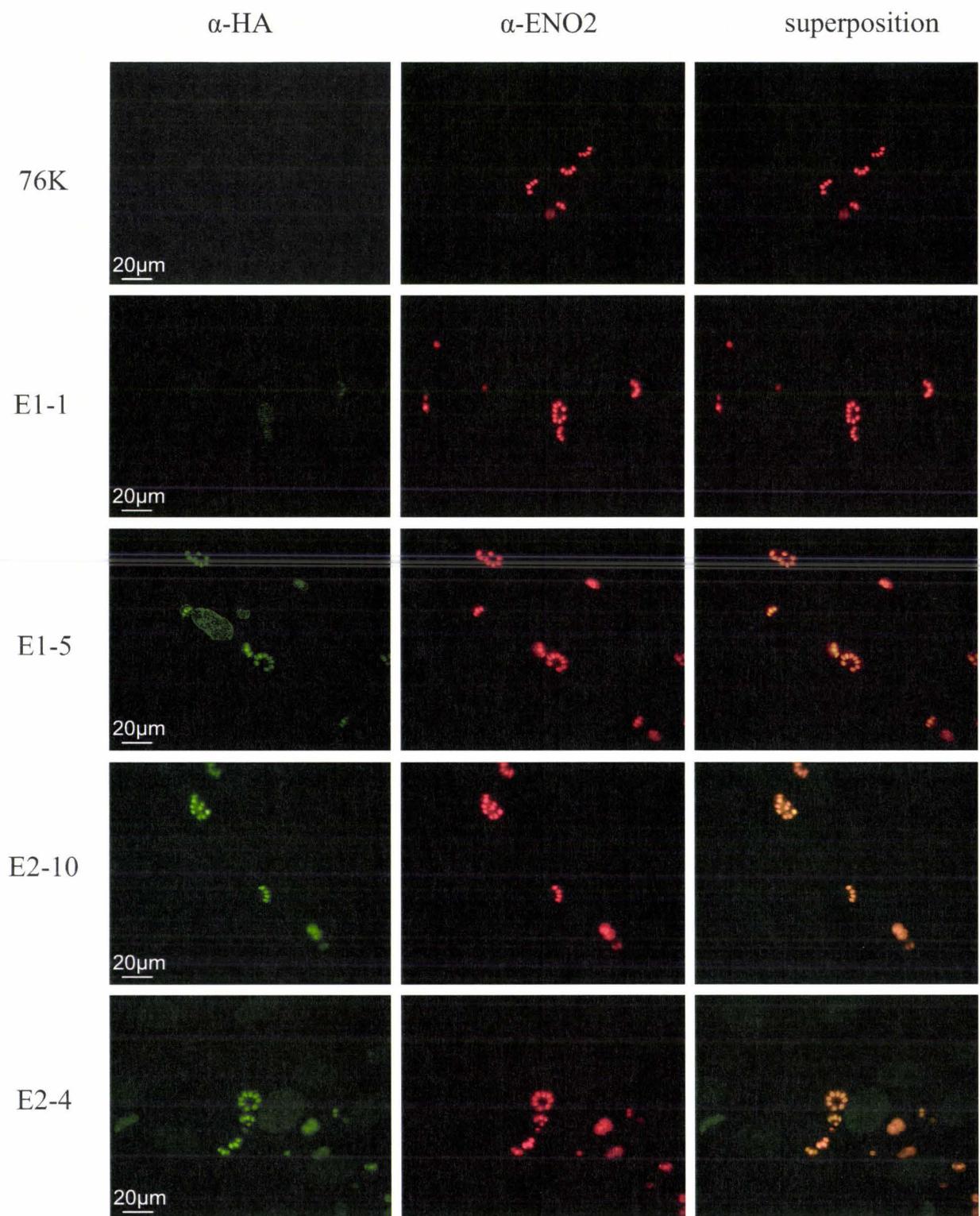


Figure 19 : Expression illégitime des éno-lases-HA dans les parasites transgéniques

Des cellules HFF cultivées sur des lamelles sont infectées avec des tachyzoïtes de la souche sauvage 76K ou des tachyzoïtes des souches transgéniques exprimant les ENO-HA. Le tapis cellulaire est fixé 24H après l'infection et une double immuno-fluorescence α -ENO2 (rouge) et α -HA (vert) est effectuée.

transgéniques E1-1 et E1-5. Cette bande protéique correspond exactement à l'énolase ENO1-HA puisqu'elle est également révélée par l'anticorps α -HA (panneau B). Une bande mineure de 47 kDa est également observée dans les parasites E1-1 et E1-5 (étoile noire, panneau A). Cette bande correspond à l'énolase endogène ENO1, souvent faiblement exprimée dans les tachyzoïtes cultivés *in vitro*, comme l'indique le signal obtenu à la même taille dans les bradyzoïtes (panneau A). Dans ces conditions expérimentales, nous avons pu observer, pour la première fois, que l'anticorps α -ENO1 croise avec l'énolase ENO2 des tachyzoïtes puisque nous avons obtenu un signal dans les tachyzoïtes (panneau A), contrairement aux résultats couramment obtenus dans le laboratoire (Dzierszinski *et al.*, 2001).

L'immuno-empreinte α -ENO2 (panneau C) met également en évidence deux bandes dans les parasites transgéniques E2-4 et E2-10. La bande inférieure, d'un poids moléculaire apparent de 48 kDa (étoile rouge), est l'énolase endogène puisqu'un signal migrant à la même taille est observée dans les tachyzoïtes sauvages. La bande supérieure (flèche rouge), migrant approximativement à 50 kDa, correspond à l'énolase étiquetée avec le HA, puisqu'elle est également révélée avec l'anticorps α -HA (panneau D).

Nous avons donc conclu que des parasites transgéniques exprimant de manière stable l'une ou l'autre des isoformes de l'énolase en fusion avec l'épitope HA ont bien été obtenus.

L'expression illégitime des émolases-HA a par ailleurs été vérifiée par une double immuno-fluorescence α -ENO2 / α -HA dont les résultats sont présentés dans la figure n°19. Tous les tachyzoïtes issus du même clone sont positifs pour le signal HA, confirmant l'homogénéité de la population clonale. Dans les parasites transgéniques E2 (E2-4 et E2-10), le signal nucléaire HA se superpose au signal nucléaire ENO2. Ceci est également observé dans les parasites transgéniques E1, suggérant qu'ENO1-HA se comporte comme ENO2 dans le tachyzoïte et que les deux émolases-HA sont bien adressées dans le noyau des parasites dans les stades précoces de la division parasitaire (figure 19). La validité de ces conclusions est supportée par l'absence totale de signal HA sur les parasites sauvages (figure 19, panel 76K).

Afin de déterminer si la sur-expression illégitime d'ENO2 ou d'ENO1 dans les tachyzoïte implique des changements physiologiques chez le parasite, le phénotype des parasites transgéniques obtenus a été étudié.

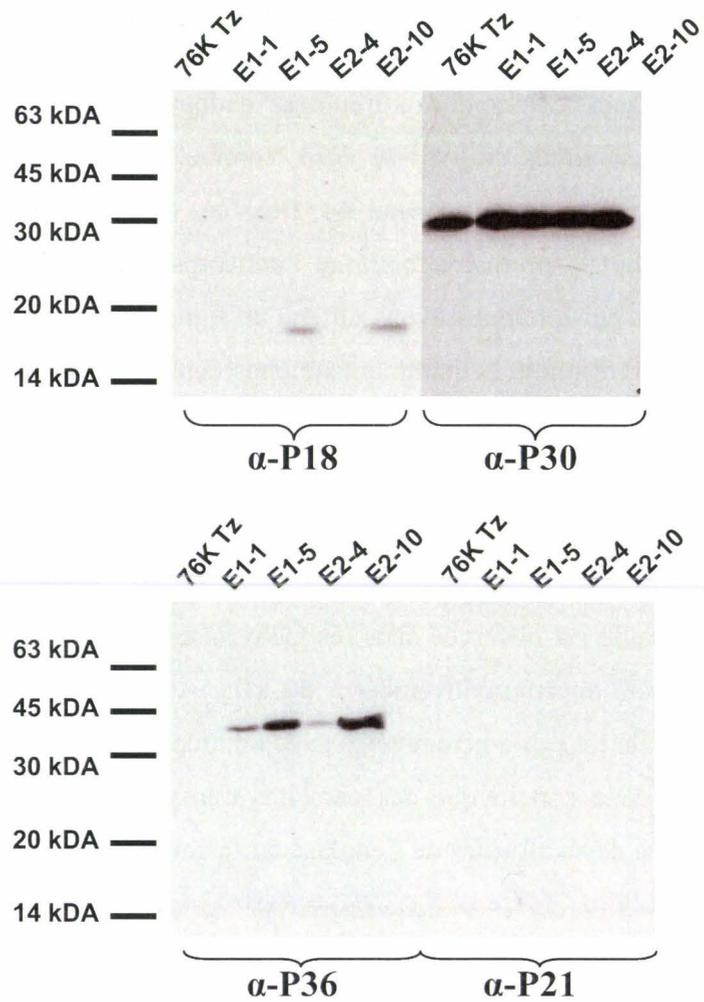


Figure 20 : Mise en évidence de l'expression d'antigènes de bradyzoïtes dans les tachyzoïtes transgéniques

Les parasites sont purifiés puis 5 millions sont déposés dans un gel d'acrylamide à 12% avant transfert sur membrane de nitrocellulose. Quatre immuno-empreintes sont alors réalisées : α -P30, antigène spécifique des tachyzoïtes (témoin); α -P36, α -P18 et α -P21, antigènes spécifiques des bradyzoïtes.

V) Etude phénotypique des parasites transgéniques

1) Etude de l'expression de protéines spécifiques du stade bradyzoïte

L'énolase est adressée vers le compartiment nucléaire à des moments clés du développement du parasite, suggérant un rôle de régulateur de l'expression génique (Ferguson *et al.*, 2002). Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence du rôle de répresseur transcriptionnel des homologues d'énolases chez l'homme et chez *Arabidopsis thaliana* (Feo *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2002). L'expression illégitime d'ENO1 dans le tachyzoïte pourrait avoir des conséquences phénotypiques, puisqu'ENO1 est retrouvée dans le noyau des tachyzoïtes en cours de conversion en bradyzoïtes dans le cerveau des souris (Ferguson *et al.*, 2002). Cette énolase pourrait initier le changement de stade parasitaire en activant ou réprimant des gènes spécifiques du stade parasitaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié en immuno-empreinte l'expression d'antigènes spécifiques de bradyzoïtes dans les quatre parasites transgéniques (figure n°20).

L'immuno-empreinte témoin α -P30 montre un signal identique pour les quatre clones transgéniques et le témoin tachyzoïte de la souche sauvage 76K, confirmant qu'une quantité équivalente de tachyzoïtes est comparée lors de cette expérience.

Les quatre clones expriment l'antigène P36 spécifique du bradyzoïte (absent chez le tachyzoïte sauvage). L'intensité de l'expression P36 varie selon le clone (figure 20, panneau α -P36). Seuls deux clones sur quatre (E1-5 et E2-10) expriment faiblement l'antigène P18, qui n'est pas exprimé chez le tachyzoïte sauvage (figure 20, panneau α -P18). On remarque que ces deux clones sont ceux qui expriment le plus d'antigène P36.

Ce résultat suggère que l'expression illégitime de l'une ou l'autre des énolases pourrait induire un début de conversion en bradyzoïte.

L'immuno-empreinte α -P21 n'a donné aucun résultat, ce qui peut s'expliquer par le fait que cet antigène est un marqueur tardif de la différenciation parasitaire détectable surtout *in vivo* ou après un stress très prolongé *in vitro* chez les tachyzoïtes (Soete *et al.*, 1993).

Il semble donc que l'expression illégitime des énolases induit l'expression d'antigènes spécifiques du stade bradyzoïte. Bien que ces parasites transgéniques aient été analysés après plusieurs semaines de culture dans des conditions identiques à celles de la souche sauvage 76K, nous ne pouvons exclure que cette expression de marqueurs spécifiques du bradyzoïte provienne du stress découlant de la sélection à la bléomycine.

2) Tests d'invasion et de multiplication

Des cellules HFF cultivées sur des lamelles ont été infectées avec la souche 76K sauvage ou l'une des quatre souches transgéniques pendant 24 ou 42 H. Après infection, la croissance parasitaire est arrêtée par le réactif 1 du kit RAL-555 (Réactifs RAL). Les noyaux et les cytoplasmes des cellules et des parasites sont ensuite colorés avec l'éosine et le bleu des réactifs 2 et 3. Les frottis colorés sont observés au microscope et le nombre de parasites par vacuole et par cellule est alors compté (figure 21).

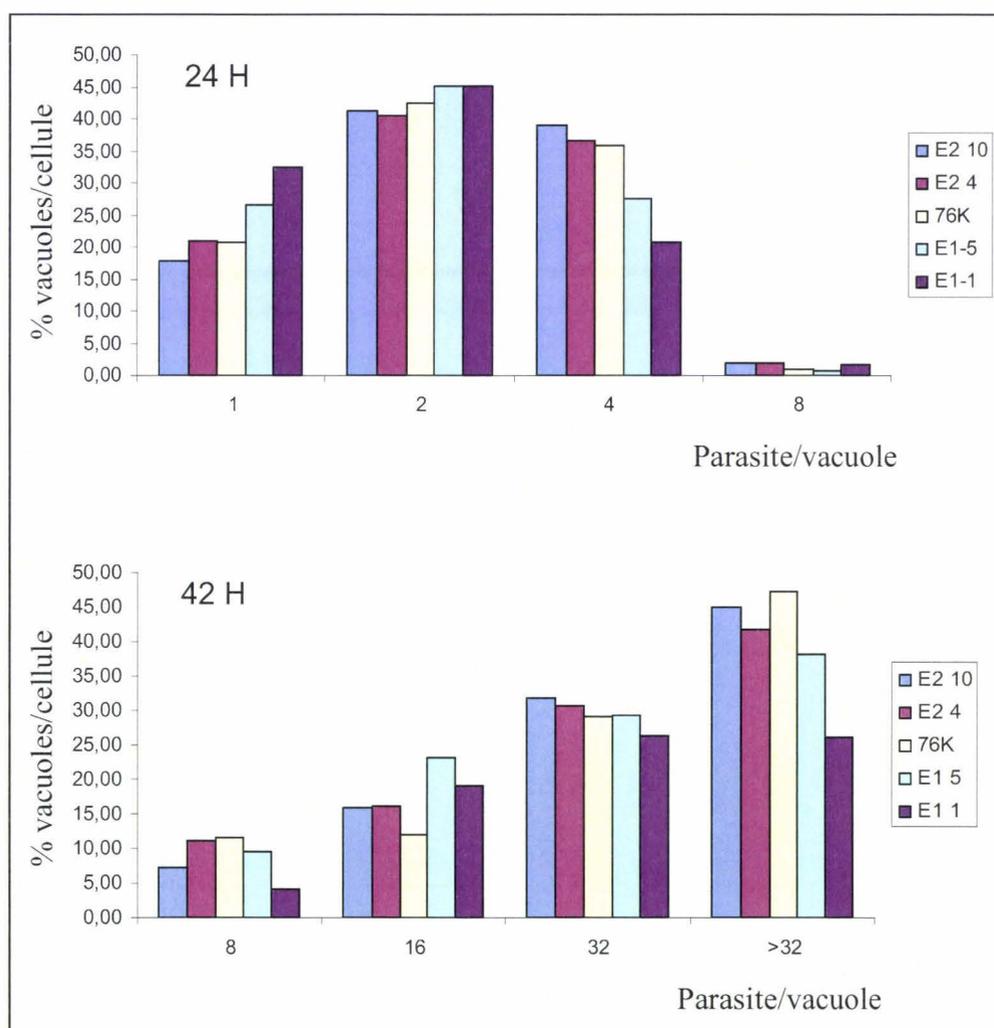


Figure 21 : Tests d'invasion et de répllication des souches transgéniques

Des cellules HFF ont été infectées avec les quatre souches transgéniques et le témoin souche 76K sauvage. Le développement a été arrêté par fixation au bout de 24 ou 42H et le nombre de parasites par vacuole et par cellule a été déterminé.

A 24H ou 48H de développement parasitaire, nous n'observons aucune différence significative du nombre de parasites par vacuole et par cellule entre les différentes souches, suggérant que la sur-expression des émolases n'a aucune incidence ni sur le processus

d'invasion ni sur le cycle de réplication des parasites cultivés dans des fibroblastes humains. Nous n'avons pas étudié le développement de ces parasites transgéniques dans d'autres types de cellules telles que les macrophages.

3) Tests de virulence

Afin de comparer la virulence des souches transgéniques avec celle de la souche sauvage, six souris Balb/c par clone ont été infectées avec 1000 parasites. Les résultats obtenus pour le clone E2-10 n'ont pas été reportés puisque trois morts inexplicables ont été constatées deux jours après l'infection, ce qui n'est probablement pas lié à l'infection parasitaire. En revanche, dans un délai compatible avec une infection, la souche 76K sauvage a provoqué 33% de morts et la souche transgénique E1-1, 17% (figure 22A). Les souches transgéniques E1-5 et E2-4 n'ont provoqué la mort d'aucune souris. Il semblerait que les souches E1-1, E1-5 et E2-4 soient moins virulentes que la 76K sauvage mais l'expérience est à renouveler avec un nombre de souris plus important. Ces résultats préliminaires semblent toutefois corrélés avec l'expression des marqueurs protéiques de bradyzoïtes, témoignant d'une diminution de leur virulence.

Les souris survivantes ont été sacrifiées six semaines après l'infection, et les kystes ont été purifiés des cerveaux comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes » puis comptés sur lame de Malassez (figure 22B). Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes souches, suggérant que la sur-expression des énoïases n'a aucun effet apparent sur la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte *in vivo* après six semaines dans les souris (figure 22B).

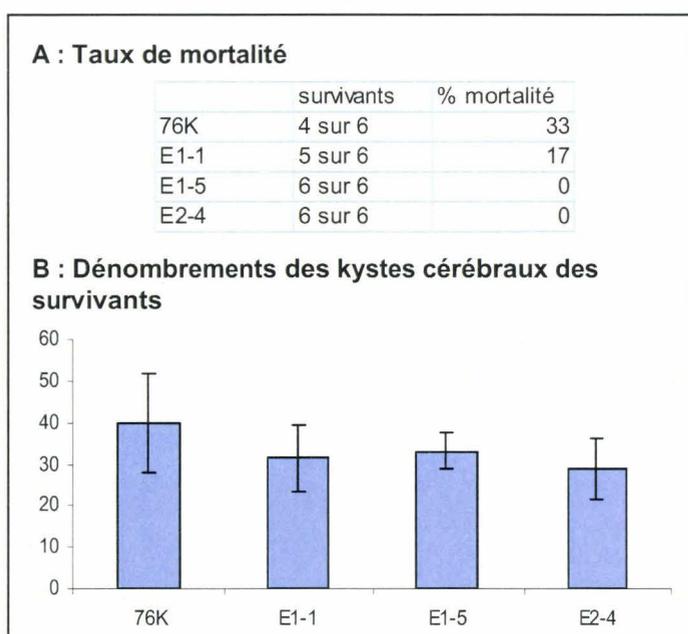


Figure 22 : Tests de virulence des souches transgéniques

Six souris Balb/c par clone ont été infectées avec 1000 parasites. Après six semaines, le taux de mortalité ainsi que le nombre de kystes par cerveau est quantifié.

			10	20	30	40	50	60	
<i>T. gondii</i> ENO2	1	MVAIKDITARQILD	SRGNPTVEVDLL	TDGGCFR-AAV	PSGASTGIYEALELRDKDQ	TKFM			59
<i>T. gondii</i> ENO1	2	MVVIKDIVAREILD	SRGNPTIEVDV	STEGGVFR-AAV	PSGASTGIYEALELRDKDPKRYL				59
MPB 1	3	-MSILKIHAREIFD	SRGNPTVEVDL	FTSKGLFR-AAV	PSGASTGIYEALELRDNDKTRYM				58
<i>A. thaliana</i>	4	MATITVVKARQIFD	SRGNPTVEVDI	HTSNGIKVTA	AVPSGASTGIYEALELRDGG-SDYL				59
			70	80	90	100	110	120	
<i>T. gondii</i> ENO2	1	GKGVMAVENIHKI	IKPALIGKDP-CD	QKGDKMLMVEELD	GTKNEWGWCKSKL	GANAILA			118
<i>T. gondii</i> ENO1	2	GKGVNAVEIVRQE	EIKPALLGKDP-CD	QKGDMLMVEQLD	GTKNEWGYSKSKL	GANAILG			118
MPB 1	3	GKGVSKAVEHINK	TAPALVSKKLN	VTQEKEIDKLM	EMDGTENK-----K	FGANAILG			113
<i>A. thaliana</i>	4	GKGVSKAVGNVNN	IIGPALIGKDP-T	QQTAIDNFMVHE	LDTQNEWGWCKQ	KLGANAILA			118
			130	140	150	160	170	180	
<i>T. gondii</i> ENO2	1	VSMACCRAGAAAK	GMPYKYIATLAG	NPTDKMVMPV	PFNVINGGSHAG	NKVAMQEFMIA			178
<i>T. gondii</i> ENO1	2	VSIACCRAGAASK	GPLYKYIATLAG	KTDKMVMPV	PFNVINGGEHAG	NGLALQEFLIA			178
MPB 1	3	VSLAVCKAGAVEK	GVPLYRHIADLAG	N--SEVILPVP	AFNVINGGSHAG	NKLAMQEFMIL			171
<i>A. thaliana</i>	4	VSLAVCKAGAVV	SGIPLYKHIANLAG	N--PKIVLPVP	AFNVINGGSHAG	NKLAMQEFMIL			176
			190	200	210	220	230	240	
<i>T. gondii</i> ENO2	1	PVGASTIQEAIQI	GAEVYQHLKVV	IKKYGLDATNV	GDEGGFAPNIS	GATEALDLLMEAI			238
<i>T. gondii</i> ENO1	2	PVGAPNIREAIRY	GSETYHHLKNV	IKNKYGLDATNV	GDEGGFAPNVA	TAEELNLLVEAI			238
MPB 1	3	PVGAANFREAMR	IGAEVYHNLKN	VIKEKYGDATNV	GDEGGFAPNI	LENKEGLELLKTAI			231
<i>A. thaliana</i>	4	PVGAASFKEAMK	MGEVYHHLKSV	IKKYGQDATNV	GDEGGFAPNI	QENKEGLELLKTAI			236
			250	260	270	280	290	300	
<i>T. gondii</i> ENO2	1	KVSGHEGKVKIA	ADVAASEFFLQ	DDKVYDLDFK	TPNNDKSQRKT	GEELRNLYKDL	CQKYP		298
<i>T. gondii</i> ENO1	2	KAAGYEGKIKIA	FDAASEFFYK	QDEKKYDLDY	KCKTKNASKHL	TGEKLKEVYEG	WLKYP		298
MPB 1	3	GKAGYTDKVVIG	MDVAASEFFR	SGK--YDLDFK	SPDDP-SRYIS	PDQLADLYKSF	IKDYP		288
<i>A. thaliana</i>	4	EKAGYTGKVVIG	MDVAASEFFY	SEDKT-YDLNF	KENNNGSQKIS	GDALKDLYKSF	VAEYP		295
			310	320	330	340	350	360	
<i>T. gondii</i> ENO2	1	FVSIEDPFDQDD	FHSYAQLTNEV	GEKVQIVGDD	LLVTNPTRIEKA	VQEKACNGLLL	KVNQ		358
<i>T. gondii</i> ENO1	2	IISVEDPFDQDD	FASFSFTKDV	GEKTQVIGDD	ILVTNIRIEKAL	KDKACNCLLL	KVNQ		358
MPB 1	3	VVSIEDPFDQDD	WGAWQKFTAS	AG--IQVVGDD	LVTNPKRIAKA	VNEKSCNCLLL	KVNQ		346
<i>A. thaliana</i>	4	IVSIEDPFDQDD	WEHYAKMTTE	CGTEVQIVGDD	LLVTNPKRVAKA	IAEKSCNALLL	KVNQ		355
			370	380	390	400	410	420	
<i>T. gondii</i> ENO2	1	IGTVSESI	EACQLAQKNK	WGMVSHRSGE	TEDSFIADLVV	GLRTGQIKTGAP	PCRSERLCK		418
<i>T. gondii</i> ENO1	2	IGSVTEAIEAC	LLAQKSGWGV	QVSHRSGE	TEDSFIADLVV	GLRCGQIKSGS	PCRSERLCK		418
MPB 1	3	IGSVTESLQAC	KLAQANGWGM	VSHRSGE	TEDTFIADLVV	GLCTGQIKTGAP	PCRSERLAK		406
<i>A. thaliana</i>	4	IGSVTESIEAV	KMSKAGWGM	TSHRSGE	TEDTFIADLAV	GLSTGQIKTGAP	PCRSERLAK		415
			430	440					
<i>T. gondii</i> ENO2	1	YNQLMRIEESL	GSDCQYAGAG	FRHPN---					444
<i>T. gondii</i> ENO1	2	YNQLMRIEESL	GADCVYAGES	FRHPK---					444
MPB 1	3	YNQLLRIEEEL	GSKAKFAGRN	FRNPLAK-					434
<i>A. thaliana</i>	4	YNQLLRIEEEL	GSEAIYAGVN	FRKPVPEY					444

Figure 23 : Alignement des séquences protéiques d'ENO1 et d'ENO2 de *Toxoplasma gondii* avec l'énolase 1 humaine (MBP-1) et l'énolase d'*Arabidopsis thaliana*.

Les quatre émolases ont été alignées dans Clustal W et les sites potentiels de O-GlcNAc et de phosphorylation ont été identifiés par bio-informatique à l'aide des logiciels Yin-O-Yang 1.2 et NetPhos 2.0.

Légende : résidu pouvant être O-N-acétylglucosaminylé ; résidu pouvant être phosphorylé ; résidu pouvant être à la fois phosphorylé et O-N-acétylglucosaminylé ; les sites encadrés sont des sites de type I.

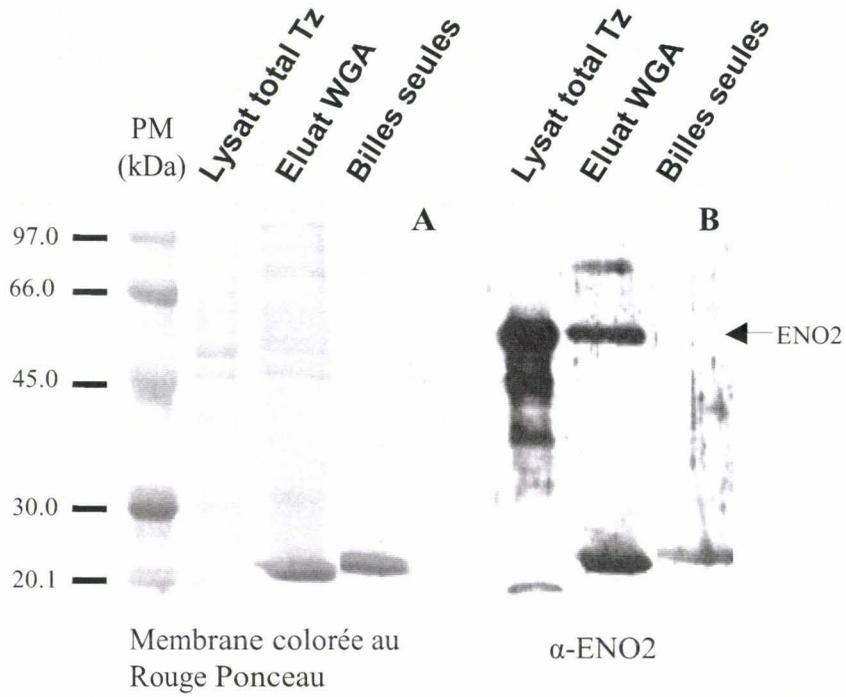
Après avoir étudié l'incidence de l'expression illégitime des deux émolases, nous nous sommes intéressés au processus permettant de caractériser la localisation nucléaire de ces protéines glycolytiques. Les émolases, d'un poids moléculaires de 48 kDa, ne peuvent diffuser de manière passive via les pores nucléaires et elles ne possèdent pas de NLS (Nuclear Localization Signal), séquence retrouvée dans la plupart des protéines nucléaires. Nous avons émis l'hypothèse que ces enzymes pouvaient être localisées dans le compartiment nucléaire avec la présence d'une modification post-traductionnelle, la O-GlcNAc, qui est un marqueur porté par un grand nombre de facteurs nucléaires. Nous avons alors entrepris de montrer l'existence de ce résidu monosaccharidique sur les émolases du toxoplasme.

VI) Alignement de 4 émolases adressées au noyau et mise en évidence de sites potentiels de O-N-Acétylglucosaminylation.

Des recherches bibliographiques nous ont révélé que des homologues d'émolase d'autres organismes étaient également adressées vers le noyau, notamment chez l'Homme (MBP-1) et chez *Arabidopsis thaliana* (LOS2). Chez ces deux organismes, le mode de transport nucléocytoplasmique des émolases n'a pas été évoqué mais il a été montré que l'émolase humaine portait des résidus O-GlcNAc, renforçant notre hypothèse (Wells *et al.*, 2002).

Les séquences protéiques des émolases MBP-1 et LOS2 et celles d'ENO1 et d'ENO2 du toxoplasme ont été alignées dans Clustal W et soumises aux logiciels Yin-O-Yang et NetPhos, permettant de mettre en évidence les sites potentiels de O-GlcNAc ou de phosphorylation (figure 23). Un site potentiel O-GlcNAc (sérine en position 39) est conservé dans les quatre émolases et correspond à un site de type I puisque la sérine conservée est précédée d'une proline (Ku *et Omary*, 1995). ENO2 présente deux sites supplémentaires au niveau des sérines 239 et 415 alors que le site supplémentaire d'ENO1 est en position 387. Certains résidus potentiellement phosphorylables sont également très conservés dans les quatre émolases : ce sont les sérines en position 15, 280, 303, 387 et les sérines/thréonines en position 363. Tous ces sites peuvent potentiellement jouer un rôle dans une balance O-GlcNAc / Phosphorylation et donc dans la localisation nucléocytoplasmique des émolases.

I



II

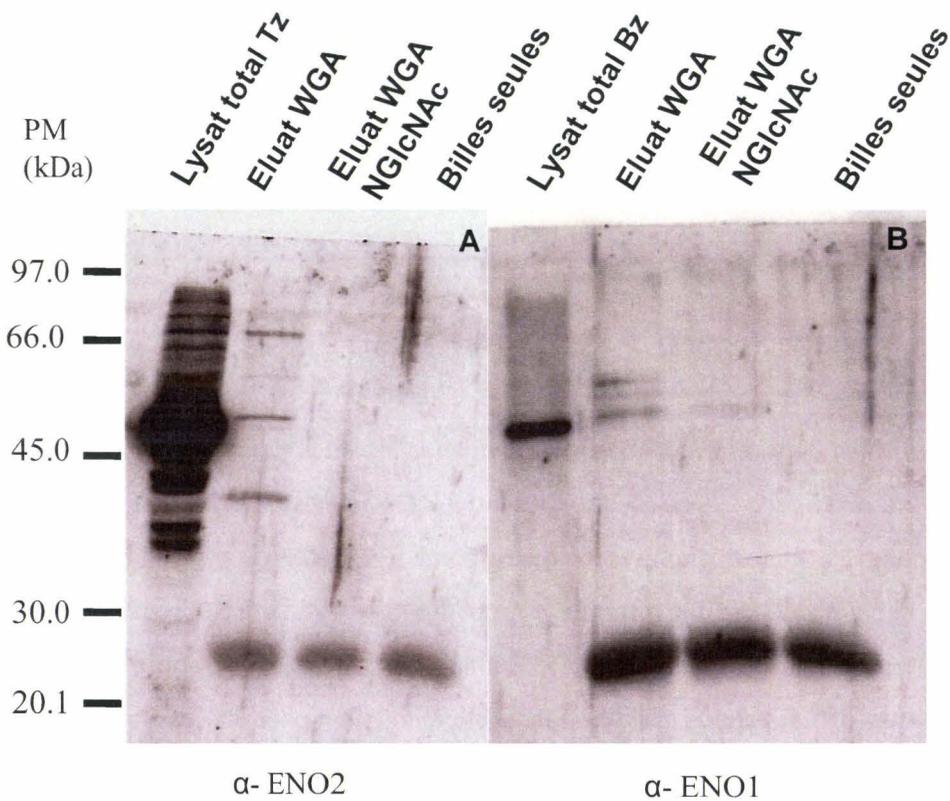


Figure 24 : La rétention des énolasses sur colonne WGA suggère la présence de résidus O-GlcNAc sur ces protéines

250 millions de tachyzoïtes purifiés et 500 kystes purifiés à partir de cerveaux de souris sont lysés puis incubés avec des billes couplées à la WGA, en présence ou non de N-acétylglucosamine 0,1M. Les protéines fixées sont éluées, déposées dans un gel d'acrylamide 10%, transférées sur membrane de nitrocellulose et une immuno-empreinte α -ENO1 ou α -ENO2 est effectuée.

Cette recherche bioinformatique nous a donc conforté dans notre hypothèse et nous avons alors entrepris de montrer l'existence de cette modification post-traductionnelle sur les émolases du parasite.

VII) Mise en évidence de la O-N-acétylglucosaminylation sur ENO1 et ENO2

Des tachyzoïtes (250 millions) ou des kystes (500) contenant des bradyzoïtes ont été lysés puis incubés avec des billes couplées à la WGA (Wheat Germ Agglutinin) dans les conditions décrites précédemment. La WGA est une lectine reconnaissant de manière spécifique les acides sialiques et les résidus GlcNAc en position terminale. Elle est couramment utilisée pour la mise en évidence de la O-GlcNAc. Les protéines purifiées par affinité sur WGA ont été éluées et déposées dans un gel d'acrylamide. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, une immuno-empreinte α -ENO1 ou α -ENO2 a été réalisée.

Parmi les nombreuses protéines glycosylées retenues sur la colonne WGA (figure 24, I, A), on retrouve l'émolase ENO2 spécifique du stade tachyzoïte de *Toxoplasma gondii*, comme le démontre l'immuno-empreinte α -ENO2 (figure 24, I, B). La bande observée à environ 20 kDa correspond à de la WGA libre. Il est à noter qu'une protéine de 70 kDa de nature inconnue est également visualisée.

Afin de vérifier la spécificité de la fixation de l'émolase à la WGA, l'expérience a été reconduite en incluant une compétition à la N-Acétylglucosamine (figure 24, II, A). La bande de 70 kDa visualisée dans la première expérience est à nouveau observée (figure 24, II, A). Une bande supplémentaire de 38 kDa approximativement est également observée et pourrait correspondre à un produit de dégradation d'ENO2, d'autant plus que le signal ENO2 de 48 kDa est beaucoup plus faible que celui observé dans la première expérience.

L'affinité de l'isoforme ENO1 spécifique du bradyzoïte avec la WGA a également été testée (figure 24, II, B). Les résultats obtenus montrent qu'ENO1 est retenue sur la colonne WGA, comme ENO2. Nous pouvons observer deux autres bandes de nature inconnue et d'un poids moléculaire apparent supérieur à 48 kDa. Ces bandes peuvent correspondre à des formes ENO1 portant diverses modifications post-traductionnelles.

La compétition avec la N-acétylglucosamine diminue de manière flagrante le signal en immuno-empreinte (pistes 3 des figures 24, II A et B), démontrant la spécificité de l'affinité entre les émolases et la WGA.

L'analyse du génome de *T. gondii* n'a pas permis de mettre en évidence la présence des enzymes impliquées dans l'addition ou le retrait d'acides sialiques, résidus dont la

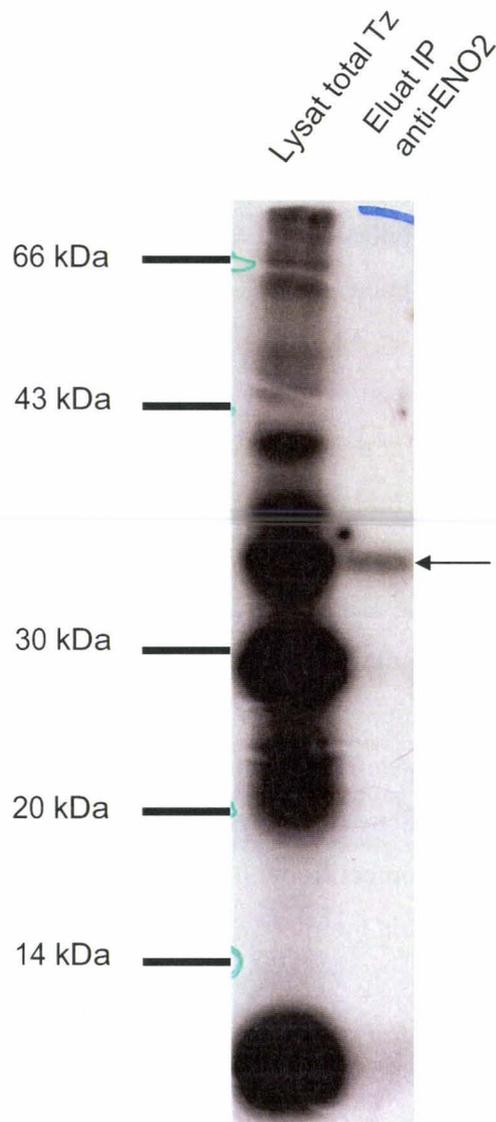


Figure 25 : Marquage métabolique à la glucosamine tritiée et immunoprécipitation d'ENO2

Des tachyzoïtes intracellulaires de 48H de la souche 76K ont été cultivés en présence de glucosamine tritiée pendant 6H. Après la lyse des cellules par les tachyzoïtes, les parasites sont purifiés sur colonne de fibre de verre. Une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-ENO2 est alors réalisée sur les lysats provenant des parasites ayant incorporé la glucosamine tritiée et l'éluat obtenu est déposé dans un gel d'acrylamide à 12%. Après migration des protéines, le gel est coloré au bleu de Coomassie et séché sous vide. Le gel est enfin exposé contre un film à -80°C pendant une semaine.

présence n'a jamais été mise en évidence expérimentalement jusqu'à présent chez le parasite. ENO2 possède un site potentiel de O-glycosylation classique, contrairement à ENO1 qui ne porte que des sites potentiels de O-GlcNAc. Cette observation et les résultats obtenus suite à la chromatographie d'affinité avec la WGA montrent qu'ENO1 est O-N-acétylglucosaminylée et qu'ENO2 est susceptible de porter des résidus O-GlcNAc.

La O-GlcNAc a été décrite comme une modification post-traductionnelle essentielle à la cellule puisque l'inactivation du gène codant l'OGT, l'enzyme ajoutant les résidus O-GlcNAc sur les protéines, est létale chez les souris (Shafi *et al.*, 2000). La perturbation du mécanisme d'addition ou de retrait du monosaccharide via des drogues telles que l'alloxan (inhibiteur de l'OGT) ou la streptozotocine (inhibiteur de la O-GlcNAcase) implique de profonds changements métaboliques dans les cellules humaines. Afin de déterminer si ces drogues sont actives sur les parasites, les expériences décrites ci-dessous ont été réalisées.

VIII) ENO2 est radiomarquée métaboliquement avec de la glucosamine tritiée

Un marquage métabolique à la glucosamine tritiée est réalisé 48H après infection sur des tachyzoïtes de la souche 76K. Les parasites sont purifiés et lysés et le marquage est vérifié par comptage de la radioactivité. Le lysat obtenu est incubé avec des billes couplées aux IgG anti-ENO2 de lapin. L'éluat obtenu, contenant l'énolase ENO2 purifiée, est réduit par addition de DTT (0,1M) et déposé dans un gel d'acrylamide à 10%. Après migration, le gel est coloré au bleu de Coomassie, décoloré à l'acide acétique 10% et le signal radioactif est amplifié par incubation du gel avec une solution contenant de l'Amplify. Le gel est ensuite séché et exposé contre un film autoradiographique à -80°C pendant une semaine. Les résultats obtenus (figure 25) confirment les résultats obtenus lors de la chromatographie d'affinité avec la WGA. En effet, le lysat total de tachyzoïtes présente de nombreuses bandes radioactives, suggérant que de nombreuses protéines glycosylées possèdent des résidus GlcNAc. L'éluat de l'immunoprécipitation anti-ENO2 présente une seule bande marquée d'un poids moléculaire approximatif de 38 kDa, correspondant à la bande inférieure déjà révélée lors de la chromatographie d'affinité sur WGA (immunoempreinte anti-ENO2). Ce résultat suggère que l'énolase porte effectivement des résidus GlcNAc. La récurrence de la présence de cette bande dans les expériences suggère fortement que cette énolase tronquée n'est peut-être pas un produit de dégradation obtenu fortuitement lors de la manipulation du lysat. L'étude du promoteur du gène *eno2*

transcription n'a pas révélé l'existence d'un site de transcription alternatif qui permettrait d'obtenir une protéine d'environ 38 kDa (Kibe *et al.*, 2002). Cette énoïase de 38 kDa pourrait être issue d'une protéolyse spécifique à partir de l'énoïase de 48 kDa. Cependant, l'analyse par bioinformatique d'ENO2 n'a pas permis de mettre en évidence un site de clivage protéique connu. Cette hypothèse reste donc à vérifier par des expériences de marquages métaboliques avec des acides aminés radioactifs, ce qui permettra d'identifier la protéine de 48 kDa comme étant le précurseur protéique de la protéine de 38 kDa (« pulse-chase »).

IX) Effet des drogues alloxan et streptozotocine sur les parasites

1) Tests de croissance

Les parasites ont été cultivés pendant 24h en présence des drogues à différentes concentrations puis un marquage à l'uracile a été réalisé pendant 8 heures afin de déterminer l'effet des drogues sur la croissance parasitaire (figure 26).

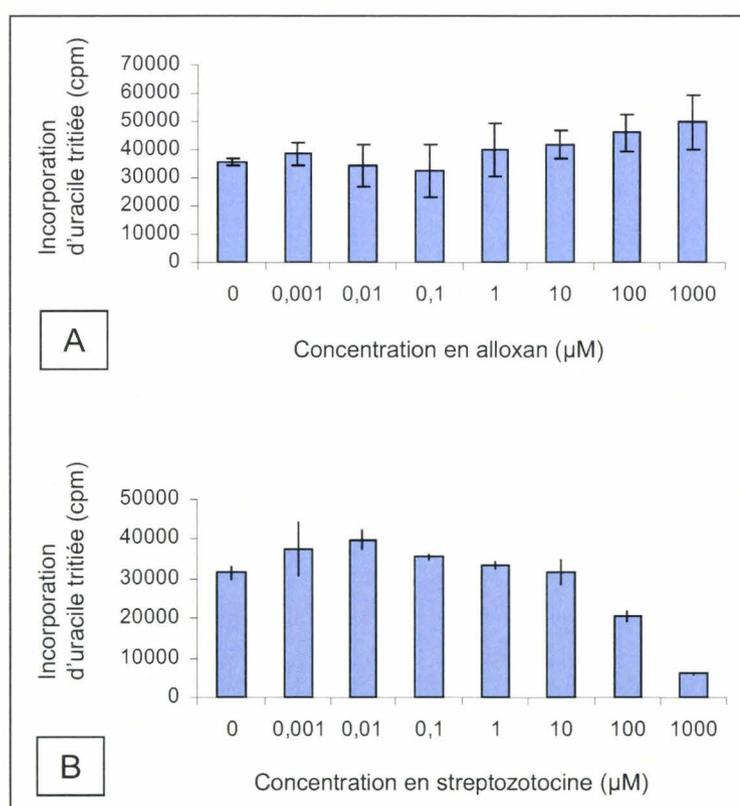


Figure 26 : Effet des drogues alloxan et streptozotocine sur la croissance de la souche 76K

La croissance des parasites, cultivés sous pression de la drogue alloxan ou streptozotocine, est mesurée par un marquage à l'uracile tritié pendant huit heures.

Cpm : coup par minute

Dans nos conditions expérimentales, la drogue alloxan, inhibiteur de l'OGT, ne semble avoir aucun effet sur la croissance parasitaire, quelque soit la concentration utilisée puisqu'on n'observe aucune diminution de la quantité d'uracile incorporée par rapport au témoin sans drogue (figure 26, A).

Une diminution de la quantité d'uracile incorporée et donc de la croissance parasitaire est observée pour la streptozotocine, inhibiteur de la O-GlcNAcase, à une concentration de 100 μM (figure 26, B). Cette diminution est en fait due à un effet toxique de la drogue sur les cellules HFF car à cette concentration, les cellules sont rétractées et le tapis cellulaire semble moins adhérer au fond de la boîte, suggérant que les parasites se développeraient dans des conditions toxiques pour les cellules.

Il semble donc qu'aucune des drogues connues pour perturber le mécanisme de O-GlcNAc chez les mammifères n'ait d'effet apparent sur la croissance de *Toxoplasma gondii*.

Alternativement, il se peut que chez le toxoplasme la O-GlcNAc joue un rôle moins vital pour le développement et la survie du parasite. Afin de vérifier si ces drogues sont actives sur le parasite à un autre niveau, nous avons décidé d'observer la localisation subcellulaire d'ENO2 sous pression des drogues.

2) Localisation subcellulaire d'ENO2 en présence d'alloxan ou de streptozotocine.

Une immunofluorescence α -ENO2 est réalisée sur des parasites ayant été cultivés en présence d'alloxan 100 μM ou de streptozotocine 10 μM (figure 27).

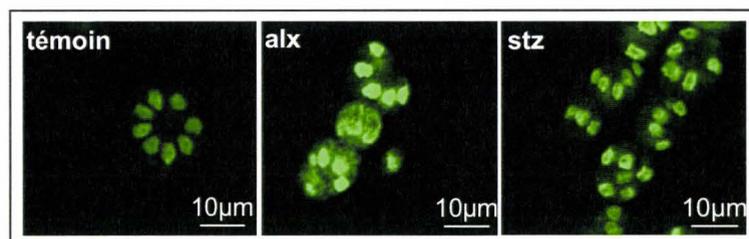


Figure 27 : Localisation subcellulaire d'ENO2 en présence des drogues alloxan et streptozotocine

Des cellules HFF sont cultivées sur des lamelles de verre puis infectées avec la souche 76K. Lors du renouvellement du milieu, les drogues testées sont ajoutées et les parasites se développent pendant 24H. Après fixation du tapis cellulaire, une immunofluorescence α -ENO2 est effectuée puis les lamelles sont observées à l'aide d'un microscope confocal.

Nous n'avons observé aucune différence flagrante de la répartition subcellulaire de l'énolase dans les cellules cultivées avec la streptozotocine par rapport au témoin sans drogue : l'énolase est majoritairement nucléaire dans les stades précoces de division (figure 27). Le signal observé dans le noyau des parasites cultivés en présence de l'alloxan semble apparemment plus intense que celui observé dans les parasites cultivés sans drogue. Les images ayant été obtenues par microscopie confocale, nous avons vérifié cette observation en réalisant un fractionnement subcellulaire.

3) Fractionnement subcellulaire noyau/cytoplasme

Afin de vérifier de manière quantitative le résultat précédent, une partition cellulaire a été effectuée sur des parasites en présence ou non des drogues. Après dosage des protéines par la méthode de Bradford, 20 µg de protéines sont déposés dans un gel d'acrylamide et après transfert sur membrane de nitrocellulose, la répartition subcellulaire des émolases est observée en immuno-empainte α -ENO2 (figure 28).

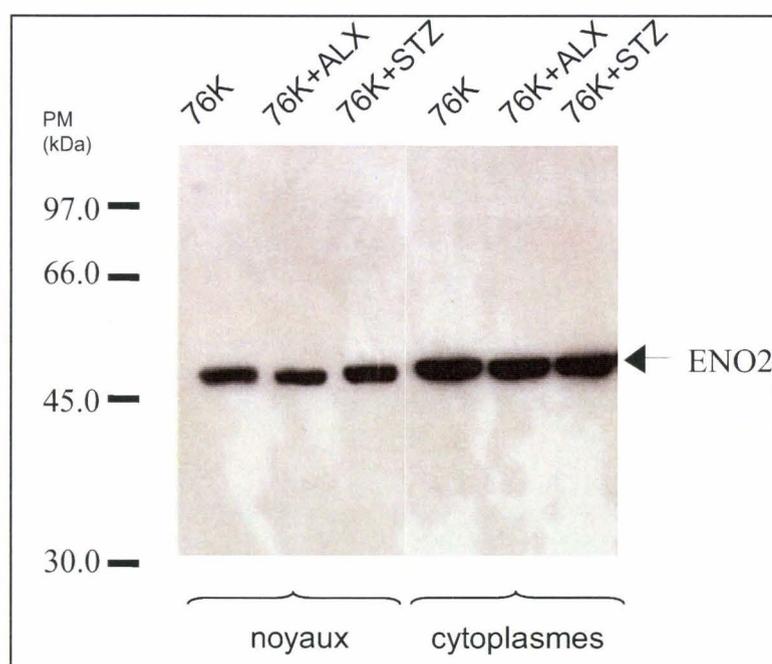


Figure 28 : Effet de l'alloxan et de la streptozotocine sur la répartition subcellulaire d'ENO2

La souche 76K a été cultivée en présence d'alloxan 100 µM ou de streptozotocine 10 µM pendant 48H. Les parasites sont ensuite purifiés et un fractionnement subcellulaire noyau/cytoplasme est alors réalisé. La quantité de protéines est déterminée par la méthode de Bradford et 20µg de chaque extrait sont déposés dans un gel d'acrylamide. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, une immuno-empainte α -ENO2 a été réalisée.

Par rapport au témoin 76K cultivé sans drogue, nous n'avons observé aucune différence de répartition des émolases quelque soit la drogue utilisée (figure 28). L'intensité du signal nucléaire ENO2 en présence d'alloxan, observée dans la figure 27, serait donc due à la coupe réalisée lors de la microscopie confocale.

L'insensibilité des tachyzoïtes aux drogues suggèrent que les enzymes impliquées dans le processus de O-GlcNAc chez le toxoplasme pourraient être différentes des

enzymes de mammifères qui elles sont sensibles à l'alloxan et à la streptozotocine (Konrad *et al.*, 2002 ; Gao *et al.*, 2000).

Nous avons donc entrepris d'identifier chez le parasite une OGT putative, enzyme responsable de l'addition des O-GlcNAc.

X) Mise en évidence de l'existence du gène codant l'OGT chez *Toxoplasma gondii*

Le gène putatif a été identifié par bioinformatique comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes ». Plusieurs prédictions ont été réalisées et leurs parties 5' et 3' se sont révélées très divergentes. Nous n'avons pu obtenir l'amplification de l'ORF entière (RT-PCR) pour aucune des prédictions, ce qui peut être dû aux incertitudes des prédictions ou à la difficulté d'obtenir un ARN de plus de 3000 pb intact.

Nous avons donc aligné les différentes prédictions dans Clustal W et une séquence commune de 1190 pb (extrémité 3' de la séquence) a pu être extraite. Des amorces ont été déterminées aux extrémités 5' et 3' de cette séquence et l'amplification par RT-PCR de ce fragment de 1190 pb a été réalisée avec succès en utilisant de l'ADNc de tachyzoïtes et de bradyzoïtes (figure n°29). Une normalisation a été réalisée en effectuant une RT-PCR avec des amorces spécifiques du gène constitutif de l'actine. Les résultats obtenus montrent que les deux stades parasitaires présentent la même quantité de transcrits correspondant à l'OGT putative, ce qui suggère une transcription constitutive de ce gène chez le parasite (figure 29).



Figure 29 : Mise en évidence des transcrits d'un fragment du gène putatif de l'OGT

Des amorces spécifiques de l'OGT ont été déterminées à partir de l'alignement des 3 prédictions du gène, aux extrémités de la séquence consensus commune aux 3 séquences. Ces amorces ont été utilisées pour réaliser des RT-PCR sur de l'ADNc de tachyzoïtes et de bradyzoïtes. Des RT-PCR avec des amorces spécifiques du gène constitutif actine ont été réalisées pour normaliser les amplifications dans les deux stades.

La séquence amplifiée a été séquencée et soumise à une analyse par Blast dans les banques de données sur NCBI. Les résultats obtenus ont montré que l'OGT du toxoplasme présente de fortes homologies avec les OGT SPINDLY des plantes.

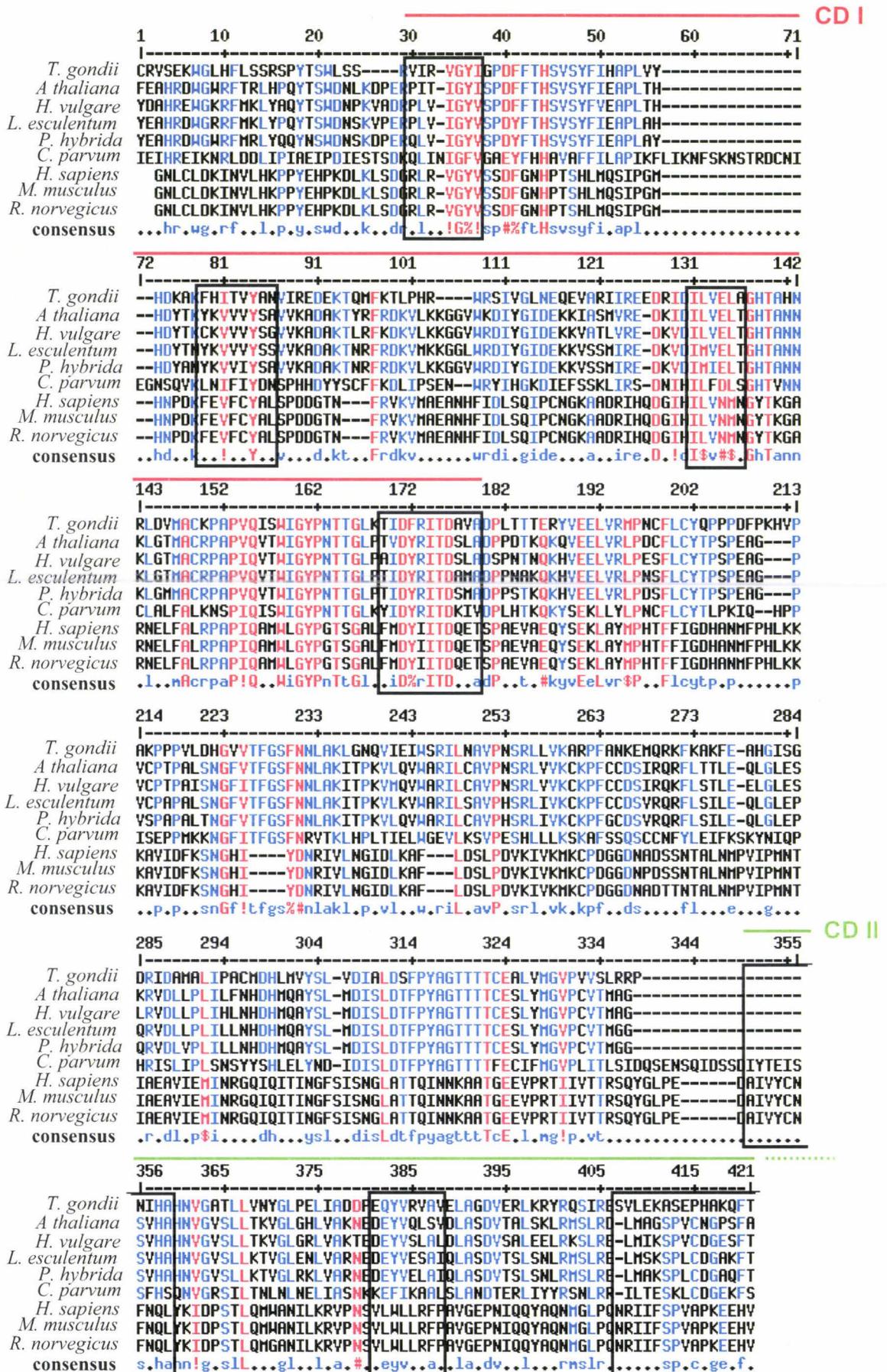


Figure 30 : Alignement de la séquence tronquée de 396 acides aminés de l'OGT putative de *T. gondii* avec les OGT de plantes, de mammifères et de *Cryptosporidium parvum*

L'alignement a été réalisé avec le logiciel Multalin de l'INRA Toulouse. Les barres rouges et vertes localisent les domaines CD I et CD II, respectivement. Les séquences encadrées correspondent aux séquences impliquées dans la catalyse de l'UDP-GlcNAc (dans le CD I) ou dans la fixation de l'UDP-GlcNAc (dans le domaine CD II).

La séquence de 1190 pb a été traduite et la séquence protéique obtenue a été alignée avec diverses OGTs de mammifères et de plantes et avec l'OGT putative de *Cryptosporidium parvum*, un autre parasite Apicomplexa (figure 30). L'analyse de cet alignement a révélé que la région amplifiée chez *T. gondii* code pour une partie de la région C-terminale catalytique de l'enzyme. Le domaine conservé CD I, permettant la catalyse de l'UDP-GlcNAc, est identique à celui des autres OGTs analysées. La séquence correspondant au domaine CD II n'a été que partiellement amplifiée. Ces deux domaines sont soulignés en rouge (CD I) et en vert (CD II) sur la figure 15, et les séquences en acides aminés directement impliquées dans la fixation de l'UDP-GlcNAc (CD II) ou dans la réaction catalytique (CD I) ont été encadrées. (Lazarus *et al.*, 2005).

Un arbre phylogénétique a été construit suite à cet alignement (figure 31).

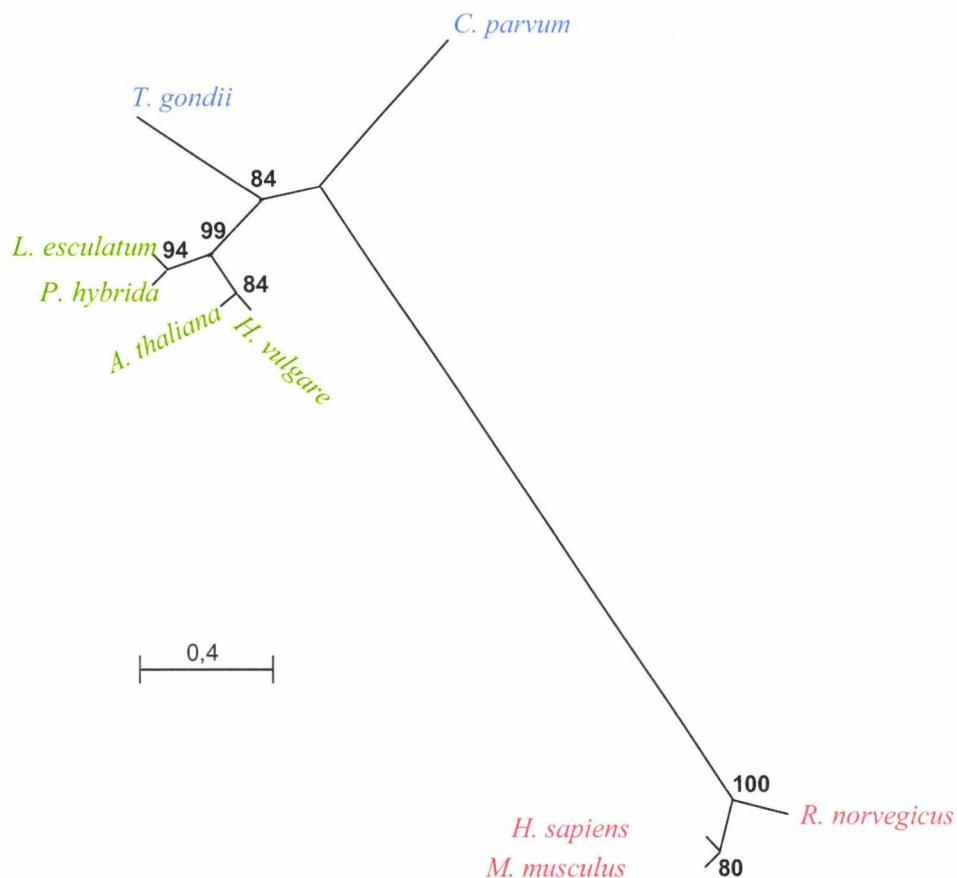
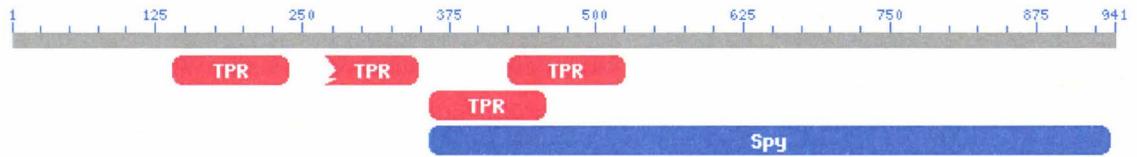


Figure 31 : Etude phylogénétique de l'OGT de *T. gondii*

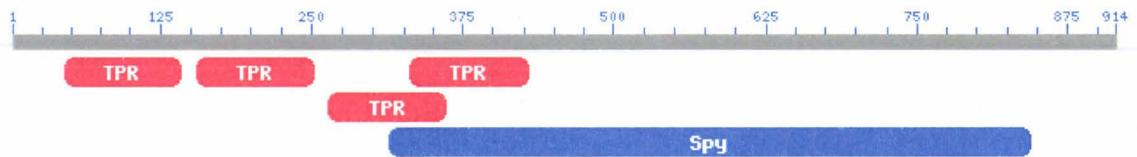
L'alignement des séquences d'OGT de 396 acides aminés (présenté en figure 30) a été soumis au programme Delgap afin d'éliminer les indels (insertions/délétions). Le nouvel alignement obtenu a été traité par Phylowin avec la méthode de Neighbor-joining (distance PAM) et la robustesse de l'arbre obtenu a été testée par un bootstrap de 500 réplifications.

L'arbre établi confirme que l'OGT du toxoplasme est plus fortement homologue des OGTs de plantes que des OGTs de mammifères. De manière surprenante, l'OGT du

T. gondii



A. thaliana



H. sapiens

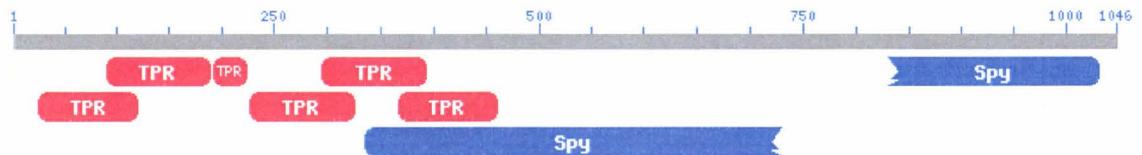


Figure 32 : Mise en évidence des domaines conservés de l'OGT putative de *T. gondii* avec les domaines des OGT de l'Homme et d'*Arabidopsis thaliana*

Les séquences protéiques des trois OGTs ont été soumises au programme CDD Search sur NCBI.

TPR : tétratricopeptide; Spy : domaine SPINDLY spécifique des protéines SPY, les OGTs végétales.

toxoplasme semble être plus proche des OGTs végétales que de l'OGT de *Cryptosporidium parvum*, un autre Apicomplexa. Cette observation peut être corrélée à la divergence évolutive de ces deux parasites, marquée par la perte de l'apicoplaste chez *C. parvum*.

Récemment, le génome séquencé et annoté du toxoplasme a permis d'identifier une OGT putative de 942 aa (n° d'accèsion : 59.m03683) qui est annotée en tant que protéine de transduction de signal, fortement homologue de l'OGT SPY des plantes. Grâce au logiciel CDD de NCBI, nous avons comparé les différents domaines présents dans les OGT du toxoplasme, d'*Arabidopsis thaliana* et de l'homme (figure 32). Nous avons confirmé que l'OGT du toxoplasme présente une architecture similaire à celle de l'OGT d'*Arabidopsis thaliana* avec quatre répétitions d'un motif tétratricopeptide (TPR) et un grand domaine SPY, caractéristique de la famille SPINDLY (figure 32). L'OGT de l'Homme est très différente de celles de *T. gondii* et d'*A. thaliana* puisqu'elle présente cinq répétitions du motif TPR et un domaine SPY tronqué en deux parties. Les différents motifs TPR présents dans ces protéines, représentés en rouge sur la figure, se chevauchent. Ceci est dû à la répétition des 34 acides aminés au sein d'un même motif TPR.

Cette analyse comparative des domaines de ces trois OGTs confirme bien l'appartenance de l'OGT du toxoplasme à la famille SPINDLY des plantes.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

Les émolases ENO1 et ENO2 de *T. gondii*, des protéines nucléaires régulant l'expression de gènes ?

En 2002, notre laboratoire a démontré *in vivo* la présence d'ENO1 et d'ENO2 dans le noyau des bradyzoïtes et des tachyzoïtes, respectivement (Ferguson *et al.*, 2002). Cette démonstration était basée sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux de lapin produits dans notre laboratoire (Dzierszynski *et al.*, 2001). Les épitopes antigéniques des émolases reconnus par ces anticorps n'avaient pas été identifiés, et la possibilité d'une réaction croisée des anticorps avec une protéine nucléaire présentant un épitope commun avec l'émolase ne pouvait être exclue. Les souches parasitaires transgéniques produites, exprimant ENO1 ou ENO2 étiquetée avec un épitope HA, ont permis de confirmer avec certitude la localisation nucléaire de ces deux enzymes glycolytiques, ordinairement retrouvées dans le cytoplasme.

Il avait été démontré que la localisation nucléaire de ces enzymes était fortement corrélée avec la réplication active des parasites (Ferguson *et al.*, 2002). En effet, au sein d'un kyste toxoplasmique, il a été observé que seuls les parasites en cours de division présentaient un signal nucléaire pour ENO1, les parasites en dormance présentant un signal cytoplasmique. De plus, cette étude a révélé que l'isoforme ENO1 spécifique du stade bradyzoïte était adressée très précocement dans le noyau des tachyzoïtes en cours de conversion dans le cerveau de souris.

Ces résultats suggéraient un adressage nucléaire des émolases à des moments-clés du cycle parasitaire, c'est-à-dire pendant la réplication active du parasite et au cours de l'interconversion tachyzoïte/bradyzoïte.

Nous avons d'abord entrepris d'établir la cinétique *in vitro* de l'adressage au noyau d'ENO2 dans les tachyzoïtes. Cette expérience de double immunofluorescence a mis en évidence une localisation majoritairement nucléaire de l'émolase dans les stades précoces de la réplication du parasite. En effet, le signal nucléaire de l'émolase est observé jusqu'à 32H de développement parasitaire alors que les parasites contenus dans des vacuoles de 48H présentent un signal apparemment cytoplasmique, juste avant leur sortie des cellules.

L'adressage nucléaire des émolases semble donc être finement déterminé au cours du développement intracellulaire du parasite.

Nous nous sommes ensuite particulièrement intéressés au rôle fonctionnel d'ENO2 et ENO1 au sein du noyau du parasite. Certains travaux recensés dans la littérature nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les émolases du toxoplasme pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression de gènes.

En effet, la localisation nucléaire des émolases n'est pas un phénomène exclusif au toxoplasme puisque des études précédentes ont montré que les émolases LOS2 d'*Arabidopsis thaliana* et MBP1 de l'Homme étaient également localisées dans le noyau (Lee *et al.*, 2002 ; Feo *et al.*, 2000). Chez ces deux organismes, le rôle de répresseur transcriptionnel de ces enzymes a été démontré. LOS2 réprime la transcription d'un répresseur des gènes de sensibilité au froid chez la plante tandis que MBP1 (un transcrit alternatif du gène *eno1*) inhibe la transcription du proto-oncogène *c-myc*.

La localisation nucléaire d'ENO1 dans le noyau des tachyzoïtes en cours de conversion en bradyzoïtes est un phénomène très précoce puisqu'ENO1 apparaît dans le tachyzoïte avant la P36, marqueur protéique spécifique du bradyzoïte (Ferguson *et al.*, 2002). L'émolase nucléaire ENO1 pourrait donc participer aux mécanismes moléculaires régissant le processus d'interconversion du tachyzoïte en bradyzoïte.

Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse en caractérisant des souches transgéniques sur-exprimant l'isoforme ENO1-HA de manière stable dans le stade tachyzoïte, l'inactivation du gène *eno1* n'ayant pu être réalisée avec succès. Le phénotype de ces souches ENO1-HA (souches E1-1 et E1-5) a été étudié. Nous avons ainsi testé l'expression potentielle d'antigènes spécifiques de bradyzoïte tels que les antigènes P18, P36 et P21. Les antigènes P18 et P36 sont des marqueurs précoces de la différenciation du tachyzoïte en bradyzoïte, tandis que l'antigène P21 est un marqueur tardif. L'analyse par immuno-empreinte des deux souches transgéniques E1-1 et E1-5 a révélé que ces souches présentent des profils d'expression protéiques différents. En effet, si les deux souches expriment la protéine P36, seule la souche E1-5 exprime également la protéine P18. Cette souche E1-5 exprime d'ailleurs plus intensément l'antigène P36, ce qui suggère un phénotype « bradyzoïte » plus prononcé que celui obtenu avec la souche E1-1.

Ces résultats semblaient corrélés à l'hypothèse d'une régulation des gènes au cours de l'interconversion par l'émolase ENO1. Cependant, les souches transgéniques sur-exprimant ENO2-HA (les souches E2-4 et E2-10) présentent elles aussi un signal P36 et l'une d'entre elles exprime également la P18. La sur-expression d'ENO2 semble donc

avoir les mêmes conséquences phénotypiques que la sur-expression d'ENO1 sur les tachyzoïtes de la souche 76K.

L'antigène P21 n'a été exprimé dans aucune des souches transgéniques analysées. Cette protéine, considérée comme un marqueur tardif de l'interconversion, marque l'étape de kystogenèse, suggérant que les parasites transgéniques obtenus sont des formes intermédiaires se situant entre le stade tachyzoïte et le stade bradyzoïte. De telles formes intermédiaires ont déjà été observées dans le cerveau de souris infectées (Ferguson et al., 2002) mais également *in vitro*, dans des cultures soumises à un stress inducteur de différenciation (Soète *et al.*, 1993). Il semble donc que la sur-expression de l'une ou l'autre des énoïases ne soit pas suffisante pour engendrer un phénotype bradyzoïte tardif. D'autres facteurs moléculaires doivent être nécessaires pour induire la kystogenèse des parasites.

Si l'expression des antigènes spécifiques de bradyzoïte dans les deux types de souches transgéniques indique un état de stress inducteur de différenciation chez le parasite, les facteurs responsables de l'expression de ces antigènes n'ont pas été caractérisés. En effet, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'apparition de ces antigènes spécifiques du stade bradyzoïte dans les souches sur-exprimant l'une ou l'autre des énoïases. Le phénotype observé peut être dû au nombre variable de copies de plasmides insérés dans le génome, et donc à la quantité surnuméraire d'enzyme produite, mais aussi à la localisation dans le génome de ces copies plasmidiques, l'interruption d'un gène *x* pouvant induire un stress chez le parasite. Alternativement, il se peut également que les sélections à la bléomycine aient pu induire un stress chez le tachyzoïte, la bléomycine étant un intercalant de l'ADN. Cet agent de sélection a donc pu altérer plusieurs gènes dans le génome du parasite, induisant un dysfonctionnement physiologique générant du stress.

Des expériences complémentaires s'avèrent nécessaires afin d'établir avec certitude que le phénotype observé est bien dû à la sur-expression des enzymes. La construction d'une souche transgénique exprimant uniquement la résistance à la bléomycine permettrait de vérifier que l'expression des antigènes spécifiques de bradyzoïtes est bien due à la sur-expression des enzymes et non à un stress engendré par la sélection à la bléomycine. De plus, la caractérisation génomique de ces mutants, c'est-à-dire la détermination du nombre de copies et de leur localisation dans le génome, permettrait d'éliminer l'éventualité de l'interruption d'un ou plusieurs gènes pouvant être impliqués dans la régulation négative des gènes spécifiques de bradyzoïtes.

D'autres aspects phénotypiques des souches transgéniques ont été étudiés, notamment la capacité des souches à envahir les cellules et à se multiplier au sein des vacuoles parasitophores. Les tests d'invasion et de multiplication réalisés n'ont montré aucune différence significative entre la souche sauvage 76K et les quatre souches transgéniques. Toutefois, ces tests n'ont été réalisés que deux fois et sur un nombre limité de cellules (500 par clone), et les écart-types obtenus suggèrent fortement de renouveler les comptages à plus grande échelle.

Des tests phénotypiques *in vivo* ont également été réalisés afin d'observer l'incidence de la sur-expression des émolases sur la virulence et la kystogénèse des souches transgéniques. Le test de virulence a mis en évidence une diminution de la virulence des souches E1-1, E1-5 et E2-4 par rapport à la souche sauvage 76K. L'atténuation de la virulence de ces souches peut être corrélée à l'expression des antigènes spécifiques de bradyzoïtes P36 et P18, démontrée dans les expériences d'immuno-empreintes.

Les souris infectées avec la souche transgénique E2-10 sont mortes deux et trois jours après l'infection, alors que les souris infectées avec les autres souches sont mortes dans des délais correspondant à ceux observés avec la souche virulente RH (environ dix jours après l'infection). Cette mort précoce nous a amené à écarter le résultat obtenu avec la souche E2-10, l'expérience ayant été réalisée une seule fois. En effet, nous avons supposé que la mort des souris n'était pas liée à l'infection mais à d'autres facteurs environnementaux. Il est toutefois possible que la sur-expression d'ENO2 ait engendré une virulence extrême de la souche E2-10, ce qui reste à confirmer. Chez *Streptococcus pneumoniae*, l'émolase, après sécrétion, est ré-associée à la surface du pathogène où elle joue le rôle de récepteur au plasminogène de la matrice extracellulaire de l'hôte (Bergmann *et al.*, 2001). Il a été avancé que dans ce cas, l'émolase pourrait jouer un rôle important dans l'initiation de la maladie, et notamment dans le processus d'invasion et dans la dissémination de la bactérie dans l'organisme de l'hôte. Ainsi, la sur-expression d'ENO2 dans la souche E2-10 pourrait avoir accéléré la dissémination du parasite dans la souris, entraînant la mort par lésions tissulaires généralisées. L'expérience est à renouveler afin de pouvoir conclure quant à la cause de la mortalité des souris observée avec la souche E2-10.

Les souris ayant survécu au test de virulence ont été sacrifiées afin d'étudier la kystogénèse des différentes souches testées. L'énumération des kystes n'a pas montré de différence flagrante entre les différentes souches transgéniques et la souche témoin 76K. La phase tardive du processus d'interconversion, la kystogénèse, ne semble donc pas avoir été perturbée par la sur-expression de l'une ou l'autre des émolases. Néanmoins,

l'expression des marqueurs précoces de la différenciation P36 et P18 pourrait indiquer que la sur-expression des émolases aurait un effet plutôt précoce au cours de l'interconversion. L'étude de la cinétique *in vitro* de la différenciation des tachyzoïtes transgéniques en bradyzoïtes pourrait confirmer le rôle des émolases dans l'initiation ou les stades précoces du processus de différenciation.

La fonction nucléaire des émolases dans le processus de différenciation ne pourra être clairement établie qu'une fois que les souches transgéniques auront été caractérisées de manière approfondie.

La O-N-Acétyleglucosaminylation est-elle impliquée dans la localisation nucléocytoplasmique des émolases ?

L'implication de la O-N-Acétyleglucosaminylation dans le transport nucléaire des protéines cytosoliques a été suggérée suite aux travaux de Duverger qui a montré que l'addition artificielle de résidus GlcNAc sur des protéines cytosoliques induisait leur translocation dans le noyau (Duverger *et al.*, 1993, 1995, 1996). D'autres travaux ont récemment permis de renforcer cette hypothèse. En effet, il a été observé que les formes nucléaires de certaines protéines portaient plus de résidus O-GlcNAc que leurs formes cytoplasmiques. Les travaux effectués sur les protéines c-Myc, Tau et Sp1 ont mis en évidence une corrélation entre la présence de O-GlcNAc sur ces protéines et leur localisation nucléaire. En effet, la O-GlcNAc semble être un marqueur de la localisation nucléaire de ces protéines alors que la phosphorylation signe leur localisation cytoplasmique (Kamemura et Hart, 2003 ; Lefebvre *et al.* 2003 ; Dauphinée *et al.*, 2005).

La présence de résidus O-GlcNAc sur l'émolase humaine (Wells *et al.*, 2002), également retrouvée dans le noyau des cellules, nous a amené à considérer l'implication de cette modification dans la répartition subcellulaire de l'émolase chez *T. gondii*. De plus, des études bioinformatiques ont mis en évidence des sites potentiels de O-GlcNAc sur les émolases du toxoplasme, ainsi que de nombreux sites de phosphorylation, suggérant la possibilité de l'existence d'une balance O-GlcNAc / phosphorylation régissant la localisation subcellulaire des émolases du parasite.

Une chromatographie d'affinité réalisée avec la lectine WGA (Wheat Germ Agglutinin) nous a permis de mettre en évidence la présence de la modification O-GlcNAc

sur ENO1 et probablement sur ENO2. En effet, les acides sialiques (reconnus par la WGA) ne semblent pas exister chez le toxoplasme et ENO1 ne possède pas de site de O-glycosylation classique, suggérant fortement que sa rétention sur la colonne WGA est due à la présence de monosaccharides O-GlcNAc. La présence effective de cette modification sur ENO2 ne peut être affirmée puisqu'ENO2 porte un site putatif de O-glycosylation classique, structure glycanique pouvant présenter des résidus GlcNAc en position terminale. Toutefois, on ne peut exclure que la rétention des émolases soit due à une protéine chaperonne fixant ces enzymes et possédant des résidus O-GlcNAc.

La présence de résidus GlcNAc (liés en O- ou terminant une chaîne O-glycanique) sur ENO2 a été confirmée par un marquage métabolique à la glucosamine tritiée. Cependant, le profil radioactif obtenu après immunoprécipitation d'ENO2 n'a révélé qu'une seule bande protéique à une taille approximative de 38 kDa, bande qui est également révélée précédemment dans l'éluat WGA par immuno-empreinte α -ENO2. Il n'existe probablement pas de site alternatif d'initiation de la transcription pouvant engendrer une émolase tronquée de 38 kDa (Kibe *et al.*, 2005). La récurrence de cette bande dans l'expérience WGA et dans ce marquage radioactif, ainsi que l'absence de bandes intermédiaires entre les formes de 48 et 38 kDa, suggèrent fortement que la forme de 38 kDa n'est pas un simple produit de dégradation consécutif à la manipulation du lysat. On peut supposer que l'émolase de 38 kDa est issue du clivage protéolytique spécifique de l'émolase de 48 kDa, intervenant à un moment donné du cycle parasitaire. La cinétique d'apparition de cette émolase de 38 kDa, ainsi que l'identification formelle de l'émolase de 48 kDa comme étant son précurseur reste à effectuer. Ceci sera démontré par une expérience de « pulse-chase » : un marquage métabolique avec des acides aminés sera réalisé sur un temps court et combiné à l'analyse de la cinétique d'apparition de la bande de 38 kDa au fil du temps.

Afin de montrer la présence effective de résidus O-GlcNAc liés en β sur des sérines ou thréonines d'ENO2, nous avons utilisé un outil très spécifique des sérines et thréonines modifiées par la β -O-GlcNAc, l'anticorps RL2. L'émolase a été purifiée par immunoprécipitation avec un anticorps anti-ENO2 avant d'être testée en immuno-empreinte par le RL2. Un signal a été obtenu à 48 kDa, poids moléculaire de l'émolase, mais nous avons observé que les chaînes lourdes des IgG, utilisées pour la purification de l'enzyme, migraient à la même taille que les enzymes dans un gel d'acrylamide. Ce problème technique a été contourné par l'obtention des parasites transgéniques exprimant des émolases-HA pouvant être séparées des émolases natives en gel d'acrylamide. Le RL2 a

alors été testé sur les émolases-HA (purifiées par immuno-précipitation avec un anticorps anti-HA) mais aucune bande positive n'a été révélée. Bien que nos études de bioinformatique aient montré qu'ENO2 possédait trois sites potentiels de O-GlcNAc tandis qu'ENO1 en porterait deux, il faut toutefois noter que l'anticorps spécifique RL2 n'est que très peu sensible et nécessite un nombre important de O-GlcNAc sur la protéine pour pouvoir donner un signal positif en immuno-empreinte.

Les parasites transgéniques exprimant stablement l'une ou l'autre des isoformes de l'émolase étiquetée avec l'épitope HA se révèlent être des outils particulièrement intéressants pouvant être utilisés pour démontrer avec certitude la présence ou non de O-GlcNAc lié en β sur ENO1 et ENO2. La présence de monosaccharides O-GlcNAc lié en β sur les sérines ou thréonines des émolases pourra être démontrée par un marquage métabolique à la glucosamine sur les parasites transgéniques. Les émolases-HA seront purifiées et soumises à une β -élimination réductrice. Les sucres issus de cette β -élimination pourront être caractérisés par chromatographie sur Dionex.

L'utilisation de la galactosyltransférase bovine, enzyme greffant un résidu de galactose sur un monosaccharide O-GlcNAc, pourrait également permettre d'identifier des O-GlcNAc sur les émolases-HA.

La démonstration irréfutable de la présence de O-GlcNAc est donc devenue possible grâce à l'obtention de deux types de souches transgéniques, exprimant soit ENO2-HA, soit ENO1-HA. Les souches sur-exprimant ENO1-HA sont d'autant plus utiles qu'elles vont autoriser la production et la purification d'une grande quantité d'ENO1 de bradyzoïte.

Les expériences décrites ci-dessus ne nous ont pas permis de conclure de manière catégorique quant à la présence de résidus O-GlcNAc sur les émolases, mais ont toutefois appuyé notre hypothèse de départ concernant l'implication de ce monosaccharide dans la localisation subcellulaire des deux enzymes.

Afin de démontrer l'implication potentielle de la O-GlcNAc dans la localisation subcellulaire d'ENO2, nous avons testé sur le tachyzoïte de la souche 76K des drogues caractérisées pour leurs actions sur les enzymes de la O-GlcNAc : l'alloxan, inhibiteur de l'enzyme greffant les O-GlcNAc sur les protéines, l'OGT, et la streptozotocine, inhibiteur de l'enzyme hydrolysant les O-GlcNAc, la O-GlcNAcase. La modification O-GlcNAc étant essentielle chez les mammifères et impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, nous avons d'abord testé ces drogues, à diverses concentrations, sur les

tachyzoïtes en développement intracellulaire mais aucun effet sur la croissance parasitaire n'a été observé. Des tests complémentaires, combinés à de l'immunofluorescence et des partitions nucléo-cytoplasmiques, n'ont révélé aucune incidence des inhibiteurs sur la répartition subcellulaire d'ENO2.

Chez *C. elegans*, l'inactivation du gène de l'OGT n'est pas létale (Hanover *et al.*, 2005), suggérant que la modification O-GlcNAc n'est pas essentielle dans tous les organismes, ce qui peut être le cas chez *T. gondii*. Alternativement, ces drogues pourraient ne pas traverser les trois membranes (cellulaire, vacuolaire et parasitaire) et donc ne pas pouvoir inhiber les enzymes de la O-GlcNAc du parasite. De ce fait, l'absence de modification de la répartition subcellulaire d'ENO2 en présence de l'alloxan ou de la streptozotocine pourrait être due à une inaccessibilité des inhibiteurs.

Nous avons également muté les sérines potentiellement modifiables par la O-GlcNAc par des résidus de valine dans la séquence d'ENO2. Les trois sites ont été mutés indépendamment et les constructions ont été transfectées dans des tachyzoïtes de la souche 76K. Ces mutations n'ont pas modifié la répartition nucléo-cytoplasmique d'ENO2. Le triple mutant, qui n'a pu être obtenu, pourrait ne plus porter de O-GlcNAc, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la localisation subcellulaire de l'enzyme. Cette hypothèse reste à confirmer par la réalisation de la construction du triple mutant.

Nous avons émis l'hypothèse que l'absence d'effet des inhibiteurs des enzymes de la O-GlcNAc sur les parasites pourrait également être due à la différence évolutive et structurale entre les enzymes parasitaires et celles des mammifères. Afin d'élucider cette question, nous nous sommes intéressés à l'enzyme OGT du toxoplasme.

Mise en évidence d'une OGT de type SPY chez *T. gondii*

La rétention des énoïases sur la lectine WGA et l'inefficacité de la drogue alloxan sur le parasite nous ont amené à l'étude de l'OGT du toxoplasme. Cette protéine n'avait pas été identifiée chez le parasite *T. gondii*, aussi nous avons entrepris d'identifier le gène correspondant. Les différentes prédictions bioinformatiques effectuées ont permis de cloner un fragment de 1190 pb, qui a pu être amplifié à la fois chez le tachyzoïte et le bradyzoïte à partir d'ADNc. Le gène putatif est donc transcrit dans les deux stades, et

apparemment de manière constitutive, ce qui confirme les résultats obtenus avec la lectine WGA. Ce fragment a été séquencé et traduit et la protéine tronquée obtenue a été analysée par Blast. Ces recherches ont révélé une forte homologie de l'enzyme avec les OGTs de plantes, les protéines SPINDLY (48% d'identité avec l'OGT SPY d'*A. thaliana*). La protéine tronquée, dont la séquence codante a été amplifiée par RT-PCR, correspond à la partie C-terminale de l'enzyme OGT. L'analyse des séquences contenues dans le domaine catalytique CD I de cette partie C-terminale a révélé que le site catalytique de l'OGT du toxoplasme était identique à celui des OGTs de plantes mais aussi de mammifères. Cette observation suggère que la drogue alloxan devrait être active sur l'OGT du toxoplasme, d'autant plus que cet inhibiteur est un analogue de l'uracile et est donc peu spécifique. Notre hypothèse selon laquelle la drogue n'aurait pas passé les membranes entourant le parasite est ainsi renforcée. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que l'alloxan soit inefficace sur les OGT de type végétal. Le domaine de fixation de l'UDP-GlcNAc (CD II) n'a pu être analysé dans son intégralité. Le début de séquence analysé montre l'absence d'homologie avec le CD II des OGTs de mammifères mais une forte homologie avec le CD II des OGTs de plantes.

Il apparaît donc que l'OGT putative du toxoplasme est un homologue des protéines SPY des plantes.

L'activité transférasique de résidus GlcNAc de la protéine SPY a été démontrée grâce à la production de la protéine recombinante dans les baculovirus (Thornton *et al.*, 1999) mais la modification O-GlcNAc en elle-même n'a jamais été mise en évidence sur les protéines végétales. Une étude concernant des protéines du pore nucléaire dans des protoplastes a révélé l'existence de GlcNAc terminaux mais contrairement à ce qui a été démontré chez les mammifères (O-GlcNAc simple), ces modifications des protéines nucléaires sont constituées d'au moins cinq résidus de monosaccharide (Heese-Peck *et al.*, 1995).

Nous avons réalisé une étude phylogénique de l'OGT putative du toxoplasme *versus* les OGTs de plantes, de mammifères mais aussi celle de *Cryptosporidium parvum*, un autre parasite de la famille des Apicomplexa qui ne possède pas d'apicoplaste. L'arbre obtenu a signé l'appartenance de l'OGT putative du toxoplasme à la famille SPINDLY, puisqu'elle est beaucoup plus proche des enzymes de plantes que des enzymes de mammifères. De plus, de manière surprenante, l'OGT putative du toxoplasme semble plus proche de celle des plantes que de celle de *C. parvum*, malgré leur appartenance à la même famille. Le gène codant pour l'OGT chez *T. gondii* pourrait provenir du gène de l'algue

ingérée au cours du processus d'endosymbiose secondaire tandis que le gène de l'OGT chez *C. parvum* pourrait être issu de l'ancêtre ayant ingéré l'algue.

Le clonage de l'ORF complète de l'OGT du toxoplasme (par RACE PCR) et la production de la protéine recombinante s'avère nécessaire pour l'identification des caractéristiques enzymatiques et de la fonction exacte de cette protéine chez le parasite.

L'OGT putative de *T. gondii* a été récemment mise en ligne sur ToxoDB et est annotée en tant que protéine de transduction de signal. La littérature relate en effet que les OGT sont directement impliquées dans la régulation de nombreuses voies de signalisation.

L'OGT de *T. gondii* pourrait donc être un acteur moléculaire impliqué dans des voies de signalisation chez le parasite et notamment dans le processus de différenciation. Cette dernière hypothèse peut être illustrée par certains travaux réalisés à la fois chez *T. gondii* et chez les mammifères.

En effet, chez les mammifères, l'OGT fait partie des molécules de signalisation régissant la réponse au stress, puisqu'une diminution du taux de protéine OGT induit l'absence de réponse au stress dans les cellules (Zachara *et al.*, 2004). De plus, une période de stress prolongé est suivie d'une augmentation de l'activité de l'OGT, suggérant un rôle protecteur de cette protéine contre le stress (Zachara *et al.*, 2004). Récemment, une étude a montré que l'augmentation de la O-GlcNAc protégeait la cellule d'un choc thermique (Sohn *et al.*, 2004) et était accompagnée d'une augmentation des taux de HSP70 et 40 (Zachara *et al.*, 2004). Il a également été montré que certaines HSP possédaient une activité lectinique envers les GlcNAc, renforçant l'hypothèse du rôle de la O-GlcNAc dans la réponse au stress (Guinez *et al.*, 2004).

Chez *T. gondii*, l'induction d'un homologue d'HSP70 pendant l'interconversion a été démontrée (Weiss *et al.*, 1998). De même l'augmentation des taux d'ARNm et protéiques d'HSP90 ont également été observé au cours de la différenciation (Echeverria *et al.*, 2005). Ces observations, corrélées à celles décrites ci-dessus chez les mammifères, suggèrent fortement que l'OGT pourrait être impliquée dans la réponse au stress chez le parasite, et par conséquent dans le processus de différenciation.

L'identification de la fonction de l'OGT pourra être investie lorsque la séquence codante complète sera clonée. L'inactivation du gène pourra être tentée et en cas de létalité, le système d'induction tétracycline-dépendant développé par D. Soldati permettra de diminuer de manière significative l'expression de l'OGT (Meissner et Soldati, 2002).

L'analyse des mutants produits permettra d'établir la fonction de cette enzyme putative dans le parasite protozoaire *T. gondii*.

CONCLUSION

Conclusion

Les travaux effectués pendant cette thèse ont permis de mettre en évidence pour la première fois chez *Toxoplasma gondii*, et chez les Protozoaires en général, l'existence de la O-N-acétylglucosaminyl transférase, ou OGT. L'analyse par alignement et par phylogénie de cette OGT a révélée que cette enzyme parasitaire appartenait à la famille des OGTs végétales, la famille SPINDLY. La découverte de l'enzyme OGT chez le toxoplasme ouvre de nouvelles perspectives quant à l'élucidation de certains mécanismes impliqués dans le processus de différenciation, notamment la réponse au stress environnemental subi par le parasite lors de l'infection de l'hôte.

Par ailleurs, nous avons montré qu'ENO1, l'énolase spécifique du stade bradyzoïte, était un substrat de cette enzyme et qu'elle portait un ou plusieurs résidus O-GlcNAc, attestant de l'activité de cette enzyme dans le parasite. La modification post-traductionnelle O-GlcNAc apporte un degré de complexité supplémentaire dans la régulation des voies physiologiques de cet organisme unicellulaire. La O-GlcNAc pourrait avoir de nombreuses fonctions chez *T. gondii* tout comme chez les mammifères (régulation des fonctions de facteurs de transcription, stabilisation de complexes, compétition avec la phosphorylation, stabilisation des protéines et localisation subcellulaire).

Nous avons testé l'une de ces fonctions, à savoir le rôle de la O-GlcNAc dans la localisation nucléo-cytoplasmique des deux émolases ENO1 et ENO2. Ces deux protéines, localisées dans le noyau à des moments clés du cycle parasitaire pourraient avoir une fonction de régulation génique. En outre, ces enzymes glycolytiques peuvent porter des résidus O-GlcNAc (démontré pour ENO1). La O-N-acétylglucosaminylation et la phosphorylation pourraient être impliquées dans leur localisation subcellulaire ou/et dans la régulation de leurs fonctions nucléaires. De plus, les résidus O-GlcNAc présents sur les émolases pourraient être également impliqués dans la stabilisation du dimère ou dans l'activité glycolytique cytoplasmique.

MATERIELS ET METHODES

Matériels et Méthodes

1) *Toxoplasma gondii*

La souche parasitaire utilisée au cours de ce travail est la souche 76K, isolée chez le cobaye (Laugier et Quilici, 1970). La 76K est une souche avirulente kystogénique : elle produit des kystes dans le cerveau des souris infectées.

1) Entretien des parasites

Les tachyzoïtes sont cultivés *in vitro* sur des "monocouches" à confluence de fibroblastes humains HFF (Human Foreskin Fibroblasts), lignée primaire à multiplication limitée. Ces cellules hôtes sont cultivées en atmosphère humide sous 5 % de CO₂ à 37°C dans du milieu DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium, Biowhittaker) contenant 10% (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté 30 minutes à 56°C, 4mM de glutamine (Sigma) et 0,05mg/ml de gentamicine (Sigma) (DMEM complet). Le tapis cellulaire est stable jusqu'à 3 semaines. Lorsque les cellules sont confluentes, le tapis cellulaire peut être décollé pour des divisions au 1/3 (surface/surface) à l'aide d'une solution de trypsine (trypsine 0,05%, EDTA 0,1%).

2) Purification des parasites

Avant la sortie des tachyzoïtes de leurs vacuoles, les cellules HFFs sont décollées à l'aide d'un grattoir et la culture est passée dans un homogénéisateur de Dounce (10 allers et retours). Les parasites sont alors libérés des HFFs et les débris cellulaires sont éliminés par filtration sur colonne de fibre de verre puis sur membrane de polycarbonate de porosité 3µm (Nucléopore®, Corning). Un aliquot du filtrat est déposé sur une lame de Malassez pour comptage. La suspension est centrifugée à 2000 rpm à 4°C pendant 15 minutes, le surnageant est éliminé et le culot parasitaire est lavé deux fois dans du PBS (« Phosphate Buffered Saline » [50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4 ; 150 mM NaCl]). Le culot de parasites peut être utilisé de suite ou congelé à -20°C.

Les kystes toxoplasmiques sont purifiés à partir de cerveaux de souris, 6 semaines après l'infestation de ces dernières. Le cerveau prélevé est broyé dans 4 mL de PBS avec un homogénéisateur de Potter. La suspension est centrifugée à 1000 rpm pendant 5 min à température ambiante. La purification des kystes s'effectue selon le protocole de Cornelissen (Cornelissen *et al.*, 1981) : le culot est repris par 2,5 mL de Percoll isotonique

[90% de Percoll (Sigma) ; 10% de NaCl 1,5M] et par du PBS, qsq 7,5 mL, puis le tube est centrifugé 15 min à 2000 rpm. Le culot, essentiellement constitué des kystes contaminés par quelques cellules et des hématies, est repris dans 5 mL de PBS et centrifugé 10 min à 1000 rpm. Les hématies sont éliminées par un traitement rapide avec une solution de lyse [9 volumes de NH₄Cl 0,15 M / 1 volume de Tris-HCl 20 mM, pH7,4] et les kystes sont lavés à deux reprises dans du PBS.

Les bradyzoïtes peuvent être libérés par digestion de la paroi kystique. Les kystes sont incubés dans une solution de pepsine isotonique [pepsine-HCl 0,05% (p/v), pH 2 ; NaCl 170 mM] pendant 5 à 10 min à 37°C. Les bradyzoïtes libérés sont lavés dans du milieu DMEM complet afin de neutraliser l'action de la pepsine et centrifugés à 2000 rpm pendant 10 min. Le culot obtenu est utilisé immédiatement ou congelé à -20°C.

II) Biochimie

1) Préparation d'extraits cytosoliques et nucléaires

Des culots de 2,5.10⁹ tachyzoïtes ou 10⁹ bradyzoïtes sont respectivement resuspendus dans 2 mL de tampon A (10 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,1 M EDTA, 0,65% NP40, 0,5 mM PMSF, cocktail d'inhibiteurs de protéases). La suspension est incubée 10 minutes sur la glace puis centrifugée à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant le cytosol est aliquoté. Le culot est alors resuspendu dans 200 µL de tampon B (20 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,2 M EDTA, 25% glycérol, 0,2 mM PMSF, cocktail d'inhibiteurs de protéases). La suspension est incubée 15 minutes sur la glace puis centrifugée à 14000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant l'extrait nucléaire est aliquoté. Les extraits cytosoliques et nucléaires sont conservés à -80°C.

2) Chromatographie d'affinité sur WGA (Wheat Germ Agglutinin)

Les culots de tachyzoïtes ou de bradyzoïtes purifiés sont repris dans 300 µL de tampon de lyse NP40 (0,01 M Tris-HCl pH 7,5 ; 0,15 M NaCl ; 1 mM CaCl₂ ; 0,5% NP40 ; cocktail d'inhibiteurs de protéases). La lyse s'effectue en chambre froide sur agitateur rotatif pendant 1 heure. 700 µL de tampon de lyse sans NP40 sont ajoutés au lysat (0,1% NP40 final), ainsi que du PMSF/DMSO (1mM final) et du MnCl₂ (1mM final). Le lysat dilué est centrifugé pendant 15 minutes à 14000 rpm à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est incubé avec 100 µL de billes de sépharose couplées à la

WGA toute une nuit à 4°C sur un agitateur rotatif. Les tubes sont alors centrifugés pendant 2 minutes à 4000 rpm, le surnageant est éliminé et plusieurs lavages sont effectués (un lavage PBS à 4°C, deux lavages PBS à température ambiante, un lavage PBS-NaCl 0,5M à température ambiante, un lavage Tris/HCl 62,5 mM pH 6,8 à température ambiante). Les billes sont reprises dans 100 µL de tampon de reprise sans bleu de bromophénol ni DTT (dithiothréitol) (Tris/HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2% p/v ; saccharose 10% p/v). Les protéines fixées sur les billes sont éluées en chauffant le tube à 100°C pendant 5 min. Le tube est ensuite agité sur vortex pendant 2 min. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et est utilisé immédiatement ou conservé au congélateur à -20°C.

3) Immunofluorescence indirecte in vitro

Des cellules HFFs sont cultivées sur des lamelles de verre disposées dans les puits d'une plaque de culture. Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont infectées par 2×10^5 parasites par puits. Quatre heures après l'infection, le milieu DMEM complet est renouvelé et les parasites se développent pendant 24, 32 ou 48 heures. Après un lavage PBS, les cellules sont fixées par une solution de paraformaldéhyde à 4% préparée extemporanément en PBS, pendant 30 minutes à température ambiante. Deux lavages PBS sont effectués et les lamelles sont conservées à 4°C.

Les cellules sont perméabilisées pendant 30 minutes par une solution de Triton X-100 à 0,2% préparée dans du PBS. Les lamelles sont incubées avec une solution de saturation (0,1% Triton X-100, 10% de sérum de veau fœtal dans du PBS) pendant 30 minutes. Les lamelles sont alors incubées pendant 30 minutes avec le premier anticorps dilué dans une solution PBS-TS (PBS / Triton X-100 0,1% / SVF 1%). Après plusieurs lavages en PBS-TS, l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome est appliqué pendant 30 minutes puis 3 lavages en PBS-TS sont à nouveau effectués.

Lors d'une expérience de double immunofluorescence, un second anticorps primaire (dont l'origine est différente du premier anticorps) est incubé avec les lamelles puis un second anticorps secondaire couplé à un fluorochrome différent du premier est appliqué. Trois lavages en PBS-TS sont enfin effectués. Afin de marquer les noyaux des cellules et des parasites, du DAPI dilué au 1/5000^{ème} dans du PBS est appliqué sur les lamelles avant un dernier lavage en PBS-TS.

Les lamelles sont enfin montées dans du liquide de montage d'immunofluorescence (Immuno-Fluore Mounting Medium, MP Biomedicals). La fluorescence est visualisée avec un microscope Zeiss Axioplan relié à une caméra permettant de prendre des photos.

4) Séparation des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide en conditions dénaturantes

Les échantillons parasitaires sont repris dans le tampon de reprise [Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 ; SDS 2% (p/v) ; saccharose 10% (p/v) ; bleu de bromophénol 0,2% (p/v)] et chauffés à 100°C pendant 5 min. En conditions réductrices, du DTT est ajouté à la concentration finale de 0,1M avant la dénaturation.

Pour les mini-gels SDS-PAGE, le gel de séparation contenant 7,5 à 10% d'acrylamide/bisacrylamide (29 :1) est préparé dans le tampon [Tris-HCl 375 mM, pH 8,8 ; SDS 0,1%] et coulé entre une plaque de verre et une plaque d'alumine. Pour les grands gels, le gel d'acrylamide est coulé entre 2 plaques de verres. Le gel de concentration à 5% d'acrylamide/bisacrylamide (29 :1) est préparée dans la solution [Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 ; SDS 0,1%]. L'électrophorèse est réalisée sous un courant constant de 30 mA pour les minigels (une heure de migration) et de 40 mA pour les grands gels (migration sur la nuit). La calibration des gels est basée sur la migration de marqueurs de poids moléculaires protéiques (LMW, Amersham Pharmacia).

5) Electrotransfert et immuno-empreinte (« Western Blot »)

Les protéines sont transférées du gel d'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,2 µm (Hybond, Amersham Biosciences) à l'aide d'un appareil de transfert en liquide (Bio-Rad). Le gel est placé sur la membrane de nitrocellulose et l'ensemble est inséré entre 2 feuilles de papier Whatman 3MM imprégnées du tampon de transfert [tris 25 mM ; glycine 190 mM ; 0,02% SDS ; éthanol 20%]. Le transfert est réalisé sous voltage constant de 80 V pendant 1 heure pour les mini-gels ou sous courant constant de 250 mA pendant 3 heures pour les grands gels. La membrane est alors colorée par une solution de rouge Ponceau 0,2% (p/v) dans l'acide trichloroacétique 3% (v/v) puis rincée à l'eau.

La détection de protéines est effectuée par réaction immuno-chimique, sous agitation et à température ambiante. La membrane de nitrocellulose est saturée pendant 30

min dans du TNT [Tris-HCl 15 mM, pH 8 ; NaCl 140 mM ; Tween-20 0,05% (p/v)] contenant 5% (p/v) de lait écrémé (Gloria™). L'incubation avec les anticorps primaires est réalisée en TNT/lait pendant une heure. Après 3 lavages en TNT de 15 min, l'anticorps secondaire anti-Ig de souris ou de lapin conjugué à la peroxydase (Sigma), dilué au 1/10000^{ème} dans le TNT/lait, est incubé sur la membrane pendant 1 heure. Après 3 lavages, la membrane est incubée pendant 5 min avec une solution composée de 2 réactifs (1 : 1) de révélation par chimioluminescence (ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham Biosciences). La détection est effectuée par exposition de la membrane emballée dans du film Saran contre un film photographique (HyperFilm, Amersham Biosciences).

6) Tests de drogues

6.1) Tests de croissance

Des cellules HFF sont cultivées dans des plaques de culture 24 puits. A confluence, les cellules sont infectées par $2,5 \times 10^5$ parasites / puits. Quatre heures après l'infection, le milieu est remplacé par du DMEM complet additionné de la drogue testée (alloxan ou streptozotocine) à différentes concentrations (dilutions sérielles de 10^{-2} à 10^{-9} M). Vingt-quatre heures plus tard, 2 μ Ci d'uracile marquée sont ajoutés à chaque puits contenant des parasites. Les cellules HFF seules sont également marquées à l'hypoxanthine radioactive (2 μ Ci par puits). Le marquage est réalisé pendant 8 heures. Après élimination du milieu radioactif, 1 mL de tampon HBSS (100 μ g/mL d'uracile, 1% SDS, dans du PBS) et 250 μ L de TCA (acide trichloroacétique) froid sont ajoutés sur les puits, dont le fond est gratté avec un cône, sur la glace. Les plaques sont incubées à 4°C toute une nuit. Le lendemain, le contenu de chaque puits est déposé sur un filtre GF/C Whatman, préalablement mouillé avec de l'ATCA 5% (acide trichloroacétique dilué à 5% dans de l'eau) et disposé sur une unité de filtration. Chaque filtre est ensuite lavé 3 fois avec 5 mL d'ATCA 5%, puis avec 1 mL d'éthanol 100% froid. Les filtres sont alors mis à sécher sous hotte avant d'être disposés dans des fioles de comptage contenant 4 mL de liquide à scintillation. Le contenu de la fiole est mélangé par inversement puis la fiole est disposée dans des racks afin d'effectuer le comptage.

6.2) Effet des drogues sur la localisation subcellulaire d'ENO2

Le protocole est identique à celui détaillé pour l'immunofluorescence indirecte mais lorsque l'on renouvelle le milieu 4 heures après l'infection, la drogue testée est ajoutée au DMEM complet.

7) Extraction au phénol / chloroforme

Le volume de la solution d'ADN à purifier est ajusté à 500 µL avec de l'eau PPI puis 500 µL de phénol pH 7,5 sont ajoutés. Le tube est agité vigoureusement sur vortex et centrifugé deux minutes afin de séparer la phase aqueuse de la phase phénolique contenant les protéines. La phase aqueuse supérieure est récupérée et une deuxième extraction au phénol est effectuée. Les 500 µL de phase aqueuse récupérés sont mélangés à 500 µL de chloroforme afin d'éliminer les traces de phénol. Le tube est agité sur vortex et centrifugé deux minutes. La phase aqueuse est alors répartie dans 2 tubes. L'ADN est précipité par l'ajout de NaCl (0,3 M final) et de 3 volumes d'éthanol absolu froid, à -20°C sur la nuit. Le lendemain, le tube est centrifugé à 14000 rpm pendant 30 min et le surnageant est éliminé. Le culot est alors lavé par 1 mL d'éthanol à 70% et une dernière centrifugation de 15 min à 14000 rpm est effectuée. Le culot est séché sous cloche et l'ADN est enfin resuspendu dans du cytomix.

8) Dosage protéique par la méthode de Bradford

Les protéines sont dosées à l'aide de la solution Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). L'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une gamme étalon est réalisée avec la sérumalbumine bovine afin de déterminer la concentration protéique des échantillons.

Quatre microlitres des échantillons à doser sont mélangés à 1 mL de la solution Bio-Rad diluée au 1/5^{ème}. Après 5 min de réaction à température ambiante, la DO est mesurée après étalonnage de l'appareil avec le blanc (solution Bio-Rad).

9) Marquage métabolique à la glucosamine tritiée et immunoprécipitation anti-ENO2.

Deux boîtes de 150 cm² contenant un tapis confluent de cellules HFF sont infectées par la souche 76K. Le milieu DMEM est renouvelé six heures après l'infection. Après 48H de développement intracellulaire, le milieu DMEM est aspiré et remplacé par le milieu de marquage (RPMI sans glucose, contenant 4mM de glutamine et supplémenté par

0,05mg/ml de gentamycine et de fructose à 4,5 g/L). L'équivalent de 200 μ Ci de glucosamine tritiée est alors ajouté dans le milieu. Après lyse des cellules par les parasites, le fond des boîtes est gratté à l'aide d'un grattoir jetable puis les parasites sont purifiés sur colonne de fibres de verre comme décrit précédemment. Le culot de parasites obtenu est lysé par 500 μ L de tampon de lyse NP40 pendant une heure sur agitateur rotatif en chambre froide. Le lysat est ensuite centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min. Le marquage radioactif est contrôlé par comptage des coups par minute (cpm). Dix microlitres du lysat sont déposés dans un tube à hémolyse contenant un millilitre d'eau PPI supplémenté à 0,1 M de N-Acétyleglucosamine froide. Les protéines sont précipitées par 1 mL de TCA à 25% froid pendant deux heures à 4°C. La solution est ensuite déposée sur un filtre Whatman sur une unité de filtration. Le filtre est lavé par de l'ATCA 5%, séché sous hotte et déposé dans une fiole de comptage contenant 4 mL de liquide à scintillation. Une fois le marquage vérifié par comptage, le lysat est dilué avec du tampon de lyse sans NP40 (0,1% NP40 final). Le lysat dilué est supplémenté en PMSF/DMSO (5 mM) et incubé avec 50 μ L de billes couplées à des IgG anti-ENO2 de lapin. L'immunoprécipitation est réalisée sur agitateur rotatif en chambre froide pendant une nuit. Le lendemain, les billes sont lavées deux fois avec du PBS à 4°C puis un troisième lavage en PBS est réalisé à température ambiante. Les billes sont enfin lavées avec du PBS-NaCl 0,5M puis du Tris-HCl 62 mM. L'éluat est réalisé par l'ajout de 100 μ L de tampon de reprise 2X. L'éluat est aliquoté et conservé à -20°C.

III) Bioinformatique

1) Récupération et alignement des séquences

Toutes les séquences ont été récupérées sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, par interrogation des banques de données protéiques. Les numéros d'accension sont référés dans le tableau ci-dessous. Les alignements de séquences ont été réalisés grâce au programme Clustal W, disponible sur le site d'infobiogen ou avec le programme Multalin (INRA, Toulouse).

Nom de la protéine et organisme	N° d'accension
ENO2 <i>Toxoplasma gondii</i>	AAD51128.1
ENO1 <i>Toxoplasma gondii</i>	AAG60329.1
LOS2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	P25696
MBP-1 <i>Homo sapiens</i>	P22712
SPY <i>Arabidopsis thaliana</i>	AAC49446.1
SPY <i>Hordeum vulgare</i>	AAC36055.1

SPY <i>Lycopersicon esculentum</i>	CAC85169.1
SPY <i>Petunia x hybrida</i>	CAA76834.1
OGT <i>Homo sapiens</i>	NP_858059.1
OGT <i>Mus musculus</i>	NP_631883.2
OGT <i>Rattus norvegicus</i>	NP_058803.1
OGT <i>Cryptosporidium parvum</i>	EAK88456.1
OGT putative <i>Toxoplasma gondii</i>	59.m03683

2) Recherche de sites potentiels

Les séquences protéiques des quatre émolases ont été soumises aux programmes YinOYang 1.2 et NetPhos 2.0 pour la recherche, respectivement, des sites potentiels de O-GlcNAc et de phosphorylation.

3) Identification de l'ORF codant l'OGT

A l'époque de nos recherches sur l'OGT, le génome de *Toxoplasma gondii* n'avait pas encore été totalement séquencé et annoté.

Grâce à une recherche par les mots-clés « O-GlcNAc » et « transférase » dans Toxo.DB (« Text Search »), nous avons obtenu le numéro d'un contig, TGG_994309, possédant une séquence dont la traduction présentait une homologie avec les OGT de *Caenorhabditis elegans*, de l'homme et du rat. Après délimitation des bornes de la séquence du contig répondant au Blast (de 180000 à 200000 nt), la séquence a été analysée dans NCBI (tblastP) et les résultats obtenus ont montré des alignements significatifs avec les OGT de plantes (SPINDLY) puis avec les OGT de mammifères. La présence des introns dans la séquence génomique diminuant les homologies entre les séquences, la séquence a été traitée indépendamment par trois logiciels de bioinformatique permettant l'excision des introns putatifs (Eukaryotic GeneMark, GeneWise et Wise2).

Les séquences obtenues se sont révélées différentes en 5' et 3'. Des amorces ont été choisies pour amplifier ces séquences de l'ATG au codon stop, sans succès, probablement à cause d'une mauvaise prédiction des exons terminaux. D'autres amorces ont alors été choisies dans une région parfaitement conservée chez les OGT. Un fragment de 200 pb a été amplifié puis séquencé et la séquence obtenue a été utilisée pour choisir d'autres amorces afin d'effectuer des RACE PCR pour obtenir l'ORF complète. L'expérience s'est révélée infructueuse après plusieurs essais.

Les trois prédictions obtenues ont alors été alignées dans Clustal W, ce qui a mis en évidence une région nucléotidique identique pour les trois séquences. Des amorces choisies aux extrémités de cette région ont permis l'amplification d'une séquence de 1190 nt (amorces OGT sens et OGT antisens, annexe 1) dont le séquençage puis l'analyse par Blast, après traduction, ont confirmé son appartenance à la famille SPINDLY. Cette portion de l'OGT putative du toxoplasme a été alignée (logiciel Multalin de l'INRA Toulouse) avec les régions correspondantes d'OGT de mammifères et de plantes. L'alignement a été traité par le programme Delgap afin d'éliminer les régions d'indels (insertions/délétions). Le nouvel alignement obtenu a été soumis à une analyse phylogénétique dans le programme Phylowin. Un arbre phylogénétique a été obtenu en utilisant la méthode Neighbor Joining (distance PAM) et la robustesse de l'arbre a été testée en réalisant un bootstrap de 500 répliques.

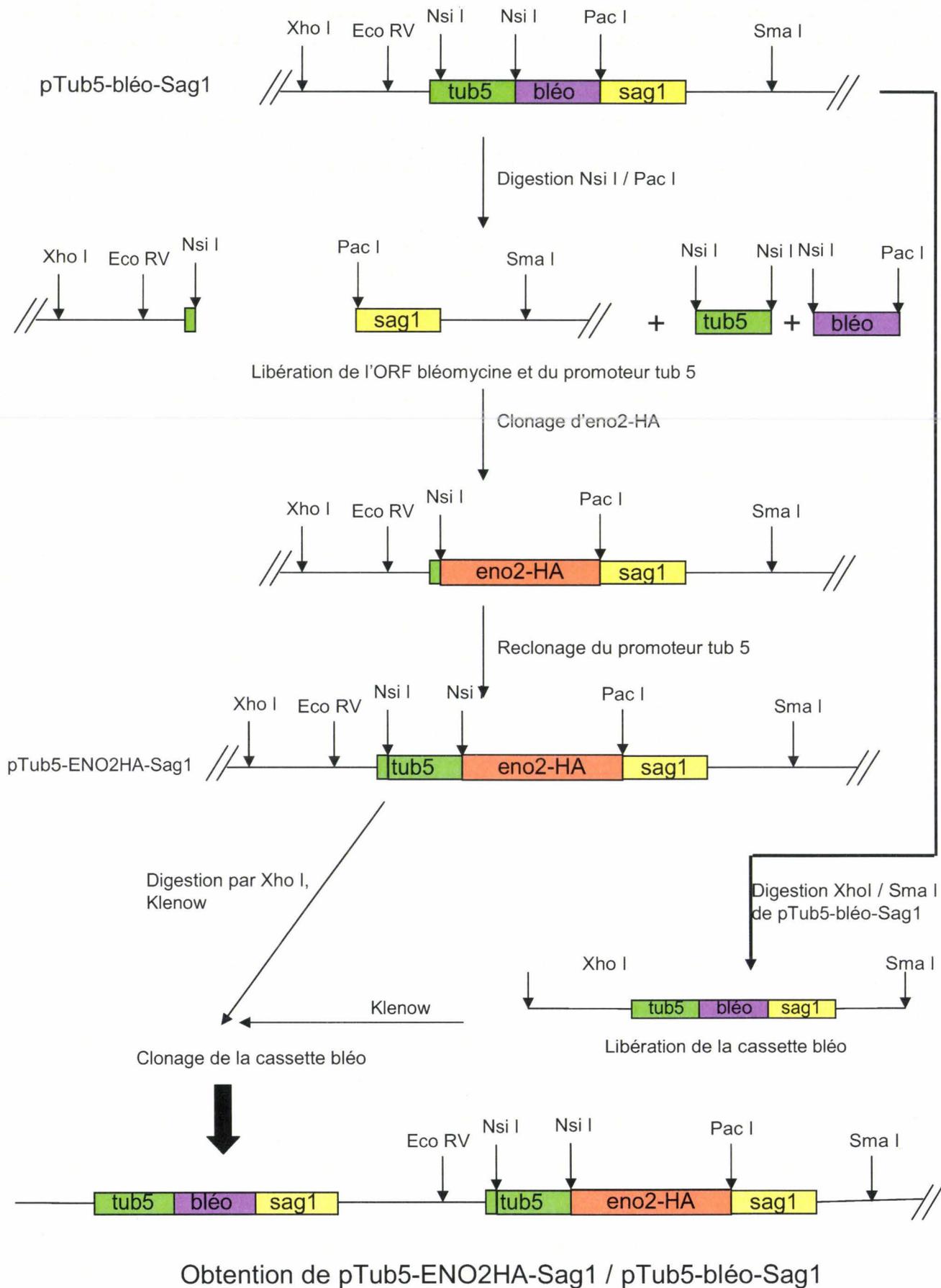
IV) Biologie moléculaire

1) Réalisation de la construction p[tub5-eno2HA-sag1][tub5-bléo-sag1]

1.1) Amplification de l'ORF eno2

L'ORF du gène *eno2* avait été précédemment clonée dans le vecteur d'expression pQE60 au sein de notre laboratoire. 500 ng de ce plasmide ont servi de matrice pour l'amplification de l'ORF *eno2*. 2 µL des amorces suivantes (dilution à 25 µM/µL) ont été utilisées: 5'*eno2*NsiI (annexe 1), possédant en 5' le site de restriction de l'enzyme Nsi I ; 3'*eno2*HAPaCI (annexe 1), possédant en 3' la séquence nucléotidique codant pour le tag HA, un épitope de 11 aa (CYPYDVDPYASL), ainsi que le site de restriction de l'enzyme Pac I. L'amplification est réalisée avec la Pfu (Proméga), une polymérase très fidèle (une erreur toutes les 10000 nt). Le mélange de PCR [10 µM de dNTP ; tampon PCR 10X contenant du MgCl₂: 10 µL ; Pfu : 1 µL ; volume final : 100 µL) est recouvert d'une goutte d'huile minérale. Le thermocycleur automatique (Mini-Cycler TM, MJ Research) réalise ensuite les variations de température suivantes : une dénaturation préalable de 1 min à 95°C, 39 cycles d'amplification comportant chacun une dénaturation d'une minute à 95°C, une étape d'hybridation des amorces à 66,9°C et une élongation de 3 min à 72°C. Le programme se termine par une étape d'élongation à 72°C, permettant à la Taq de rajouter des nucléotides A en 5' des séquences amplifiées.

Figure 33 : Construction du plasmide pTub5-ENO2HA-Sag1 / pTub5-bléo-Sag1



Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel à 1% (p/v) d'agarose en tampon TAE 1X [Tris 40 mM ; acétate 40 mM ; EDTA 1 mM, pH8], contenant une goutte de bromure d'éthidium (BET). La taille du fragment d'ADN est déterminée par comparaison avec celle de marqueurs de poids moléculaires (Smart Ladder, Eurogentec).

La bande d'ADN est ensuite purifiée sur gel à l'aide du kit GeneClean (Q-BIO gene) afin de procéder à la double digestion Nsi I / Pac I.

1.2) Digestion de l'insert et du vecteur p[tub5-bléo-sag1]

Le vecteur de clonage utilisé est un vecteur pBlueScript SK- dans lequel une cassette de résistance à la bléomycine a été clonée entre les sites de restriction Eco RV et Sma I (figure 33). Ce plasmide possède en outre un gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les bactéries résistantes. La cassette de résistance à la bléomycine comporte une séquence promotrice forte Tub 5, l'ORF bléomycine et une séquence 3'UTR Sag1. L'ORF bléomycine a été clonée via les sites de restriction Nsi I en 5' et Pac I en 3'. Le site Nsi I est également présent dans le promoteur Tub5, environ 500 pb en amont du site Nsi I bordant la bléomycine en 5'. Le but de l'expérience est de remplacer l'ORF bléomycine par l'ORF eno2HA. Le plasmide p[Tub5-bléo-sag1] et l'insert eno2HA sont digérés séquentiellement par l'enzyme Nsi I [ADN (insert élué ou 5 µg d'ADN plasmidique) ; tampon de digestion Nsi I 10X : 5 µL ; 2 à 5 µL d'enzyme Nsi I ; H₂O PPI qsp 50 µL] 2 heures à 37°C, puis par l'enzyme Pac I [digestion Nsi I ; tampon de digestion Pac I 10 X : 10 µL ; 5 à 10 µL d'enzyme Pac I ; H₂O PPI qsp 100 µL], à 37°C pendant la nuit. Cette double digestion sur le plasmide libère un fragment de 300 pb, l'ORF bléomycine, ainsi qu'un fragment de 500 pb correspondant à la quasi-totalité du promoteur Tub 5. La totalité des digestions est déposée dans un gel d'agarose 1% en TAE et chaque bande, eno2HA double digérée, le plasmide libéré de l'ORF bléo et du promoteur, et le promoteur Tub 5, est purifiée avec le kit GeneClean.

1.3) Déphosphorylation du plasmide

Le plasmide double digéré et purifié est déphosphorylé afin d'éviter une ligation entre plasmides lors du clonage. Pour cela, le plasmide purifié est incubé avec 5 µL de phosphatase alcaline (Roche), 5 µL de tampon phosphatase et le volume est ajusté à 50 µL avec de l'eau PPI. Le mélange est incubé à 37°C pendant 1 heure puis la phosphatase

alcaline est inactivée en incubant la réaction 10 min à 70°C. Le plasmide déphosphorylé est purifié en solution avec le kit GeneClean.

1.4) Ligation

Des aliquots de l'insert eno2HA et du plasmide purifiés sont déposés dans un gel 1% d'agarose pour quantifier la quantité de matériel récupéré. Cette quantification est effectuée de manière approximative en comparant l'intensité des échantillons sous UV par rapport à l'intensité des bandes des marqueurs de poids moléculaire dont la quantité est connue. La ligation est réalisée avec 50 ng de plasmide et selon le ratio moléculaire 1(vecteur) : 1(insert). La quantité x d'insert à utiliser est déterminée grâce à la formule suivante : $x = (\text{taille de l'insert} \times \text{quantité de vecteur}) / \text{taille du vecteur}$. La ligation s'effectue à 14°C dans un cryostat pendant une nuit, avec la T4 DNA ligase dans son tampon de ligation.

1.5) Transformation des bactéries XL1-blue

2 µL du mélange de ligation est incubée avec 50 µL de bactéries compétentes pendant 30 min sur la glace. Un choc thermique de 30 secondes est réalisé à 37°C puis le tube est remis immédiatement sur la glace. 250 µL de milieu LB [Luria Bertani, tryptone 1% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v), NaCl 1%, pH7] sont ajoutés et la culture est incubée à 37°C pendant 1 heure sous agitation afin de permettre l'expression de la résistance à l'ampicilline dans les bactéries portant le plasmide p[eno2HA-sag1]. 50 µL de la culture sont alors étalés sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB gélosé et supplémenté en ampicilline à 50µg/mL. La culture est incubée dans une étuve à 37°C toute une nuit.

1.6) Criblage des colonies par PCR

Une vingtaine de colonies ayant poussé sur la boîte de Pétri sont piquées à l'aide d'un cône, repiquées sur une autre boîte de Pétri LB Amp et le cône est frotté au fond d'un tube de PCR afin d'y déposer quelques bactéries. Le mélange réactionnel de PCR [amorce 1 : 5'eno2NsiI, 50 pmoles ; amorce 2 : 3' eno2HAPaCI, 50 pmoles ; tampon de PCR 10X : 10 µL ; MgCl₂ ; Taq polymérase : 1 µL ; H₂O PPI qsp 100 µL] est ajouté sur le tube. La PCR s'effectue comme décrit précédemment. Les produits de PCR sont analysés en gel d'agarose et les colonies positives sont remises en culture dans 5 mL de LB Amp sur la nuit dans une étuve à 37°C sous agitation.

1.7) Extraction plasmidique

Les plasmides des colonies positives sont extraits avec le kit Nucleospin Plasmid de Macherey-Nagel, à partir de 3 mL de culture.

1.8) Séquençage de l'insert

Afin de vérifier l'exactitude de la séquence eno2HA amplifiée par PCR, 3 µg d'ADN plasmidique sont utilisés pour séquencer l'insert sur les deux brins avec d'une part l'amorce universelle M13-20 et d'autre part l'amorce sag1 (annexe 1) déterminée dans la région 3'sag1. Des amorces internes, spécifiques de l'ORF eno2, ont également été utilisées afin de réaliser le séquençage progressif de l'insert.

Le séquençage est réalisé selon la technique de terminaison de chaînes (Sanger et al., 1977), à l'aide du ThermoSequenase Cy5 Dye Terminator Sequencing kit (Amersham Biosciences). Pour chaque échantillon à séquencer, 4 réactions indépendantes sont nécessaires : dans chaque tube de réaction, des dNTP (1,1 mM), permettant la polymérisation de la chaîne, sont mélangés à l'un des ddNTP marqué au Cy5 (2 à 5 µM) dont l'incorporation met fin à la polymérisation de la chaîne. La PCR de séquençage compte 30 cycles dont les étapes sont les suivantes : la matrice est dénaturée à 95°C pendant 30 s, puis l'amorce utilisée pour la réaction de séquençage s'hybride à une température de 60°C pendant 30 s ; enfin, l'élongation des chaînes se fait à 72°C pendant 1 min 20 s. L'ADN synthétisé est précipité à -80°C pendant 2 heures par l'ajout d'acétate d'ammonium (0,5M), d'une solution de glycogène (3 µg/µL) et d'éthanol absolu (3V). L'ADN précipité est récupéré par centrifugation à 14000 rpm pendant 30 min, lavé par 200 µL d'éthanol froid à 70% et après élimination du surnageant, il est séché sous cloche pendant 15 min. Chaque culot est repris dans 5 µL d'un tampon de charge et le tube est ensuite incubé à 70°C pendant 2 min 30 s avant d'être déposé dans un gel dénaturant [urée 7M ; 6% d'acrylamide/bisacrylamide (19 : 1), Bio-Rad] préparé en tampon TBE 0,6x et polymérisé par du persulfate d'ammonium (0,035% p/v) et du TEMED 0,0875% v/v). L'électrophorèse est réalisée sur un séquenceur « Automated Laser Fluorescent Alf Express DNA sequencer » (Amersham Biosciences), en TBE 0,6%, à 1500 V et 60 mA, à la température constante de 55°C. Les fragments d'ADN marqués au Cy5 passent devant un laser qui détecte les signaux de fluorescence qui sont alors convertis en séquences nucléotidiques. Les séquences obtenues sont alignées avec la séquence d'eno2 disponible dans les banques de données.

1.9) Clonage du promoteur Tub 5

Le promoteur Tub5 purifié précédemment est quantifié en gel d'agarose puis cloné comme décrit précédemment dans le plasmide p[eno2HA-sag1] après digestion de ce dernier par l'enzyme Nsi I suivie de la déphosphorylation. Des bactéries XL1-Blue sont transformées avec 2 μ L de la ligation et les bactéries sélectionnées sur LB Amp sont criblées par PCR avec les amorces M13-20 et 5'eno2as (annexe 1). Les colonies positives sont cultivées en LB Amp, les plasmides extraits et un séquençage à l'aide de l'amorce M13-20 est réalisé afin de sélectionner d'une part les clones ayant intégré l'insert dans le bon sens et d'autre part de vérifier l'exactitude de la séquence promotrice.

Un clone est alors choisi et mis en culture dans 250 mL de LB Amp afin de procéder à une extraction plasmidique massive à l'aide du kit Nucléobond de Macherey-Nagel. L'intégrité du plasmide et la bonne expression de notre insert ont ensuite été testés *in vivo* dans la souche 76K par transfection transitoire.

1.10) Transfection transitoire des parasites

La transfection transitoire consiste à électroporer dans les parasites de l'ADN plasmidique circulaire en grande quantité (100 μ g d'ADN pour $5 \cdot 10^6$ parasites). La souche 76K est amplifiée sur une boîte de culture de 150 cm^2 contenant un tapis confluent de cellules HFFs. Les parasites sont purifiés comme décrit précédemment mais les lavages se font dans le tampon de transfection, le cytomix [120 mM KCl ; 0,15 mM CaCl_2 ; 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4 ; 25 mM Hepes pH 7,6 ; 2 mM EGTA pH 7,6 ; 5 mM MgCl_2 ; pH ajusté à 7,6 avec du KOH]. Du cytomix complet [cytomix supplémenté en ATP (2mM final) et en glutathion (5mM final)] est préparé afin de procéder à l'électroporation. $5 \cdot 10^6$ parasites en cytomix sont déposés dans une cuvette à électroporation de 4 mm (Eurogentec) ainsi que 100 μ g d'ADN plasmidique. Le volume est ajusté à 900 μ L avec du cytomix complet. L'électroporation est effectuée dans un électroporateur BTX Electro Cell Manipulator 600, réglé à un voltage de 2,5 kV.cm⁻¹, une capacitance de 25 μ F et une résistance de 48 Ω .

Les parasites transfectés sont déposés dans les puits d'une plaque de culture à raison de $2 \cdot 10^5$ parasites par puits. Vingt-quatre heures après l'infection, le développement des parasites est arrêté et une double immunofluorescence avec les anticorps α -HA et α -ENO2 est réalisée, comme décrit précédemment. Une fois l'expression de la protéine

ENO2 taggée avec le HA visualisée, le clonage de la cassette de résistance p[Tub5-bléo-sag1] est réalisé dans le plasmide p[tub5-eno2HA-sag1].

1.11) Clonage de la cassette de résistance

Notre objectif étant de produire des parasites exprimant de manière stable au sein de leur génome la protéine ENO2HA, il était nécessaire d'inclure à notre construction une cassette de résistance qui nous permettrait de sélectionner les parasites ayant intégré le plasmide.

Le plasmide p[tub5-eno2HA-sag1] est linéarisé par la digestion Xho I. La cassette de résistance à la bléomycine est extraite du plasmide de départ, le plasmide p[Tub5-bléo-sag1], par la double digestion Xho I / Bam HI [5 µg de plasmide ; 3 µL de tampon de digestion ; 3 µL de BSA ; 1,5 µL d'enzyme Bam HI ; 1,5 µL d'enzyme Bam HI ; H₂O PPI qsp 30 µl ; 2 heures à 37°C]. La digestion est analysée en gel d'agarose 1% puis la cassette de résistance de 1300 pb est purifiée à partir du gel avec le kit GeneClean. Les extrémités libérées par les digestions sur le plasmide et la cassette étant incompatibles, elles sont comblées par l'enzyme de Klenow exo- [tampon de Klenow 10X : 5 µL ; dNTP 1 mM ; enzyme de Klenow 2µL ; QSP 50 µL]. La réaction s'effectue à 37°C pendant 1 heure puis l'enzyme est inactivée à 75°C pendant 20 min. Les produits de la réaction sont ensuite déposés dans un gel d'agarose d'où ils sont élués via le kit GeneClean. Le plasmide purifié est alors déphosphorylé comme décrit précédemment, repurifié et quantifié en gel, ainsi que la cassette bléomycine. La ligation plasmide/ insert bléo est effectuée selon le ration 1 : 5. Deux microlitres de cette ligation sont utilisés pour transformer des bactéries XL1-Blue. Après sélection sur milieu LB Amp gélosé, des colonies sont analysées par PCR avec des amorces spécifiques de l'ORF bléomycine. Les colonies positives sont testées par double digestion Kpn I / Not I afin de vérifier la libération de la cassette bléomycine et un clone est alors sélectionné.

Nous avons donc obtenu un plasmide comportant d'une part la cassette [tub5-eno2HA-sag1] et d'autre part la cassette de résistance [tub5-bléo-sag1]. Ce plasmide bifonctionnel sera utilisé pour transférer de manière stable la souche 76 K.

2) Réalisation de la construction p[Sag1-eno1HA-Sag1][Tub5-bléo-Sag1]

La cassette [Sag1-eno1HA-Sag1] avait été précédemment clonée (résultats non publiés) dans le plasmide pBlueScript sk- entre les sites Eco RV et Sma I. Ici, le promoteur

utilisé est le promoteur faible du gène *sag1* : la force de ce promoteur est en adéquation avec le promoteur endogène d'*eno1* qui est plus faible que celui d'*eno2*. L'insertion de la cassette bléomycine s'effectue comme précédemment décrit pour le plasmide p[Tub5-*eno2*HA-Sag1][Tub5-bléo-Sag1].

V) Obtention des parasites exprimant ENO-HA de manière stable

1) Transfection stable

Le protocole est identique à celui de la transfection transitoire mais les plasmides utilisés sont préalablement linéarisés par une digestion KpnI, purifiés par extraction au phénol / chloroforme et resuspendus dans du cytomix complet. La linéarisation du plasmide va permettre son intégration au génome du parasite.

2) Sélection des parasites transfectés de manière stable

2.1) Sélection à la bléomycine

Une fois les parasites transfectés, ils sont déposés dans une boîte HFF 25 cm². Six heures après l'infection, le milieu DMEM complet est renouvelé et complété avec de la bléomycine, à raison de 5 µg/mL. Cette drogue va permettre de sélectionner les parasites ayant intégré le plasmide dans leur génome. La sélection s'effectue lorsque les parasites sortent de leur vacuole, c'est-à-dire en extracellulaire. Lorsque les parasites ont lysé le tapis cellulaire, ils sont purifiés sur membrane de polycarbonate et incubés pendant 6 heures dans du DMEM supplémenté en bléomycine. Après la sélection, la suspension est déposée sur une nouvelle boîte de cellules HFFs. Trois sélections successives sont ainsi effectuées avant de procéder au clonage des parasites.

2.2) Clonage des mutants

Après la 3^{ème} sélection à la bléomycine, les parasites sont purifiés comme décrit précédemment et comptés sur Malassez. Des dilutions sérielles dans du DMEM sont effectuées et un volume contenant 400 parasites est prélevé et complété à 40 mL avec du DMEM complet supplémenté en bléomycine, de sorte à obtenir une dilution de 1 parasite / 100 µL. A l'aide d'une pipette, 100 µL de la dilution sont distribués dans chaque puits de quatre plaques de culture de 96 puits. Les plaques sont centrifugées 1 min à 1500 tours afin de faire descendre les parasites au fond des puits. Les parasites sont laissés à l'étuve 1 semaine, temps nécessaire à la visualisation de plages de lyse au microscope. Les puits

présentant une seule plage de lyse équivalent à un seul clone sont grattés et leur contenu est transféré dans le puits d'une plaque de culture 24 puits afin d'amplifier le clone sélectionné. Quarante-huit heures plus tard, le clone ayant lysé toutes les cellules du puits est transféré dans une boîte de culture de 25 cm² afin de récupérer assez de matériel pour analyse en immuno-empreinte.

2.3) Criblage des mutants par immuno-empreinte

Le contenu des boîtes de culture de 25 cm² est récupéré et déposé dans un gel d'acrylamide à 12%. Après migration et transfert sur membrane de nitrocellulose, une immuno-empreinte est réalisée avec l'anticorps anti-HA, selon le protocole détaillé précédemment, afin de cribler les clones exprimant l'énolase-HA. Deux mutants exprimant ENO1-HA et 2 mutants exprimant ENO2-HA de manière stable sont sélectionnés pour des études phénotypiques plus approfondies.

VI) Etude phénotypique des mutants

1) Tests d'invasion et de multiplication

Des plaques 4 puits sont infectées avec la 76K ou l'un des mutants sélectionnés comme précédemment décrit. 24 et 32 heures après l'infection, les lamelles sont incubées successivement dans les 3 réactifs du kit RAL 555 (Réactifs RAL): 1 min dans le réactif 1 (Fix-RAL) contenant du méthanol, ce qui permet de fixer le tapis cellulaire ; 25 secondes dans le réactif 2 (Eosine-RAL) qui permet de colorer les noyaux ; enfin 40 secondes dans le réactif 3 (Bleu-RAL) qui permet de colorer les cytoplasmes. Les lamelles sont séchées sous hotte puis montées sur lames. Elles sont ensuite observées au microscope et le nombre de parasites par vacuoles et par cellules est compté selon la souche et le nombre d'heures de développement des parasites.

2) Etude de l'expression d'antigènes spécifiques de bradyzoïtes dans les parasites transgéniques

Les parasites transgéniques sont purifiés et déposés dans un gel d'acrylamide 12% puis les protéines sont transférées sur nitrocellulose. Des immuno-empreintes sont alors réalisées avec des anticorps spécifiques de bradyzoïtes (P18, P21, P36).

3) Etude de la virulence et de l'interconversion

Six souris Balb/c par clone sont infectées avec 1000 parasites. Le taux de mortalité est déterminé afin de comparer la virulence des parasites transgéniques par rapport à la souche 76K sauvage. Les souris survivantes sont sacrifiées et le nombre de kystes par cerveau est énuméré afin d'observer l'effet de l'expression illégitime des énoles sur le processus d'interconversion du parasite.

ANNEXES

SEQUENCES OLIGONUCLEOTIDIQUES

OGT_{sens} : CGCCTTCCACAACAAGTTACTGGCGTTGAACTA

OGT_{anti-sens} : GAGTGAACTGCTTCGCATGCGGCTCAGA

5'eno2NsiI : GGCCATGCATATGGTGGCCATCAAGGACATCACTGCT

3'eno2HAPaI :

GCCGGCGCTGGCTTCCGCCATCCCAACTACCCATACGATGTTCCGGATTACGCT

AGCCTCTGATTAATTAAGGCC

M13-20 : GTAAAACGACGGCCAGTGA

SAG1 : TCAACAAGGCGACAAGAACGTCC

5'ENO2 AS : GAGTCGAGGATCTGACGAGCAGTG

5bléo : ATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCG

3bléo : TCAGTCCTGCTCCTCGGCCACGAAGTG

ARTICLE

Evidence for O-N-acetylglucosamylation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*

Gabrielle Oria and Stanislas Tomavo¹

Equipe de Parasitologie Moléculaire, UGSF, CNRS UMR 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

¹Corresponding author: E-mail: Stan.Tomavo@univ-lille1.fr, Ph: 33 3 20 43 69 41, Fax: 33 3 20 43 65 55.

Abbreviations: O-GlcNAc, O-N-acetylglucosamine; OGT, O-N-acetylglucosaminyl transferase; HA, hemagglutinin; WGA, wheat germ agglutinin; SPY (Spindly), ENO, enolase; LDH, lactate dehydrogenase.

Abstract

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite belonging to the Apicomplexa phylum. In the intermediate hosts, *T. gondii* exists in two forms, the rapidly dividing tachyzoite and the dormant encysted bradyzoite. The interconversion between these two parasite stages is a key event for pathogenesis and persistence of the parasite in infected hosts. The tachyzoite to bradyzoite differentiation is accompanied with stage-specific expression of proteins that are considered as molecular markers. We have previously shown that *T. gondii* possesses two stage-specifically expressed glycolytic isoenzymes of enolases that are also localized into the nucleus of parasites during their active replication or early differentiation. Here we report that *T. gondii* ENO1 and ENO2 tagged to HA are targeted into the nucleus of stably transformed parasite lines. Moreover, we have shown that *T. gondii* enolases bear O-GlcNAc moieties, a post-translational modification which can be implicated in their nucleo-cytoplasmic localization. The putative coding sequence of *T. gondii* O-GlcNAc transferase (OGT), the enzyme which is known to add O-GlcNAc on proteins was identified. We showed that *T. gondii* OGT gene is constitutively expressed in the rapidly replicating tachyzoite and the dormant encysted bradyzoite. Phylogenetic analyses revealed that *T. gondii* OGT displays an evolutionary link to plant OGT named Spindly (SPY).

Introduction

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite belonging to the Apicomplexa phylum. This parasite is unusual in its ability to infect a wide range of intermediate hosts, warm-blooded animals and humans (35, 33). During infection in the intermediate host, *T. gondii* undergoes stage conversion between the rapidly dividing tachyzoite that is responsible for acute toxoplasmosis, and the slowly replicating, encysted bradyzoite stage. The immune system of normal individuals is able to control the infection and most of infected persons have no clinical disease due to infection. However, even in healthy individuals, the immune system is not able to completely eradicate the parasite and *T. gondii* persists in the host as latent bradyzoites encysted predominantly in the central nervous system and muscles (37, 5). Toxoplasmosis is most often seen in immunocompromised persons (encephalitis) and congenitally infected fetuses (retinitis). When the immune system is compromised, reactivation of bradyzoites into tachyzoites can lead to severe and irreversible lesions of host tissues. The ability of *T. gondii* to cycle between the tachyzoite and bradyzoite forms, process known as interconversion, is central to the pathogenesis. The interconversion process is notably accompanied by stage-specific expression of genes.

Tachyzoites express stage-specific genes such as SAG1, LDH1 and ENO2 (27, 35, 6, 7), whereas bradyzoites express stage-specific genes such as BAG1, LDH2 and ENO1 (1, 35, 7). Using specific polyclonal antibodies, we have previously shown that ENO1 and ENO2 display a nuclear localization in the bradyzoite and tachyzoite, respectively (9). Interestingly, the nuclear localization was shown to be correlated with active replication of the tachyzoites but also with the division of early differentiating bradyzoites as well (9). This suggests novel nuclear functions of *T. gondii* ENO1 and ENO2, as previously described for human cancer cells and *Arabidopsis thaliana* whose homologues of enolases named MBP1 and LOS2 have been reported as nuclear transcriptional repressors (8, 22).

O-GlcNAc is a post-translational modification consisting of a single monosaccharide modifying serine and threonine residues on proteins that can be located in both cytoplasm and nucleus (33, 15, 13). This glycosylation is well-conserved in human, mammals, plants, virus and parasites (14). O-GlcNAcylation is a dynamic process, which is governed by two enzymes, the O-GlcNAc transferase (OGT) which adds O-GlcNAc moieties on proteins, and the O-GlcNAcase (OGA) that removes this monosaccharide (19, 4, 17). O-GlcNAc is a major glycosylation that plays several functions in cells, especially in regulation of cell signalling (25, 37). Because both phosphorylation and O-GlcNAc can be found on the same serine or threonine residues, these dual modifications are considered as markers of the sub-cellular localization of several proteins in mammals (37, 12). For example, hyperphosphorylation of Tau protein leads to the reduction of O-GlcNAc moieties on the protein and subsequently to the diminution of nuclear transport (23).

In this study, using transgenic tachyzoites expressing either ENO1 or ENO2 with tagged HA, we have confirmed the nuclear localization of enolases, excluding cross-reactivity of polyclonal antibodies to other unrelated nuclear proteins. In addition, we have shown that ENO2 targeting into tachyzoite nuclei is cell cycle regulated. Using Wheat Germ Agglutinin (WGA), we demonstrated that ENO1 and ENO2 can specifically bind to the lectin, suggesting they are likely modified by O-GlcNAc moieties. The homologue of O-GlcNAc transferase (OGT) which adds O-GlcNAc moieties on proteins has been identified in *T. gondii*. Interestingly, *T. gondii* putative OGT was shown to be similar to the plant OGT named SPY protein.

Materials and Methods

Parasite and tissue culture- Tachyzoites of the avirulent strain 76K were maintained *in vitro* by serial passage in confluent monolayers of Human Foreskin Fibroblasts (HFF)

grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (BioWhittaker) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco BRL), 2 mM glutamine and 0.05% gentamycin. Tachyzoites were allowed to grow until they lysed HFF cells spontaneously and were harvested by filtration through a glass wool column and through a 3 µm pore filter. Encysted bradyzoites were obtained from chronically infected OlaHsd mice, purified from brains and freed by pepsin digestion (0.05 mg ml⁻¹ pepsin in 170 mM NaCl, 60 mM HCl) for 30 minutes at 37°C.

Construction of ENO1-HA and ENO2-HA plasmids- Plasmid constructs for transfection were made using PCR-amplified DNA fragments amplified by forward and reverse primers. For ENO1-HA construct, the forward primer 5' ENO1 (GGATGCATATGTACCCATACGATGTTCCGGATTACGCTAGCCTCGTGGTTATC AAGGACATCGTT) was combined with the reverse primer 3' ENO1-HA (GGTTAATTAATCAGAGGCTAGCGTAATCCGGAACATCGTATGGGTATTTGGG TGTCGAAAGCTCTC). For ENO2-HA construct, the forward primer 5' ENO2 (GGCCATGCATATGGTGGCCATCAAGGACATCACTGCT) was combined with the reverse primer 3' ENO2-HA (GCCGGCGCTGGCTTCCGCCATCCCAACTACCCATACGATGTTCCGGATTACGC TAGCCTCTGATTAATTAAGGCC). The forward primer contained a NsiI restriction site upstream the sequence and the reverse primer contained a PacI restriction site downstream the nucleotide sequence (5'-TACCCATACGATGTTCCGGATTACGCTAGCCTC-3') coding for the eleven amino acids of the HA tag (CYPYDVPDYASL). The PCR was performed using 500 ng of DNA template and 50 pmol of each primer. The reactions were cycled for 39 times at 95°C for 1 min, annealing at 66.9°C for 1 min, elongation at 72°C for 3 min and a final step elongation for 10 min at the same temperature. Buffers and Pfu polymerase used for PCR were from Promega. PCR-amplified DNA were digested with Nsi I and Pac I restriction enzymes, gel purified using a gene clean spin kit (Q-Biogene) and cloned into the expression vector. The ENO1-HA fragment was subcloned into the Sag1-Bleo construct (30) by replacing the reporter Bleo cut off by Nsi I/PacI. The ENO2 construct was done using the same strategy. The two plasmids were then digested by Xho I, and the cassette Tub5 promoter-bleomycin-3'Sag1 (31) was blunt cloned in order to obtain the constructs shown in Fig. 2.

Transfection of *T. gondii* tachyzoites- 100 µg of the ENO1-HA and ENO2-HA constructs were linearised by Kpn I restriction enzyme, purified by phenol/chloroform extraction and then resuspended in 100 µl of cytomix buffer (120 mM KCl, 0.15 mM

CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.6, 25 mM HEPES pH 7.6, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂) containing 2 mM ATP pH 6.5 and 5 mM glutathione. 76K strain tachyzoites were grown and purified as described above. Cells (5.0×10^6) were washed once in PBS and resuspended in 800 μ l of cytomix buffer supplemented with ATP and glutathione. Electroporation was done in a 4 mm gap cuvette using a BTX electro cell manipulator 600 (BTX, San Diego) set at a voltage of 2.5 kV.cm^{-1} , 25 μ F capacitance and 48 Ω serial resistance (31). Electroporated cells were immediately allowed to infect HFF monolayer cells for about 6 hours before washing and adding fresh medium. Transfected tachyzoites were allowed to grow until they lysed the HFF monolayer, purified as described above. Extracellular tachyzoites were incubated with 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of bleomycine in DMEM for 8 hours. Then, they were loaded again onto HFF monolayer under drug pressure for 48 hours. The drug selection was repeated 3 times and resistant parasites emerging from drug selection were cloned by limiting dilution. Each clone was amplified, purified and analysed by Western Blot using the purified monoclonal antibody specific to HA (clone 16B12, MMS-101P, Eurogentec). Two clones from two independent experiments for each construct were chosen for further study.

Wheat germ agglutinin affinity chromatography- Parasites were lysed with 0.01 M Tris-HCl buffer containing 0.5% NP40, 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM PMSF/DMSO, 2 mM MnCl₂, and cocktail of proteases inhibitors for one hour. The lysate was diluted with the same buffer without NP40 in order to obtain 0.1 % NP40 final concentration. After centrifugation, the supernatant was incubated with WGA column for overnight at 4°C. Three washings with PBS followed by one washing with PBS-NaCl 0.5 M were performed. A final washing with Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8 was done before elution at 100°C for 5 min with SDS-PAGE buffer (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8 containing 2% SDS and saccharose 10 %).

Immunofluorescence assays- 2×10^5 tachyzoites from 76K or transgenic strains were allowed to infect HFF grown on glass slides. The intracellular parasites were fixed at 24, 32 or 48H after infection with 4% paraformaldehyde prepared in PBS. After washing with PBS, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS and incubated with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 10% FCS. The samples were incubated with rabbit anti-ENO2 (dilution at 1:500) for 30 minutes at 37°C. After washing three times with PBS, the samples were incubated with goat anti-rabbit Ig conjugated with FITC (Alexa 488, Molecular Probes) or Texas Red (Alexa 595, Molecular Probes) (dilution at 1:500) as described above. For transgenic ENO2-HA parasite lines, IFA was performed using mouse



monoclonal anti-HA (1:500) (Eurogentec) and goat anti-mouse Ig conjugated with FITC (1:500). The cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and the samples were examined with a Zeiss Axioplan microscope.

Identification of *T. gondii* OGT and RT-PCR- The prediction of the putative coding sequence of OGT was performed by search in the genome sequence database at ToxoDB.org with key words “O-GlcNAc” and “transferase” that led to the identification of the putative gene with the accession number 59.m03683. The protein sequence is similar to mammal and plant OGT. Forward and reverse primers were designed in order to amplify the internal 1190 bp sequence of *T. gondii* OGT that displayed a perfect match with other OGTs. RT-PCR was done on tachyzoite and bradyzoite (from cysts of infected mice) cDNA with Pfu polymerase as previously described (6). The PCR reactions were cycled for 39 times by heating at 95°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min, elongation at 72°C for 2 min and a final step elongation for 10 min at the same temperature.

Sequence identification and phylogenetic inference- Identification of potential O-GlcNAc and phosphorylation sites in protein sequences of *T. gondii* enolases was done using YinOYang 1.2 and NetPhos 2.0 programs, respectively. Sequence alignments were done using ClustalW or Multalin program. The conserved domains of *T. gondii*, human and *Arabidopsis thaliana* OGT were analysed with the CDD search program in NCBI (28). Phylogenetic tree of OGT was constructed from Multalin alignment with *T. gondii* OGT protein deduced from the 1190-bp nucleotide sequence validated by RT-PCR and its corresponding sequences of OGT from other organisms using the Delgap and Phylowin programs. All sequences were taken from NCBI and their accession numbers were as follows: *Arabidopsis thaliana* SPY: AAC49446.1; *Cryptosporidium parvum* OGT: EAK88456.1; *Homo sapiens* OGT: NP_858059.1; *Mus musculus* OGT: NP_631883.2; *Rattus norvegicus* OGT: NP_058803.1; *Hordeum vulgare* OGT: AAC36055.1; *Lypersicon esculentum* OGT: CAC85169.1; *Petunia x hybrida* OGT: CAA76834.1. *T. gondii* OGT (number accession: 59.m03683) was taken from Toxo.DB. The accession numbers of enolases used in this study are as follows: *T. gondii* ENO1: AAD51128.1; *T. gondii* ENO2: AAG60329.1; *Arabidopsis thaliana* LOS2: P25696; *Homo sapiens* MBP-1: P22712.

Results

Kinetics of nuclear localisation of ENO2 in tachyzoites- The intracellular tachyzoites were examined by immunofluorescence assays after 4, 24, 32 or 48 hours post-infection. After four hours post-infection, the vast majority of intracellular tachyzoites that appears as

a single intra-vacuolar parasite did not exhibit a nuclear staining using anti-ENO2 (Fig. 1A, panels 1-4). Instead, a specific cytoplasmic staining was only observed (Fig. 1A, panel 3). In contrast, after 24 and 32 hours post-infection, there was strong nuclear staining (Fig. B and C), co-localising with the DAPI and only a very low cytoplasmic staining can be seen, suggesting that the majority of ENO2 is targeted into the nucleus of the actively replicating tachyzoites. In this case, the 2, 4 or 8 daughters dividing tachyzoites in their vacuoles displayed a strong nuclear localisation of ENO2. After 48 hours post-infection, when the vacuole is full of tachyzoites in the host cell which is going to undergo lysis, only a weak nuclear staining was observed and more pronounced cytoplasmic signal was detected (Fig. D), suggesting that the nuclear staining of ENO2 depends on the state of tachyzoite replication during the intracellular development. As it can be seen in the Fig. D (panel B, white arrow), a vacuole containing two new daughters tachyzoites, that are derived from one parasite infecting a new host cell, appear to display an exclusive and stronger nuclear staining. All together, these data clearly show that the strongest nuclear localization of ENO2 is timely regulated during the intracellular development of the tachyzoites.

Creation of transgenic strains over-expressing ENO1 or ENO2 tagged with HA-

Because the nuclear staining obtained above can also be ascribed to cross-reacting signals to other unrelated nuclear proteins, even if a specific polyclonal antibody anti-ENO2 has been used, we decided to stably express HA-tagged ENO1 and ENO2 in tachyzoites. Extracellular tachyzoites from 76K strain were stably transformed with linearised ENO1-HA and ENO2-HA constructs as described in Materials and Methods. Transgenic clones over-expressing ENO1-HA or ENO2-HA were selected by screening the positive clones using anti-HA monoclonal antibody and Western Blots. Two clones were selected from two independent experiments using ENO1-HA and ENO2-HA construct, respectively. Transgenic expression of ENO1-HA in the parasite line named E1-1 and E1-5 (ENO1-HA, clone 1 and clone 5) were shown to be positive to the monoclonal antibody specific to HA tag using IFA (Fig. 2, green signal in panels E1-1 and E1-5). These HA signals were perfectly super-imposed to anti-ENO2 staining (red signal), demonstrating that the transgenic ENO1-HA is properly targeted to the nucleus of these transgenic parasite lines (merged pictures). A similar result was obtained when the transgenic ENO2-HA expressing parasite lines were analysed using the double IFA staining using both monoclonal antibody specific to the HA tag and the polyclonal antibody anti-ENO2 (Fig. 2, panels E2-10 and E2-4). Again, the nuclear ENO2-HA signal (green) can perfectly

overlay the endogenous ENO2 signal (red), as shown in these merged pictures of E2-10 and E2-4. The specificity of HA expression is demonstrated by the absence of detectable HA signal on the wild type 76K tachyzoites as expected (panel 76K). As expected, the fluorescence signal obtained in the ENO1-HA parasite lines was weaker than that of ENO2-HA lines because of the difference in the strength of the two promoters driving the ENO expression, SAG1 versus TUB5 promoters. In addition, the intensity of the signal appears also different between E1-1 and E1-5 or E2-4 and E2-10, suggesting that the number of plasmids integrated per parasite genome could be different. However, we cannot rule out a site-specific integration effect during the insertion of these plasmids in the parasite genome. Nevertheless, the nuclear targeting of ENO1-HA and ENO2-HA in these transgenic parasites demonstrates that *T. gondii* enolases are readily transported into the nucleus of the parasite. We have confirmed the over-expression of ENO1-HA proteins in the transgenic E1-1 and E1-5 lines using Western Blots revealed by antibodies specific to ENO1 and HA tag (Fig. 3, panels A and B). As compared to the ENO1 protein of bradyzoites isolated from mouse brain, the ENO1 tagged with HA migrated slower (lanes 2 and 3) than the native ENO1 (Fig. 3A, lane 1) and no HA signal can be detected in the wild type parasite (Fig. B, lane 1). An identical result was obtained with the blots of ENO2 tagged with HA (Fig. 3C and 3D). As shown in panel C, both endogenous and native ENO2 and ENO2-HA are detected and upper bands correspond to ENO2-HA proteins expressed in E2-4 and E2-10 parasite clones (compare panel C and D).

***T. gondii* ENO1 and ENO2 possess predicted sites of O-N-acetylglucosaminylation-** Human enolase 1, the c-Myc binding protein (MBP-1) (8) and *Arabidopsis thaliana* enolase LOS2 (22) were also shown to be located in the nuclei of cells. Like ENO1 and ENO2 enolases of *T. gondii*, these enzymes do not possess the classic nuclear localisation signal (NLS). The sequences of these four nuclear enolases were aligned in Clustal W and submitted to the YinOYang 1.2 and NetPhos 2.0 programs which allowed the identification of O-GlcNAc and phosphorylation putative sites, respectively. These bioinformatics searches revealed that enolases of *T. gondii* possess multiple phosphorylation sites like MBP-1 and LOS2 (data shown in the supplementary materials). Some of these sites are highly conserved (aa 15, 280, 303, 363 and 387). Most importantly, the four enolases also possess several serine or threonine residues that may be modified by O-GlcNAc (see the supplementary materials). One potential O-GlcNAc site is conserved in the four nuclear enolases (serine at position 39). The serine 39 belongs to the type 1 site of O-GlcNAc, which is presumed to be used by O-GlcNAc transferase (OGT) for O-GlcNAc addition

(20). *T. gondii* ENO2 possesses two additional O-GlcNAc sites (serine 329 and serine 415) whereas ENO1 shows another site at serine 387. These results suggest that *T. gondii* enolases could bear O-GlcNAc moieties, a nucleo-cytoplasmic marker which is widely found on many nuclear proteins including transcription factors (37, 3, 26, 24).

***T. gondii* ENO1 and ENO2 bind to Wheat Germ Agglutinin-** This lectin was commonly used to determine the presence of terminal O-GlcNAc or sialic acid on glycoproteins. Total detergent extracted proteins from tachyzoites (Fig. 4A, lane 1) were incubated with WGA column. Numerous of tachyzoite glycoproteins were shown to binds to WGA (Fig. 4A, lane 2). The strong band stained at 20 kDa corresponds to free WGA removed from the column (see bottom of lanes 2 and 3). Among these proteins, a significant amount of ENO2 protein was detected using the polyclonal antibody specific to anti-ENO2 (Fig. 4B, lanes 3), confirming the presence of O-GlcNAc terminal on ENO2 as suggested by the bioinformatic prediction described above. However, another 70 kDa protein also cross-reacted with anti-ENO2. Because the 70 kDa protein is not detected on the immunoblot of total extract revealed by anti-ENO2, this band may correspond to a putative partner of ENO2 that is only detected after the lectin affinity chromatography. The nature of this novel protein revealed by the antibodies anti-ENO2 is not presently known. Nevertheless, we have also shown that ENO1 is capable to bind to WGA (Fig. D, lane 2) when a total extract derived from bradyzoites isolated from brains of infected mice was incubated with the lectin. Two additional bands with a higher molecular mass (50-52 kDa) were also detected with the anti-ENO1, suggesting that other post-translational modifications such as the competitive phosphorylation of O-GlcNAc may occur on ENO1 (Fig. D, lane 2). The specificity of WGA binding was demonstrated using a competition assay with cold N-acetylglucosamine in another independent experiment. When the total extracts derived from both tachyzoites and bradyzoites were incubated with WGA in the presence of the cold GlcNAc competitor, ENO2 (Fig. C, lane 3) and ENO1 (Fig. D, lane 3) were no longer binding to the lectin. The binding to WGA was completely abolished for ENO2 (Fig. C, lane 3) while strongly diminished for ENO1 (Fig. D, lane 3). Again, we noticed the presence of the novel 70 kDa protein and one band at 38 kDa corresponding to one of the putative degradation products of ENO2 (Fig. 4C, lane 2). Together with the bioinformatic data, these results strongly suggest that ENO1 and ENO2 are likely post-translationally modified by O-GlcNAc on serine or threonine residues as already described for other nuclear factors (reviewed in 12).

Identification of *T. gondii* OGT- The recent annotation of *T. gondii* genome revealed a

gene sequence (accession number: 59.m03683) coding for a homologue of transduction signal protein. The putative protein was analysed by CDD search program on NCBI (28) and conserved domains of genuine OGT were identified. In order to determine if the gene is transcribed, we have designed primers in a high conserved C-terminal domain for RT-PCR. The transcript level of *T. gondii* OGT gene is equally detected in both tachyzoite and bradyzoite, suggesting that the gene is constitutively expressed like the housekeeping actin gene used as control (Fig. 5). Sequence analysis showed the presence of the OGT catalytic domains (conserved domain I and II) in *T. gondii* with the conservation of specific amino acids involved in catalytic site (21). The similarities of the structural domains were pronounced between *T. gondii* and *A. thaliana* OGT than *T. gondii* OGT and human counterpart (Fig.6). *T. gondii* and *A. thaliana* OGTs contained an entire Spy domain while human OGT seems to have a bipartite Spy domain (Fig. 7). In addition, the presence of four domains TPR (Tetratricopeptide repeats), each domain containing three repetitions of TPR which are involved in protein-protein interaction and substrate specificity (17), were also identified in *T. gondii* and *A. thaliana* OGT whereas six TPR domains were evident in human OGT (Fig. 7). These data suggested that *T. gondii* OGT belongs to the plant Spindly family. We aligned sequences from *T. gondii*, *Cryptosporidium parvum* (another apicomplexan parasite) and other OGTs, and examined their relationship through phylogenetic inference. An unrooted neighbour-joining tree was constructed (Fig. 8). The *T. gondii* OGT clustered together with plant OGTs and very strong bootstrap values support that *T. gondii* OGT belongs to Spindly family. In contrast, the *Cryptosporidium parvum* OGT is completely divergent from *T. gondii*, plant and animal OGTs (Fig. 8), suggesting that *Cryptosporidium parvum* OGT has evolved following a different evolutionary event.

Discussion

We have confirmed that ENO1 and ENO2 are targeted in transgenic strains over-expressing the enzymes that are tagged with HA. These data demonstrate that the nuclear signal detected by the polyclonal antibodies specific to ENO1 and ENO2 is not due to a cross-reaction against unrelated nuclear proteins. More importantly, we demonstrate for the first time in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* that ENO1 and ENO2 are likely modified post-translationally by O-GlcNAc, a monosaccharide attached to serine or threonine residues. O-GlcNAcylation is considered to be a marker of nucleo-cytoplasmic localization of many nuclear factors of higher eukaryotic cells (37). In competition with

phosphorylation on the same amino acid residues, the increase of O-GlcNAc moieties have been shown to be involved in nuclear targeting of some nuclear factors (12). In contrast, these nuclear proteins are localized to the cytoplasm when they are hyperphosphorylated (23, 3), suggesting that the balance phosphorylation/O-GlcNAc is key for the nucleocytoplasmic shuttle of nuclear factors. Both ENO1 and ENO2 specifically bind to WGA lectin, suggesting that terminal O-GlcNAc residues are present on these enzymes. In addition, a novel 70 kDa lectin binding protein reacting specifically to the polyclonal antibody anti-ENO2 was also detected, suggesting that some partners binding to enolases may be required for nuclear targeting, as previously shown in other systems. Indeed, a specific chaperone of 70 kDa that specifically recognized the nuclear factors bearing O-GlcNAc moieties has been described (11). We have identified a putative gene encoding the O-GlcNAc transferase (OGT). The gene is constitutively transcribed in both tachyzoite and bradyzoite. This is in a good agreement of the presence of O-GlcNAc moieties in both tachyzoite-specific ENO2 and bradyzoite-specific ENO1. Interestingly, sequence analysis and phylogenetic inference demonstrate that *T. gondii* OGT is closely related to plant OGT named Spindly (SPY). We believe that this relationship between *T. gondii* and plant OGT confirm our recent perception of the evolutionary origin of apicomplexan parasites (2). Apicomplexans are suspected to have evolved following a second endosymbiotic event and the OGT inherited by *T. gondii* could be related to genes that have been retained from the engulfed alga (2). In contrast, the phylogenetic tree indicate that OGT of another apicomplexan parasite, *Cryptosporidium parvum* does not cluster to *T. gondii* and the plant counterparts, suggesting *C. parvum* OGT may be related to gene that have been retained from the host cell that engulfed the alga. It is interesting to note that *C. parvum* is the only apicomplexan parasite presently known to lack the apicoplast, a relict plastid (29, 38). We monitored the localization of ENO2 throughout the entire intracellular development of tachyzoite. In the parasite, enolase is predominantly present in the cytoplasm of the parasite at the beginning of the development cycle with a vacuole containing a single tachyzoite. The nuclear signal is strongly evident in the early dividing parasite (vacuole of two parasites) until the late stage of parasite division (vacuole containing up to 16 parasites). At the end of parasite replication when intracellular vacuole containing up to 120, the nuclear signal of ENO2 is weaker and more pronounced cytoplasmic localization is observed, suggesting that the nuclear localization of enolases is correlated to the active replication of the parasite. During this study, we have been able to perform an illegitimate expression of ENO1-HA in the tachyzoite. The over-expression of bradyzoite stage-

specific ENO1 does not lead to any significant changes in the parasite growth (data not shown). The over-expression of ENO2-HA does not reveal any detectable phenotypes even if the nuclear expression of enolases supports the idea that these glycolytic enzymes could be involved in other nuclear functions such as transcriptional regulation. This hypothesis is supported by the repression of transcription by human and *Arabidopsis thaliana* homologue of enolases named MBP1 and LOS2, respectively (8, 22). The precise nuclear functions of the enolases in *T. gondii* are not presently known. Understanding the post-translational modifications that are involved in the nucleo-cytoplasmic compartmentalization of *T. gondii* enolases can be helpful in designing strategy to inhibit the nuclear shuttle. This will shed light on the biological activities of enolases that are localized in the nucleus. In addition, we were unable to demonstrate the activity of drugs such as alloxan or streptozotocin which are known to inhibit higher eukaryote OGT and O-GlcNAcase, the enzyme that removed O-GlcNAc from the glycoprotein (18, 10) on the intracellular tachyzoites, confirming the phylogenetic and sequence analyses, ie that the *T. gondii* OGT is different from animal OGT but related to plant enzyme. A better characterization of O-N-GlcNAc transferase (OGT) in *T. gondii* is worthy of further exploration since compounds which inhibit O-N-acetylglucosaminylation could define potential drugs for combating apicomplexan-mediated diseases.

Acknowledgements-We thank Marlène Mortuaire for excellent technical assistance, Sulak Cagdas for its previous involvement in ENO1HA cloning, Florence Dzierszinski and Emilie Pensec for bioinformatic analyses and fruitful discussions. We acknowledge the Toxoplasma Genome Sequencing Consortium for making available the genome database. Genomic and/or cDNA sequence data were accessed via <http://ToxoDB.org> and http://www.tigr.org/tdb/t_gondii/. *T gondii* genomic data were provided by the Institute for Genomic Research (supported by the NIH grant #AI05093), and by the Sanger Center Washington State University. This research was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Legends

Figure 1: ENO2 is targeted into the nucleus in the earliest stages of replicating tachyzoites. Tachyzoites were used to infect HFFs (Human Foreskin Fibroblasts). After 4 hours (panel A), 24 hours (panel B), 32 hours (panel C) or 48 hours (panel D) post-infection, IFA assays were performed using the rabbit polyclonal antibody specific to ENO2 and goat anti-rabbit conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC). The cell

nuclei were stained with 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI). 1: Phase contrast pictures of intracellular tachyzoites; 2: DAPI; 3: FITC; 4: an overlay of DAPI and FITC pictures. Bar = 10 μ M.

Figure 2: Illegitimate expression of ENO1-HA and ENO2-HA confirms nuclear localisation of enolases. The two expressing vectors (eno1-HA and eno2-HA constructs) used to stably transfected tachyzoites are depicted on the left. Double immunofluorescence assays using polyclonal antibody specific to ENO2 (revealed by goat anti-rabbit Alexa 594, Molecular Probes) and a monoclonal antibody specific anti-HA (revealed by goat anti-mouse Alexa 488) was done on HFF infected with either wild type 76K, ENO1-HA or ENO2-HA parasite lines. Homogeneity of the clones obtained was confirmed as all parasites in the field are positive to monoclonal antibody anti-HA. Merged pictures show that ENO1 and ENO2 tagged to HA are readily co-localized to the endogenous nuclear ENO2 in the parasites (merged panels). Bar = 10 μ M.

Figure 3: Western blots of stable transgenic 76K strains over-expressing ENO1 or ENO2 tagged with HA. Wild type 76K strain was stably transfected with eno1-HA or eno2-HA constructs as described in Materials and Methods. Two independent clones for each construct were selected and analysed by SDS-PAGE 7.5% and Western blots. Immunoblot was performed either with anti-ENO1 (panel A) or ENO2 (panel C) and anti-HA (panel B and D). Black arrows indicate transgenic ENO1-HA and endogenous ENO1, respectively. Black arrows also indicate transgenic ENO2-HA and endogenous ENO2. Panel A: 1, total extract of bradyzoites isolated from brain of infected mice; 2, total extract of E1-1 clone; 3, total extract of E1-5 clone. Panel B: 1, total extract of bradyzoites as described in panel A; 2, total extract of E1-1 clone; 3, total extract of E1-5 clone. Panels C: 1, tachyzoites isolated from HFF cells; 2: total extract of E2-4 clone; 3, total extract of E2-10. Panel D: 1, total extract tachyzoites from HFF cells; 2: total extract of E2-4 clone; 3: total extract of E2-10 clone.

Figure 4: ENO1 and ENO2 bind to WGA lectin, suggesting the presence of O-GlcNAc moieties. Lysates of tachyzoites or bradyzoites were incubated with WGA column at 4°C at overnight and glycoproteins that bind to the lectin were eluted. Samples were loaded in a 10% acrylamide gel and proteins were transferred on nitrocellulose membrane. A Western blot with anti-ENO2 or anti-ENO1 antibody was performed. Panel A and B: 1: tachyzoite lysate, 2: WGA elute, 3: beads alone; Panel C: 1: tachyzoite lysate, 2: WGA elute, 3: WGA elute after GlcNAc competition; Panel D: 1: bradyzoites lysate, 2: WGA elute, 3: WGA elute after GlcNAc competition.

Figure 5: Evidence for transcripts coding for OGT in tachyzoite and bradyzoite stages. Specific primers were designed in the conserved 1190 bp sequence deduced from alignment of three bioinformatic predictions of the putative OGT gene. Semi-quantitative RT-PCR was performed to amplify the 1190 bp-cDNA using tachyzoite and bradyzoite cDNA. Specific primers of actin were used as a control of standardization. Tz: tachyzoite; Bz: bradyzoite.

Figure 6: Alignment of the amino acid sequence deduced from the putative *T. gondii*, *Cryptosporidium parvum*, plant and animal OGT. Alignment was realized with Multalin program of INRA Toulouse. Red bar indicates Conserved Domain I corresponding to the domain that catalyzed the transfer of UDP-GlcNAc to the protein while green bar delineates the Conserved Domain II that binds to UDP-GlcNAc. The amino acids involved in the catalytic activity of OGT are boxed.

Figure 7: Comparison of architectural domains between *T. gondii*, human and *Arabidopsis thaliana* OGT. CDD (Conserved Domain Database, NCBI) search program (27) was run on the entire prediction of putative OGT of *T. gondii* and that of human and *Arabidopsis thaliana* OGT. Each TPR red box represents three repetitions of tetratricopeptides repeats. TPR: tetratricopeptide; Spy: specific SPINDLY domain

Figure 8: Phylogenetic tree for OGT. Alignment described in Fig. 6 was submitted to the Delgap program in order to remove insertions and deletions. The new alignment was submitted to the Phylowin program to generate unrooted phylogenetic tree. The Neighbor-Joining method was used to establish the tree and 500 replicates of bootstrap were run to testify the strength of the tree. Bootstrap values are indicated. The scale indicates the branch length corresponding to the number of substitutions per site. The GenBank and other database accession numbers used for the tree were as follows: *Arabidopsis thaliana* SPY: AAC49446.1; *Cryptosporidium parvum* OGT: EAK88456.1; *Homo sapiens* OGT: NP_858059.1; *Mus musculus* OGT: NP_631883.2; *Rattus norvegicus* OGT: NP_058803.1; *Hordeum vulgare* OGT: AAC36055.1; *Lypersicon esculentum* OGT: CAC85169.1; *Petunia x hybrida* OGT: CAA76834.1; *Toxoplasma gondii* OGT: 59.m03683.

References

1. Bohne, W.; Gross, U.; Ferguson, D. J. & Heesemann, J., 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*, 1995, 16, 1221-1230
2. Coppin, A.; Varré, J.; Lienard, L.; Dauvillée, D.; Guérardel, Y.; Soyer-Gobillard, M.;

Buléon, A.; Ball, S. & Tomavo, S., Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry., *J Mol Evol*, 2005, 60, 257-267

3. Dauphinee, S. M.; Ma, M. & Too, C. K. L., Role of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells., *J Cell Biochem*, 2005, 96, 579-588

4. Dong, D. L. & Hart, G. W., Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol., *J Biol Chem*, 1994, 269, 19321-19330

5. Dubey, J. P., Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts., *Parasitology*, 1997, 115 (Pt 1), 15-20

6. Dzierszinski, F.; Mortuaire, M.; Dendouga, N.; Popescu, O. & Tomavo, S., Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*., *J Mol Biol*, 2001, 309, 1017-1027

7. Dzierszinski, F.; Popescu, O.; Toursel, C.; Slomianny, C.; Yahiaoui, B. & Tomavo, S., The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. Implications for evolutionary origin of apicomplexans., *J Biol Chem*, 1999, 274, 24888-24895

8. Feo, S.; Arcuri, D.; Piddini, E.; Passantino, R. & Giallongo, A., ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1)., *FEBS Lett*, 2000, 473, 47-52

9. Ferguson, D. J. P.; Parmley, S. F. & Tomavo, S., Evidence for nuclear localisation of two stage-specific isoenzymes of enolase in *Toxoplasma gondii* correlates with active parasite replication., *Int J Parasitol*, 2002, 32, 1399-1410

10. Gao, Y.; Parker, G. J. & Hart, G. W., Streptozotocin-induced beta-cell death is independent of its inhibition of O-GlcNAcase in pancreatic Min6 cells., *Arch Biochem Biophys*, 2000, 383, 296-302

11. Guinez, C.; Lemoine, J.; Michalski, J. & Lefebvre, T., 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319, 21-26

12. Guinez, C.; Morelle, W.; Michalski, J. & Lefebvre, T., O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?, *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37, 765-774

13. Hart, G. W.; Haltiwanger, R. S.; Holt, G. D. & Kelly, W. G., Nucleoplasmic and cytoplasmic glycoproteins., *Ciba Found Symp*, 1989, 145, 102-12, discussion 112-8
14. Hart, G. W.; Kreppel, L. K.; Comer, F. I.; Arnold, C. S.; Snow, D. M.; Ye, Z.; Cheng, X.; DellaManna, D.; Caine, D. S.; Earles, B. J.; Akimoto, Y.; Cole, R. N. & Hayes, B. K., O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization., *Glycobiology*, 1996, 6, 711-716
15. Holt, G. D.; Snow, C. M.; Senior, A.; Haltiwanger, R. S.; Gerace, L. & Hart, G. W., Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine., *J Cell Biol*, 1987, 104, 1157-1164
16. Iyer, S. P. N. & Hart, G. W., Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: enzymes of O-GlcNAc cycling., *Biochemistry*, 2003, 42, 2493-2499
17. Iyer, S. P. N. & Hart, G. W., Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity., *J Biol Chem*, 2003, 278, 24608-24616
18. Konrad, R. J.; Zhang, F.; Hale, J. E.; Knierman, M. D.; Becker, G. W. & Kudlow, J. E., Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase., *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293, 207-212
19. Kreppel, L. K.; Blomberg, M. A. & Hart, G. W., Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats., *J Biol Chem*, 1997, 272, 9308-9315
20. Ku, N. O. & Omary, M. B., Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18., *J Biol Chem*, 1995, 270, 11820-11827
21. Lazarus, B.D.; Roos, M.D. & Hanover, J.A., Mutational analysis of the catalytic domain of O-linked N-acetylglucosaminyl transferase., *J Biol Chem*, 2005, 280, 35537-35544.
22. Lee, H.; Guo, Y.; Ohta, M.; Xiong, L.; Stevenson, B. & Zhu, J., LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase., *EMBO J*, 2002, 21, 2692-2702
23. Lefebvre, T.; Ferreira, S.; Dupont-Wallois, L.; Bussière, T.; Dupire, M.; Delacourte, A.; Michalski, J. & Caillet-Boudin, M., Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization., *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1619, 167-176
24. Lefebvre, T.; Planque, N.; Leleu, D.; Bailly, M.; Caillet-Boudin, M.; Saule, S. &

- Michalski, J., O-glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neuroretina cells., *J Cell Biochem*, 2002, 85, 208-218
25. Love, D. C. & Hanover, J. A., The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code"., *Sci STKE*, 2005, 2005, re13
26. Majumdar, G.; Harmon, A.; Candelaria, R.; Martinez-Hernandez, A.; Raghov, R. & Solomon, S. S., O-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon., *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285, E584-E591
27. Manger, I. D.; Hehl, A. B. & Boothroyd, J. C., The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1., *Infect Immun*, 1998, 66, 2237-2244
28. Marchler-Bauer, A.; Anderson, J. B.; Cherukuri, P. F.; DeWeese-Scott, C.; Geer, L. Y.; Gwadz, M.; He, S.; Hurwitz, D. I.; Jackson, J. D.; Ke, Z.; Lanczycki, C. J.; Liebert, C. A.; Liu, C.; Lu, F.; Marchler, G. H.; Mullokandov, M.; Shoemaker, B. A.; Simonyan, V.; Song, J. S.; Thiessen, P. A.; Yamashita, R. A.; Yin, J. J.; Zhang, D. & Bryant, S. H., CDD: a Conserved Domain Database for protein classification., *Nucleic Acids Res*, 2005, 33, D192-D196
29. Maréchal, E. & Cesbron-Delauw, M. F., The apicoplast: a new member of the plastid family., *Trends Plant Sci*, 2001, 6, 200-205
30. Seeber, F. & Boothroyd, J. C., *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*, 1996, 169, 39-45
31. Soldati, D. & Boothroyd, J. C., Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*., *Science*, 1993, 260, 349-352
32. Tenter, A. M.; Heckerroth, A. R. & Weiss, L. M., *Toxoplasma gondii*: from animals to humans., *Int J Parasitol*, 2000, 30, 1217-1258
33. Torres, C. R. & Hart, G. W., Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc., *J Biol Chem*, 1984, 259, 3308-3317
34. Wong, S. Y. & Remington, J. S., Biology of *Toxoplasma gondii*., *AIDS*, 1993, 7, 299-316
35. Yang, S. & Parmley, S. F., *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts., *Gene*, 1997, 184, 1-12
36. Yap, G. S. & Sher, A., Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin

are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*., *J Exp Med*, 1999, 189, 1083-1092

37. Zachara, N. E. & Hart, G. W., Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc!, *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761, 599-617

38. Zhu, G., Current progress in the fatty acid metabolism in *Cryptosporidium parvum*., *J Eukaryot Microbiol*, 2004, 51, 381-388

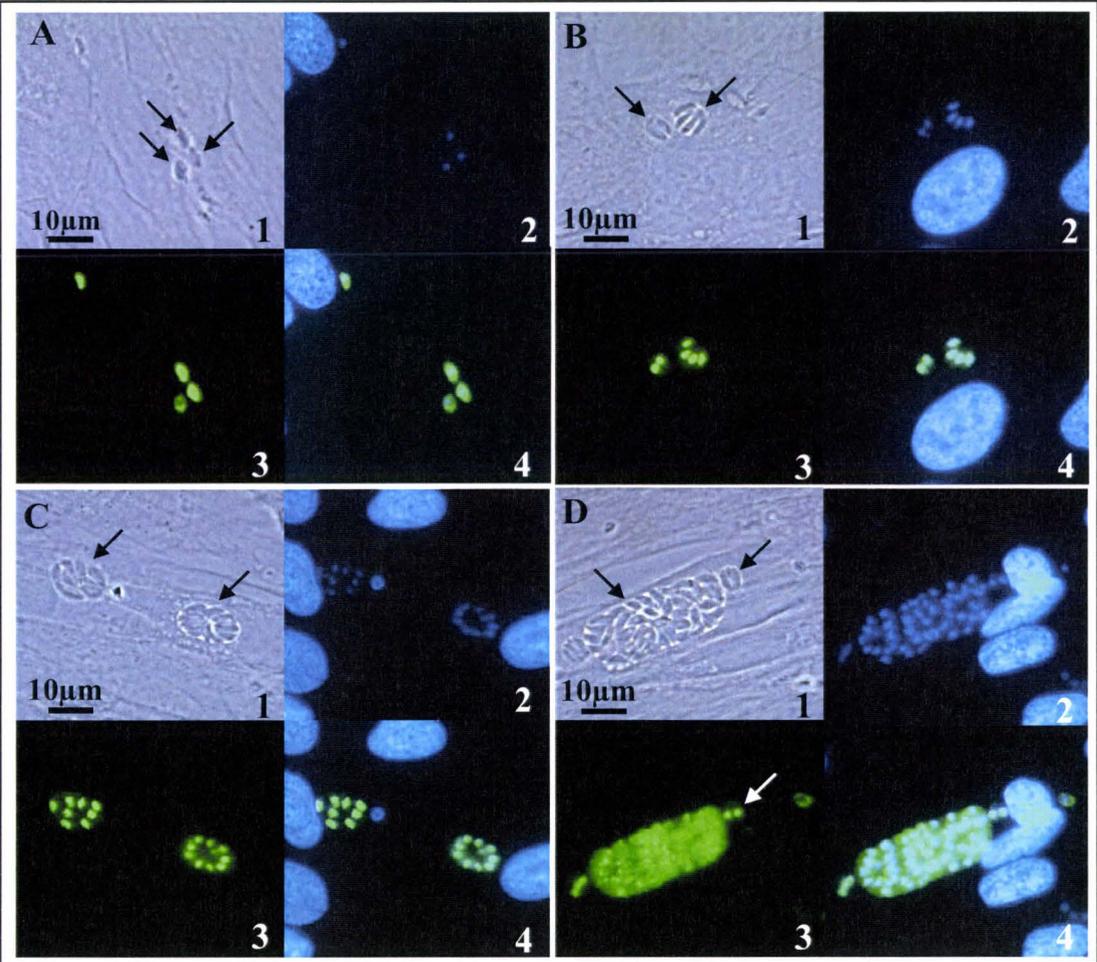
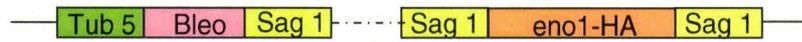


Figure 1

Figure 2

114

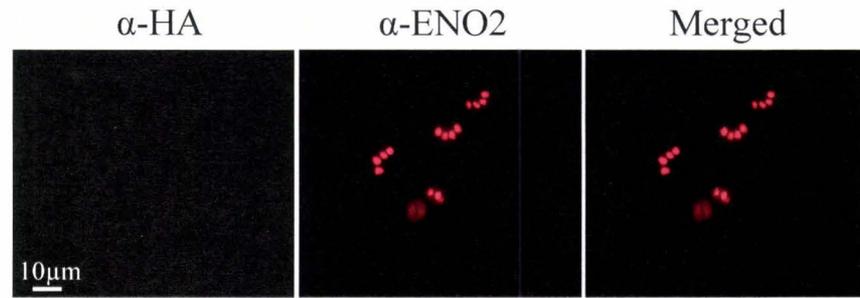


eno1-HA construct

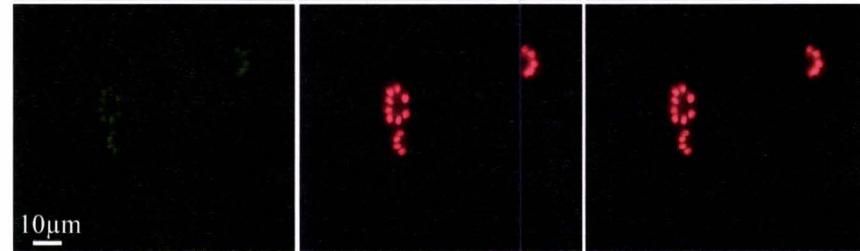


eno2-HA construct

76K



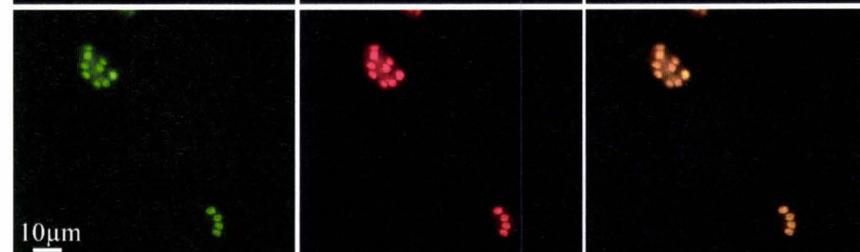
E1-1



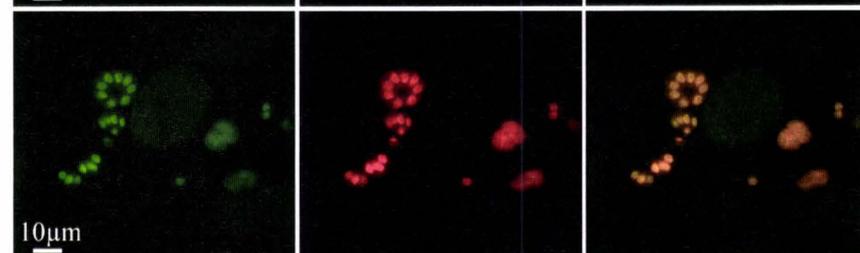
E1-5



E2-10



E2-4



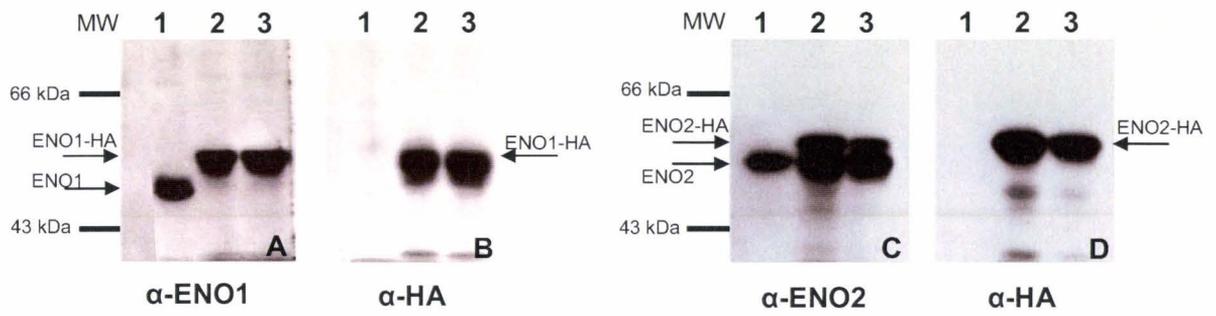


Figure 3

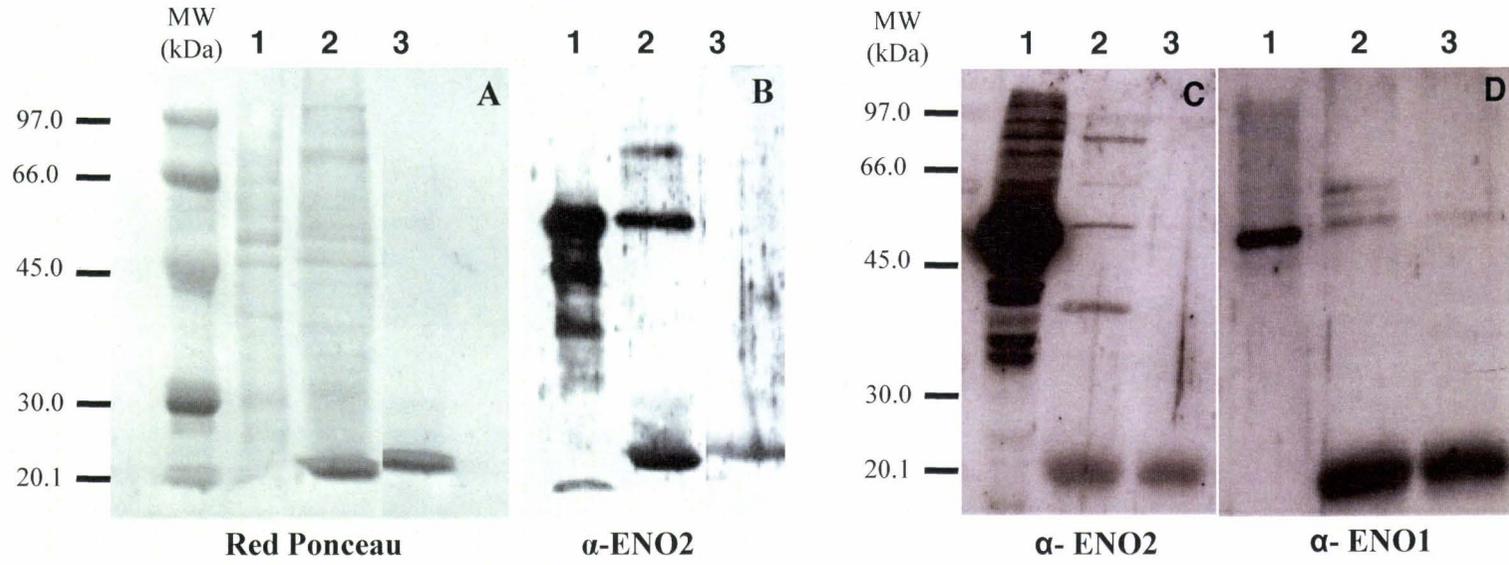


Figure 4

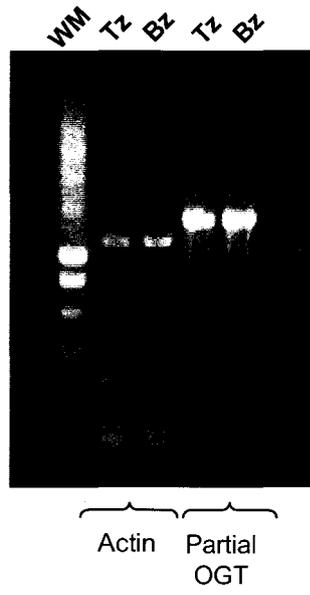


Figure 5

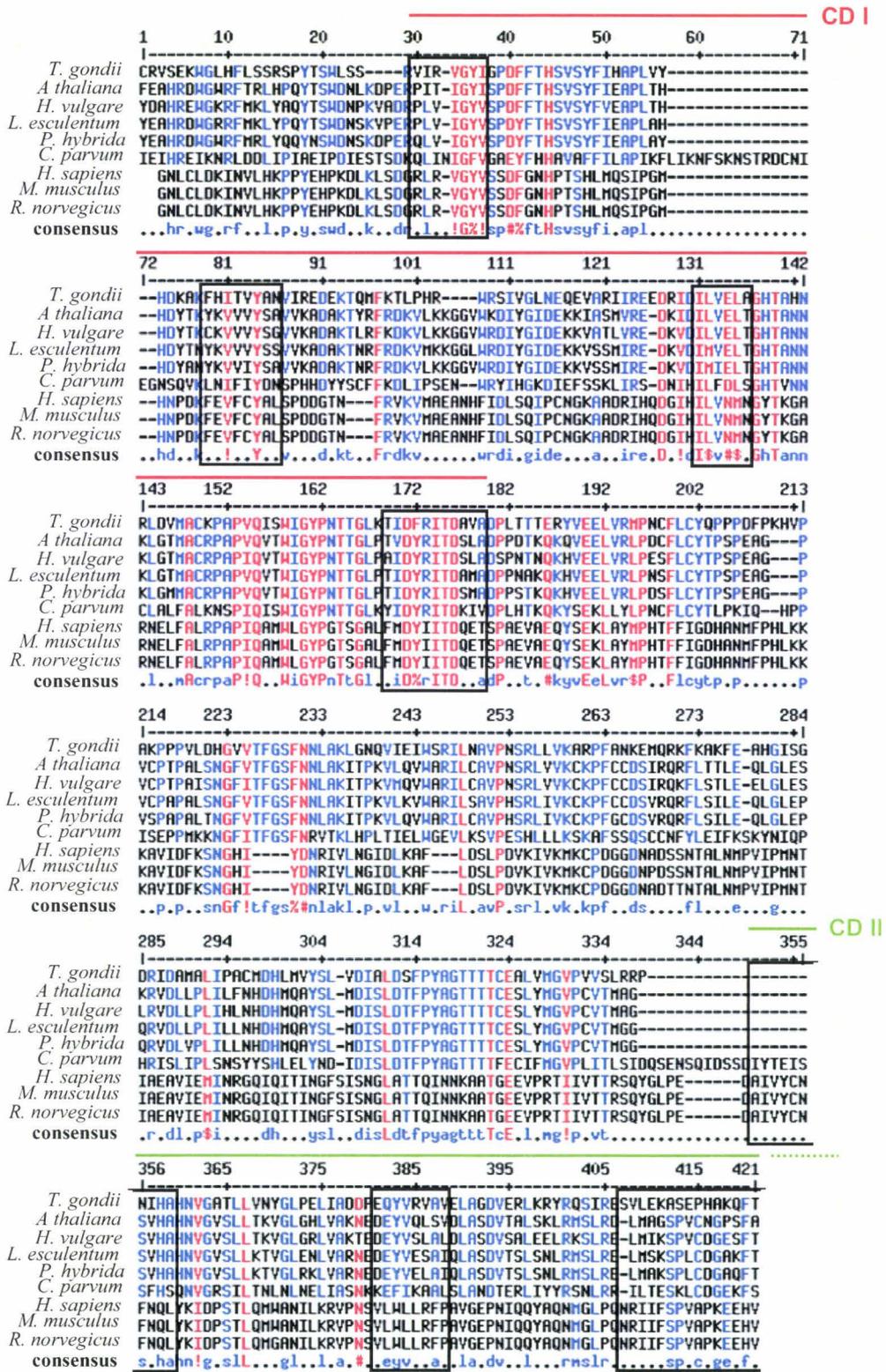
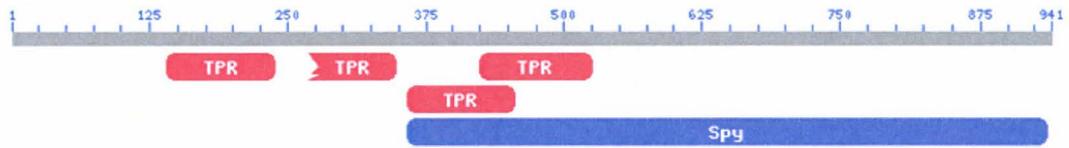
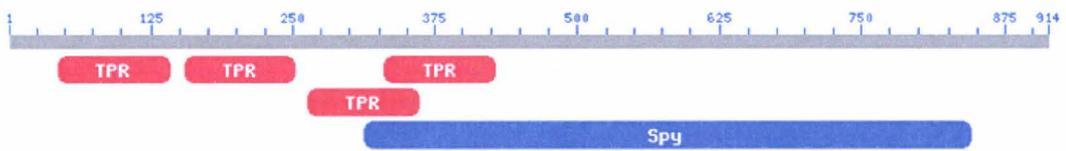


Figure 6

T. gondii



A. thaliana



H. sapiens



Figure 7

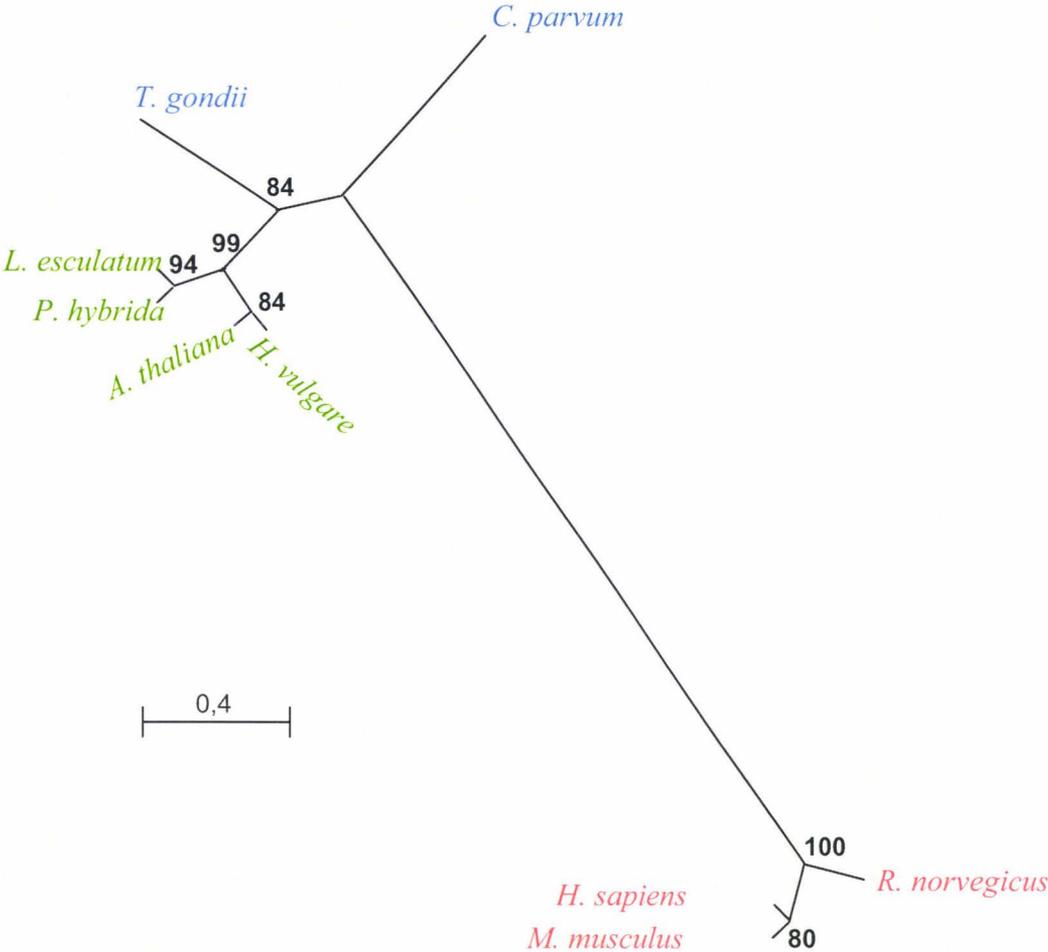


Figure 8

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

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

Aliberti, J.; Serhan, C. & Sher, A., Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection., *J Exp Med*, **2002**, *196*, 1253-1262.

Aliberti, J.; Valenzuela, J.G.; Carruthers, V.B.; Hieny, S.; Andersen, J.; Charest, H.; e Sousa, C.R.; Fairlamb, A.; Ribeiro, J.M. & Sher, A., Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. , *Nat Immunol*, **2003**, *4*, 485-490.

B

Beckers, C.J.; Dubremetz, J.F.; Puijalon, O.M. & Joiner, K.A., The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm., *J Cell Biol*, **1994**, *127*, 947-961.

Bergmann, S.; Rohde, M.; Chhatwal, G.S. & Hammerschmidt, S., Alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface., *Mol Microbiol*, **2001**, *40*, 1273-1287.

Black, M.W.; Arrizabalaga, G. & Boothroyd, J.C., Ionophore-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* reveal host cell permeabilization as an early event in egress., *Mol Cell Biol*, **2000**, *20*, 9399-9408.

Black, M.W. & Boothroyd, J.C., Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*., *Microbiol Mol Biol Rev*, **2000**, *64*, 607-623.

Bohne, W.; Heesemann, J. & Gross, U., Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages., *Infect Immun*, **1993**, *61*, 1141-1145.

Bohne, W.; Heesemann, J. & Gross, U., Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion., *Infect Immun*, **1994**, *62*, 1761-1767.

Bohne, W.; Gross, U.; Ferguson, D.J. & Heesemann, J., 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*, **1995**, *16*, 1221-1230.

Brossier, F.; Jewett, T.J.; Sibley, L.D. & Urban, S., A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**, *102*, 4146-4151.

Butcher, B.A. & Denkers, E.Y., Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production., *Infect Immun*, **2002**, *70*, 5216-5224.

Buxton, D. & Innes, E.A., A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis., *Parasitology*, **1995**, *110 Suppl*, S11-S16.

C

Cai, G.; Radzanowski, T.; Villegas, E.N.; Kastelein, R. & Hunter, C.A., Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*., *J Immunol*, **2000**, *165*, 2619-2627.

Callebaut, I.; Prat, K.; Meurice, E.; Morion, J. & Tomavo, S., Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: conserved features and differences relative to other eukaryotes., *BMC Genomics*, **2005**, *6*, 100.

Carruthers, V.B. & Sibley, L.D., Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts., *Eur J Cell Biol*, **1997**, *73*, 114-123.

Carruthers, V.B. & Sibley, L.D., Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*., *Mol Microbiol*, **1999**, *31*, 421-428.

Carruthers, V.B.; Håkansson, S.; Giddings, O.K. & Sibley, L.D., *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment., *Infect Immun*, **2000**, *68*, 4005-4011.

Carruthers, V.B.; Sherman, G.D. & Sibley, L.D., The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases., *J Biol Chem*, **2000**, *275*, 14346-14353.

Charron, A.J. & Sibley, L.D., Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*., *J Cell Sci*, **2002**, *115*, 3049-3059.

Cheng, X. & Hart, G.W., Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity., *J Biol Chem*, **2001**, *276*, 10570-10575.

Chiappino, M.L.; Nichols, B.A. & O'Connor, G.R., Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion., *J Protozool*, **1984**, *31*, 288-292.

Chou, T.Y.; Hart, G.W. & Dang, C.V., c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas., *J Biol Chem*, **1995**, *270*, 18961-18965.

Cleary, M.D.; Singh, U.; Blader, I.J.; Brewer, J.L. & Boothroyd, J.C., *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression., *Eukaryot Cell*, **2002**, *1*, 329-340.

Comer, F.I. & Hart, G.W., Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II., *Biochemistry*, **2001**, *40*, 7845-7852.

Comtesse, N.; Maldener, E. & Meese, E., Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase., *Biochem Biophys Res Commun*, **2001**, *283*, 634-640.

Coppens, I.; Sinai, A.P. & Joiner, K.A., *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition., *J Cell Biol*, **2000**, *149*, 167-180.

Coppin, A.; Dzierszynski, F.; Legrand, S.; Mortuaire, M.; Ferguson, D. & Tomavo, S., Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*., *Biochimie*, **2003**, *85*, 353-361.

Coppin, A.; Varré, J.; Lienard, L.; Dauvillée, D.; Guérardel, Y.; Gobillard, M.S.; Buléon, A.; Ball, S. & Tomavo, S., Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry., *J Mol Evol*, **2005**, *60*, 257-267.

D

Dauphinee, S.M.; Ma, M. & Too, C.K.L., Role of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells., *J Cell Biochem*, **2005**, *96*, 579-588.

de Melo, E.J. & de Souza, W., A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*., *Parasitol Res*, **1997**, *83*, 252-256.

de Melo, E.J.; Attias, M. & de Souza, W.D., The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*., *J Struct Biol*, **2000**, *130*, 27-33.

Denkers, E.Y.; Kim, L. & Butcher, B.A., In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signalling cascades during *Toxoplasma gondii* infection., *Cell Microbiol*, **2003**, *5*, 75-83.

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

Dieckmann-Schuppert, A.; Bause, E. & Schwarz, R. T., Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites., *Eur J Biochem*, **1993**, *216*, 779-788.

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

Duncanson, P.; Terry, R.S.; Smith, J.E. & Hide, G., High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock., *Int J Parasitol*, **2001**, *31*, 1699-1703.

Duverger, E.; Carpentier, V.; Roche, A.C. & Monsigny, M., Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol., *Exp Cell Res*, **1993**, *207*, 197-201.

Duverger, E.; Mendes, C.P.; Mayer, R.; Roche, A.C. & Monsigny, M., Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway., *J Cell Sci*, **1995**, *108* (Pt 4), 1325-1332.

Duverger, E.; Roche, A.C. & Monsigny, M., N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins., *Glycobiology*, **1996**, *6*, 381-386.

Dzierszinski, F.; Popescu, O.; Tourse, C.; Slomianny, C.; Yahiaoui, B. & Tomavo, S., The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. Implications for evolutionary origin of apicomplexans., *J Biol Chem*, **1999**, *274*, 24888-24895.

Dzierszinski, F.; Mortuaire, M.; Delauw, M.F.C. & Tomavo, S., Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice., *Mol Microbiol*, **2000**, *37*, 574-582.

Dzierszinski, F.; Mortuaire, M.; Dendouga, N.; Popescu, O. & Tomavo, S., Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*., *J Mol Biol*, **2001**, *309*, 1017-1027.

E

Echeverria, P.C.; Matrajt, M.; Harb, O.S.; Zappia, M.P.; Costas, M.A.; Roos, D.S.; Dubremetz, J.F. & Angel, S.O., *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated., *J Mol Biol*, **2005**, *350*, 723-734.

Endo, T.; Sethi, K.K. & Piekarski, G., *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages., *Exp Parasitol*, **1982**, *53*, 179-188.

F

Facchini, L.M. & Penn, L.Z., The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights., *FASEB J*, **1998**, *12*, 633-651.

Feo, S.; Arcuri, D.; Piddini, E.; Passantino, R. & Giallongo, A., ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1)., *FEBS Lett*, **2000**, *473*, 47-52.

Ferguson, D.J. & Hutchison, W.M., An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice., *Parasitol Res*, **1987**, *73*, 483-491.

Ferguson, D.J.P.; Parmley, S.F. & Tomavo, S., Evidence for nuclear localisation of two stage-specific isoenzymes of enolase in *Toxoplasma gondii* correlates with active parasite replication., *Int J Parasitol*, **2002**, *32*, 1399-1410.

Fortier, B. & Dubremetz, J.F., Structure et biologie de *Toxoplasma gondii*., *Med Mal Infect.*, **1993**, *23*, 148-153.

Frenkel, J.K.; Dubey, J.P. & Miller, N.L., *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts., *Science*, **1970**, *167*(919), 893-6.

Frenkel, J.K., Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology and immunology., *The Coccidia*. M., H. D. and Long, P. L. (Ed). University Park Press, Baltimore, Butterworth, London. **1973**, 343-410.

Freyre, A.; Dubey, J.P.; Smith, D.D. & Frenkel, J.K., Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats., *J Parasitol.*, **1989**, *75*(5), 750-5.

Fukao, T.; Frucht, D.M.; Yap, G.; Gadina, M.; O'Shea, J.J. & Koyasu, S., Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses., *J Immunol*, **2001**, *166*, 4446-4455.

G

Gallino, A.; Maggiorini, M.; Kiowski, W.; Martin, X.; Wunderli, W.; Schneider, J.; Turina, M. & Follath, F., Toxoplasmosis in heart transplant recipients., *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **1996**, *15*, 389-393.

- Gao, Y.; Parker, G.J. & Hart, G.W.**, Streptozotocin-induced beta-cell death is independent of its inhibition of O-GlcNAcase in pancreatic Min6 cells., *Arch Biochem Biophys*, **2000**, *383*, 296-302.
- Gavrilescu, L.C. & Denkers, E.Y.**, Interleukin-12 p40- and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*., *Infect Immun*, **2003**, *71*, 2577-2583.
- Gazzinelli, R.T.; Oswald, I.P.; James, S.L. & Sher, A.**, IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages., *J Immunol*, **1992**, *148*, 1792-1796.
- Gewinner, C.; Hart, G.; Zachara, N.; Cole, R.; Huss, C.B. & Groner, B.**, The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5., *J Biol Chem*, **2004**, *279*, 3563-3572.
- Goldberg, H.J.; Whiteside, C.I.; Hart, G.W. & Fantus, I.G.**, Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells., *Endocrinology*, **2006**, *147*, 222-231.
- Golding, H.; Aliberti, J.; King, L.R.; Manischewitz, J.; Andersen, J.; Valenzuela, J.; Landau, N.R. & Sher, A.**, Inhibition of HIV-1 infection by a CCR5-binding cyclophilin from *Toxoplasma gondii*., *Blood*, **2003**, *102*, 3280-3286.
- Golding, H.; Khurana, S.; Yarovinsky, F.; King, L.R.; Abdoulaeva, G.; Antonsson, L.; Owman, C.; Platt, E.J.; Kabat, D.; Andersen, J.F. & Sher, A.**, CCR5 N-terminal region plays a critical role in HIV-1 inhibition by *Toxoplasma gondii*-derived cyclophilin-18., *J Biol Chem*, **2005**, *280*, 29570-29577.
- Görlich, D. & Mattaj, I.W.**, Nucleocytoplasmic transport., *Science*, **1996**, *271*, 1513-1518.
- Gross, U.; Bormuth, H.; Gaissmaier, C.; Dittrich, C.; Krenn, V.; Bohne, W. & Ferguson, D.J.**, Monoclonal rat antibodies directed against *Toxoplasma gondii* suitable for studying tachyzoite-bradyzoite interconversion in vivo., *Clin Diagn Lab Immunol*, **1995**, *2*, 542-548.
- Gross, U.; Bohne, W.; Lüder, C.G.; Lugert, R.; Seeber, F.; Dittrich, C.; Pohl, F. & Ferguson, D.J.**, Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*., *J Eukaryot Microbiol*, **1996**, *43*, 114S-116S.
- Gross, U.; Holpert, M. & Goebel, S.**, Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis., *Ann Ist Super Sanita*, **2004**, *40*, 65-70.
- Gross, B.J.; Kraybill, B.C. & Walker, S.**, Discovery of O-GlcNAc transferase inhibitors., *J Am Chem Soc*, **2005**, *127*, 14588-14589.
- Guinez, C.; Lemoine, J.; Michalski, J. & Lefebvre, T.**, 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine., *Biochem Biophys Res Commun*, **2004**, *319*, 21-26.

Guinez, C.; Morelle, W.; Michalski, J. & Lefebvre, T., O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?, *Int J Biochem Cell Biol*, **2005**, *37*, 765-774.

H

Haltiwanger, R.S.; Holt, G.D. & Hart, G.W., Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase., *J Biol Chem*, **1990**, *265*, 2563-2568.

Haltiwanger, R.S.; Blomberg, M.A. & Hart, G.W., Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase., *J Biol Chem*, **1992**, *267*, 9005-9013.

Haltiwanger, R.S.; Busby, S.; Grove, K.; Li, S.; Mason, D.; Medina, L.; Moloney, D.; Philipsberg, G. & Scartozzi, R., O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation?, *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**, *231*, 237-242.

Haltiwanger, R.S.; Grove, K. & Philipsberg, G.A., Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate., *J Biol Chem*, **1998**, *273*, 3611-3617.

Han, I. & Kudlow, J.E., Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility., *Mol Cell Biol*, **1997**, *17*, 2550-2558.

Hanover, J.A.; Yu, S.; Lubas, W.B.; Shin, S.H.; Caracciola, M.R.; Kochran, J. & Love, D.C. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene., *Arch Biochem Biophys*, **2003**, *409*, 287-297.

Hanover, J.A.; Forsythe, M.E.; Hennessey, P.T.; Brodigan, T.M.; Love, D.C.; Ashwell, G. & Krause, M., A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**, *102*, 11266-11271.

Hart, G.W.; Kreppel, L.K.; Comer, F.I.; Arnold, C.S.; Snow, D.M.; Ye, Z.; Cheng, X.; DellaManna, D.; Caine, D.S.; Earles, B.J.; Akimoto, Y.; Cole, R.N. & Hayes, B.K., O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization., *Glycobiology*, **1996**, *6*, 711-716.

Hartweck, L.M.; Scott, C.L. & Olszewski, N.E., Two O-linked N-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development., *Genetics*, **2002**, *161*, 1279-1291.

Heckel, D.; Comtesse, N.; Brass, N.; Blin, N.; Zang, K.D. & Meese, E., Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma., *Hum Mol Genet*, **1998**, *7*, 1859-1872.

Hidalgo, H.F.; Pelloux, H.; Bost, M.; Fleuret, A.G. & Thomas, P.A., [Congenital toxoplasmosis: contribution of postnatal biological follow-up], *Presse Med*, **1996**, *25*, 1868-1872.

Holt, G.D. & Hart, G.W., The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc., *J Biol Chem*, **1986**, *261*, 8049-8057.

Hood, J.K. & Silver, P.A., In or out? Regulating nuclear transport., *Curr Opin Cell Biol*, **1999**, *11*, 241-247.

Howe, D.K. & Sibley, L.D., *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease., *J Infect Dis*, **1995**, *172*, 1561-1566.

Hunter, C.A.; Subauste, C.S.; Cleave, V.H.V. & Remington, J.S., Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha., *Infect Immun*, **1994**, *62*, 2818-2824.

Hutchinson, W.M.; Dunachie, J.F.; Siim, J.C. & Work, K., Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*., *Br Med J*, **1970**, *1(689)*, 142:4.

I

Israelski, D.M. & Remington, J.S., Toxoplasmosis in patients with cancer., *Clin Infect Dis*, **1993**, *17 Suppl 2*, S423-S435.

Iyer, S.P.N. & Hart, G.W., Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity., *J Biol Chem*, **2003**, *278*, 24608-24616.

J

Janku, J., Pathogenèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microphthalmalme avec parasitémie de la rétine., *Cas Lec Cesk*, **1923**, *62*, 1021-7.

Jewett, T.J. & Sibley, L.D., Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites., *Mol Cell*, **2003**, *11*, 885-894.

Jínek, M.; Rehwinkel, J.; Lazarus, B.D.; Izaurralde, E.; Hanover, J.A. & Conti, E., The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha., *Nat Struct Mol Biol*, **2004**, *11*, 1001-1007.

K

Kamemura, K. & Hart, G.W., Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription., *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **2003**, *73*, 107-136.

Kearse, K.P. & Hart, G.W., Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**, *88*, 1701-1705.

Kibe, M.K.; Coppin, A.; Dendouga, N.; Oria, G.; Meurice, E.; Mortuaire, M.; Madec, E. & Tomavo, S., Transcriptional regulation of two stage-specifically expressed genes in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*., *Nucleic Acids Res*, **2005**, *33*, 1722-1736.

Kim, E.J.; Kang, D.O.; Love, D.C. & Hanover, J.A., Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate., *Carbohydr Res*, **2006**, *341*, 971-982.

Kirkman, L.A.; Weiss, L.M. & Kim, K., Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation., *Infect Immun*, **2001**, *69*, 148-153.

Kiseleva, E.; Goldberg, M.W.; Cronshaw, J. & Allen, T.D., The nuclear pore complex: structure, function, and dynamics., *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **2000**, *10*, 101-112.

Knoll, L.J. & Boothroyd, J.C., 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*, **1998**, *18*, 807-814.

Konrad, R.J.; Zhang, F.; Hale, J.E.; Knierman, M.D.; Becker, G.W. & Kudlow, J.E., Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase., *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**, *293*, 207-212.

Kreppel, L.K.; Blomberg, M.A. & Hart, G.W., Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats., *J Biol Chem*, **1997**, *272*, 9308-9315.

Kreppel, L.K. & Hart, G.W., Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats., *J Biol Chem*, **1999**, *274*, 32015-32022.

Ku, N.O. & Omary, M.B., Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18., *J Biol Chem*, **1995**, *270*, 11820-11827.

L

Lazarus, B.D.; Roos, M.D. & Hanover, J.A., Mutational analysis of the catalytic domain of O-linked N-acetylglucosaminyl transferase., *J Biol Chem*, **2005**, *280*, 35537-35544.

- Lazarus, B.D.; Love, D.C. & Hanover, J.A.**, Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates., *Glycobiology*, **2006**, *16*, 415-421.
- Lebech, M.; Joynson, D.H.; Seitz, H.M.; Thulliez, P.; Gilbert, R.E.; Dutton, G.N.; Ovlisen, B. & Petersen, E.**, Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis., *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **1996**, *15*, 799-805.
- Lee, H.; Guo, Y.; Ohta, M.; Xiong, L.; Stevenson, B. & Zhu, J.**, LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase., *EMBO J*, **2002**, *21*, 2692-2702.
- Lefebvre, T.; Cieniewski, C.; Lemoine, J.; Guerardel, Y.; Leroy, Y.; Zanetta, J.P. & Michalski, J.C.**, Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins., *Biochem J*, **2001**, *360*, 179-188.
- Lefebvre, T.; Ferreira, S.; Wallois, L.D.; Bussi re, T.; Dupire, M.; Delacourte, A.; Michalski, J. & Boudin, M.C.**, Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization., *Biochim Biophys Acta*, **2003**, *1619*, 167-176.
- Lekutis, C.; Ferguson, D.J. & Boothroyd, J.C.**, *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2., *Exp Parasitol*, **2000**, *96*, 89-96.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich, A.R.; 3rd; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J. & Wallace, F.G.**, A newly revised classification of the protozoa., *J Protozool.*, **1980**, *27(1)*, 37-58.
- Love, D.C.; Kochan, J.; Cathey, R.L.; Shin, S.; Hanover, J.A. & Kochran, J.**, Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase., *J Cell Sci*, **2003**, *116*, 647-654.
- Love, D.C. & Hanover, J.A.**, The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code"., *Sci STKE*, **2005**, *2005*, re13.
- Lubas, W.A. & Hanover, J.A.**, Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity., *J Biol Chem*, **2000**, *275*, 10983-10988.
- Luft, B.J. & Remington, J.S.**, Toxoplasmic encephalitis in AIDS., *Clin Infect Dis*, **1992**, *15*, 211-222.
- L der, C.G.; Lang, T.; Beuerle, B. & Gross, U.**, Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*., *Clin Exp Immunol*, **1998**, *112*, 308-316.

M

Manger, I.D.; Hehl, A.; Parmley, S.; Sibley, L.D.; Marra, M.; Hillier, L.; Waterston, R. & Boothroyd, J.C., Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes., *Infect Immun*, **1998**, *66*, 1632-1637.

Marshall, S. & Okuyama, R., Differential effects of vanadate on UDP-N-acetylglucosaminyl transferase activity derived from cytosol and nucleosol., *Biochem Biophys Res Commun*, **2004**, *318*, 911-915.

Meissner, M.; Brecht, S.; Bujard, H. & Soldati, D., Modulation of myosin A expression by a newly established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*., *Nucleic Acids Res*, **2001**, *29*, E115.

Meissner, M.; Schlüter, D. & Soldati, D., Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion., *Science*, **2002**, *298*, 837-840.

Meissner, M.; Krejany, E.; Gilson, P.R.; de Koning-Ward, T.F.; Soldati, D. & Crabb, B.S., Tetracycline analogue-regulated transgene expression in Plasmodium falciparum blood stages using *Toxoplasma gondii* transactivators., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**, *102*, 2980-2985.

Moore, M.S. & Blobel, G., The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors., *Cell*, **1992**, *69*, 939-950.

Mordue, D.G.; Desai, N.; Dustin, M. & Sibley, L.D., Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring., *J Exp Med*, **1999**, *190*, 1783-1792.

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

Moudy, R.; Manning, T.J. & Beckers, C.J., The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*., *J Biol Chem*, **2001**, *276*, 41492-41501.

N

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

Nash, P.B.; Purner, M.B.; Leon, R.P.; Clarke, P.; Duke, R.C. & Curiel, T.J., *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis., *J Immunol*, **1998**, *160*, 1824-1830.

Nicolle, C. & Manceaux, L., Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi., *C R Acad Sci.*, **1908**, *147*, 763-66.

Nolte, D. & Müller, U., Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1., *Mamm Genome*, **2002**, *13*, 62-64.

Norrby, R. & Lycke, E., Factors enhancing the host-cell penetration of *Toxoplasma gondii*., *J Bacteriol*, **1967**, *93*, 53-58.

O

Odaert, H.; Soète, M.; Fortier, B.; Camus, D. & Dubremetz, J.F., Stage conversion of *Toxoplasma gondii* in mouse brain during infection and immunodepression., *Parasitol Res*, **1996**, *82*, 28-31.

Odberg-Ferragut, C.; Soète, M.; Engels, A.; Samyn, B.; Loyens, A.; Beeumen, J.V.; Camus, D. & Dubremetz, J.F., Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein., *Mol Biochem Parasitol*, **1996**, *82*, 237-244.

P

Parmley, S.F.; Yang, S.; Harth, G.; Sibley, L.D.; Sucharczuk, A. & Remington, J.S., Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts., *Mol Biochem Parasitol*, **1994**, *66*, 283-296.

Parmley, S.F.; Weiss, L.M. & Yang, S., Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen., *Mol Biochem Parasitol*, **1995**, *73*, 253-257.

Peck, A.H.; Cole, R.N.; Borkhsenius, O.N.; Hart, G.W. & Raikhel, N.V., Plant nuclear pore complex proteins are modified by novel oligosaccharides with terminal N-acetylglucosamine., *Plant Cell*, **1995**, *7*, 1459-1471.

Pfefferkorn, E.R., The cell biology of *Toxoplasma gondii*., *Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects*, Wyler, D. J. (Ed). Freeman, New York, **1986**, 26-50.

Pichler, A. & Melchior, F., Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport., *Traffic*, **2002**, *3*, 381-387.

Previato, J. O.; Sola-Penna, M.; Agrellos, O. A.; Jones, C.; Oeltmann, T.; Travassos, L. R. & Mendonça-Previato, L., Biosynthesis of O-N-acetylglucosamine-linked glycans in *Trypanosoma cruzi*. Characterization of the novel uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-catalyzing formation of N-acetylglucosamine alpha1-->O-threonine., *J Biol Chem*, **1998**, *273*, 14982-14988.

R

Rabenau, K.E.; Sohrabi, A.; Tripathy, A.; Reitter, C.; Ajioka, J.W.; Tomley, F.M. & Carruthers, V.B., TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with the adhesive protein TgMIC2., *Mol Microbiol*, **2001**, *41*, 537-547.

Radke, J.R.; Behnke, M.S.; Mackey, A.J.; Radke, J.B.; Roos, D.S. & White, M.W., The transcriptome of *Toxoplasma gondii*., *BMC Biol*, **2005**, *3*, 26.

Read, M.; Hicks, K.E.; Sims, P.F. & Hyde, J.E., Molecular characterisation of the enolase gene from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Evidence for ancestry within a photosynthetic lineage., *Eur J Biochem*, **1994**, *220*, 513-520.

Reiss, M.; Viebig, N.; Brecht, S.; Fourmaux, M.N.; Soete, M.; Cristina, M.D.; Dubremetz, J.F. & Soldati, D., Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*., *J Cell Biol*, **2001**, *152*, 563-578.

Rio, L.D.; Butcher, B.A.; Bennouna, S.; Hieny, S.; Sher, A. & Denkers, E.Y., *Toxoplasma gondii* triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors., *J Immunol*, **2004**, *172*, 6954-6960.

Roos, D.S.; Crawford, M.J.; Donald, R.G.; Kissinger, J.C.; Klimczak, L.J. & Striepen, B., Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid., *Curr Opin Microbiol*, **1999**, *2*, 426-432.

S

Sabin, A.B., Toxoplasmic encephalitis in children., *J AM Med Assoc.*, **1941**, *116*, 801-807.

Saksouk, N.; Bhatti, M.M.; Kieffer, S.; Smith, A.T.; Musset, K.; Garin, J.; Sullivan, W.J.; Delauw, M.C. & Hakimi, M., Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*., *Mol Cell Biol*, **2005**, *25*, 10301-10314.

Scanga, C.A.; Aliberti, J.; Jankovic, D.; Tilloy, F.; Bennouna, S.; Denkers, E.Y.; Medzhitov, R. & Sher, A., Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells., *J Immunol*, **2002**, *168*, 5997-6001.

Scharton-Kersten, T.M.S.; Wynn, T.A.; Denkers, E.Y.; Bala, S.; Grunvald, E.; Hieny, S.; Gazzinelli, R.T. & Sher, A., In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection., *J Immunol*, **1996**, *157*, 4045-4054.

Schultz, J. & Pils, B., Prediction of structure and functional residues for O-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferases., *FEBS Lett*, **2002**, *529*, 179-182.

- Schuppert**, A.D.; Bause, E. & Schwarz, R.T., Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites., *Eur J Biochem*, **1993**, *216*, 779-788.
- Schwab**, J.C.; Beckers, C.J. & Joiner, K.A., The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1994**, *91*, 509-513.
- Schwarz**, J.A.; Fouts, A.E.; Cummings, C.A.; Ferguson, D.J.P. & Boothroyd, J.C., A novel rhoptry protein in *Toxoplasma gondii* bradyzoites and merozoites., *Mol Biochem Parasitol*, **2005**, *144*, 159-166.
- Shafi**, R.; Iyer, S.P.; Ellies, L.G.; O'Donnell, N.; Marek, K.W.; Chui, D.; Hart, G.W. & Marth, J.D., The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**, *97*, 5735-5739.
- Sher**, A.; Oswald, I.P.; Hieny, S. & Gazzinelli, R.T., *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha., *J Immunol*, **1993**, *150*, 3982-3989.
- Sibley**, L.D. & Boothroyd, J.C., Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage., *Nature*, **1992**, *359*, 82-85.
- Sibley**, L.D.; LeBlanc, A.J.; Pfefferkorn, E.R. & Boothroyd, J.C., Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*., *Genetics*, **1992**, *132*, 1003-1015.
- Sinai**, A.P. & Joiner, K.A., The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane., *J Cell Biol*, **2001**, *154*, 95-108.
- Singh**, U.; Brewer, J.L. & Boothroyd, J.C., Genetic analysis of tachyzoite to bradyzoite differentiation mutants in *Toxoplasma gondii* reveals a hierarchy of gene induction., *Mol Microbiol*, **2002**, *44*, 721-733.
- Snow**, D.M.; Saper, J.H.; Shaper, N.L. & Hart, G.W., Cytosolic galactosyltransferase mediated capping of O-GlcNAc in CHO cells: a model to elucidate function., *Mol. Biol. Cell*, **1996**, *6*, 357a.
- Soète**, M.; Fortier, B.; Camus, D. & Dubremetz, J.F., *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro., *Exp Parasitol*, **1993**, *76*, 259-264.
- Soète**, M.; Camus, D. & Dubremetz, J.F., Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro., *Exp Parasitol*, **1994**, *78*, 361-370.
- Sohn**, K.; Lee, K.; Park, J.E. & Do, S., OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: a unique defense role of OGT in hyperthermia., *Biochem Biophys Res Commun*, **2004**, *322*, 1045-1051.

Soldati, D. & Boothroyd, J.C., A selector of transcription initiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*., *Mol Cell Biol*, **1995**, *15*, 87-93.

Soldati, D.; Kim, K.; Kampmeier, J.; Dubremetz, J.F. & Boothroyd, J.C., Complementation of a *Toxoplasma gondii* ROP1 knock-out mutant using phleomycin selection., *Mol Biochem Parasitol*, **1995**, *74*, 87-97.

Soldati, D.; Lassen, A.; Dubremetz, J.F. & Boothroyd, J.C., Processing of Toxoplasma ROP1 protein in nascent rhoptries., *Mol Biochem Parasitol*, **1998**, *96*, 37-48.

Spano, F.; Ricci, I.; Cristina, M.D.; Possenti, A.; Tinti, M.; Dendouga, N.; Tomavo, S. & Crisanti, A., The SAG5 locus of *Toxoplasma gondii* encodes three novel proteins belonging to the SAG1 family of surface antigens., *Int J Parasitol*, **2002**, *32*, 121-131.

Su, C.; Howe, D.K.; Dubey, J.P.; Ajioka, J.W. & Sibley, L.D., Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**, *99*, 10753-10758.

Subramanian, A. & Miller, D.M., Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene., *J Biol Chem*, **2000**, *275*, 5958-5965.

Sullivan, W.J. & Hakimi, M., Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*., *Mol Biochem Parasitol*, **2006**, *148*, 109-116.

Sullivan, W.J. & Smith, C.K., Cloning and characterization of a novel histone acetyltransferase homologue from the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* reveals a distinct GCN5 family member., *Gene*, **2000**, *242*, 193-200.

T

Thornton; Swain & Olszewski., Gibberellin signal transduction presents ellipsis the SPY who O-GlcNAc'd me., *Trends Plant Sci*, **1999**, *4*, 424-428.

Toleman, C.; Paterson, A.J.; Whisenhunt, T.R. & Kudlow, J.E., Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities., *J Biol Chem*, **2004**, *279*, 53665-53673.

Tomavo, S.; Schwarz, R.T. & Dubremetz, J.F., Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens., *Mol Cell Biol*, **1989**, *9*, 4576-4580.

Tomavo, S.; Fortier, B.; Soete, M.; Ansel, C.; Camus, D. & Dubremetz, J.F., Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*., *Infect Immun*, **1991**, *59*, 3750-3753.

Tomavo, S. & Boothroyd, J.C., Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*., *Int J Parasitol*, **1995**, *25*, 1293-1299.

Torres, C.R. & Hart, G.W., Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc., *J Biol Chem*, **1984**, *259*, 3308-3317.

V

Valacco, M.P.; Varone, C.; Malicet, C.; Cánepa, E.; Iovanna, J.L. & Moreno, S., Cell growth-dependent subcellular localization of p8., *J Cell Biochem*, **2006**, *97*, 1066-1079.

Vivier, E. & Petitprez, A., The outer membrane complex and its development at the time of the formation of daughter cells in *Toxoplasma gondii*., *J Cell Biol.*, **1969**, *43(2)*, 329-42.

W

Wan, K.L.; Blackwell, J.M. & Ajioka, J.W., *Toxoplasma gondii* expressed sequence tags: insight into tachyzoite gene expression., *Mol Biochem Parasitol*, **1996**, *75*, 179-186.

Weiss, L.M.; Ma, Y.F.; Takvorian, P.M.; Tanowitz, H.B. & Wittner, M., Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response., *Infect Immun*, **1998**, *66*, 3295-3302.

Wells, L.; Vosseller, K.; Cole, R.N.; Cronshaw, J.M.; Matunis, M.J. & Hart, G.W., Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications., *Mol Cell Proteomics*, **2002**, *1*, 791-804.

Wells, L.; Kreppel, L.K.; Comer, F.I.; Wadzinski, B.E. & Hart, G.W., O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits., *J Biol Chem*, **2004**, *279*, 38466-38470.

Whisenhunt, T.R.; Yang, X.; Bowe, D.B.; Paterson, A.J.; Tine, B.A.V. & Kudlow, J.E., Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development., *Glycobiology*, **2006**, *16*, 551-563.

Wong, S.Y. & Remington, J.S., Biology of *Toxoplasma gondii*., *AIDS*, **1993**, *7*, 299-316.

Wrabl, J.O. & Grishin, N.V., Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily., *J Mol Biol*, **2001**, *314*, 365-374.

Y

Yahiaoui, B.; Dzierszynski, F.; Bernigaud, A.; Slomianny, C.; Camus, D. & Tomavo, S., Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated

transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*., *Mol Biochem Parasitol*, **1999**, *99*, 223-235.

Yang, S. & Parmley, S.F., *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts., *Gene*, **1997**, *184*, 1-12.

Yang, S. & Parmley, S.F., A bradyzoite stage-specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase., *Mol Biochem Parasitol*, **1995**, *73*, 291-294.

Yang, X.; Su, K.; Roos, M.D.; Chang, Q.; Paterson, A.J. & Kudlow, J.E., O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, *98*, 6611-6616.

Yang, X.; Zhang, F. & Kudlow, J.E., Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression., *Cell*, **2002**, *110*, 69-80.

Yarovinsky, F.; Zhang, D.; Andersen, J.F.; Bannenberg, G.L.; Serhan, C.N.; Hayden, M.S.; Hieny, S.; Sutterwala, F.S.; Flavell, R.A.; Ghosh, S. & Sher, A., TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein., *Science*, **2005**, *308*, 1626-1629.

Yarovinsky, F. & Sher, A., Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*., *Int J Parasitol*, **2006**, *36*, 255-259.

Z

Zachara, N.E.; O'Donnell, N.; Cheung, W.D.; Mercer, J.J.; Marth, J.D. & Hart, G.W., Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells., *J Biol Chem*, **2004**, *279*, 30133-30142.

Zachara, N.E. & Hart, G.W., Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc!, *Biochim Biophys Acta*, **2006**, *1761*, 599-617.

Zhang, F.; Su, K.; Yang, X.; Bowe, D.B.; Paterson, A.J. & Kudlow, J.E., O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome., *Cell*, **2003**, *115*, 715-725.

