



Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
U.F.R. DE MEDECINE
Ecole Doctorale Sciences, Technologies, Santé (ED 358)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Biologie Parasitaire

Soutenue publiquement le 11 Décembre 2012

Par

Christelle Doliwa

**Caractérisation par protéomique et transcriptomique des
mécanismes de résistance à la sulfadiazine chez
*Toxoplasma gondii***

Membres du Jury

<u>Rapporteurs</u>	Monsieur le Professeur Hervé PELLOUX (Grenoble) Monsieur le Docteur Stanislas TOMAVO (Lille)
<u>Examineurs</u>	Madame le Professeur Marie-Laure DARDE (Limoges) Madame le Docteur Christine SCHAEFFER-REISS (Strasbourg) Monsieur le Professeur Jonathan WASTLING (Liverpool)
<u>Directeurs de thèse</u>	Madame le Professeur Isabelle VILLENA (Reims) Madame le Docteur Sandie ESCOTTE-BINET (Reims)

N° attribué par la bibliothèque

|| R | E | I | | | | | ©

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à Madame le Professeur Isabelle Villena pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour avoir dirigé cette thèse. Je vous remercie pour votre confiance, votre disponibilité et vos conseils. Après trois années passées dans votre équipe, j'ai acquis une grande autonomie qui me permet d'affronter la suite sans aucune crainte.

Je remercie Monsieur le Professeur Hervé Pelloux pour l'honneur qu'il me fait d'être rapporteur de ce travail. Veuillez accepter mes sincères remerciements et soyez assuré de mon respect.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Docteur Stanislas Tomavo pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. Je vous remercie également pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, pour vos conseils scientifiques et votre sympathie.

I thank Professor Jonathan Wastling for reviewing this work but especially for giving me a warm welcome on his team during few months. I thank you for your help and your precious advices. Working with you was a great honour to me.

J'adresse mes remerciements les plus respectueux à Madame le Professeur Marie-Laure Dardé pour avoir accepté d'examiner mon travail. Veuillez accepter mes sincères remerciements pour votre présence dans ce jury.

Je remercie Madame le Docteur Christine Schaeffer-Reiss pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour la collaboration initiée entre nos deux équipes. Soyez remercié pour votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique et votre sympathie à mon égard.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame le Docteur Sandie Escotte-Binet pour avoir codirigé ce travail. Bien plus qu'une encadrante (je n'oublierai jamais nos débuts (difficiles) dans le monde de la protéomique), tu es, pour moi, un pilier du laboratoire qui trouve toujours les mots pour remonter le moral des troupes ! Merci pour ton aide et ton amitié.

Je remercie sincèrement Monsieur le Docteur Dominique Aubert pour son aide tout au long de cette thèse. Je te serai toujours reconnaissante pour ton investissement dans ce travail. Merci pour ton implication et de m'avoir permis de réaliser un si joli travail. Je terminerai par un seul mot : Hola!

Je remercie également Madame le Docteur Marie-Lazarine Poulle et Monsieur le Professeur Loïc Favennec pour leur sympathie et leurs précieux conseils.

Je remercie toute l'équipe du service Parasitologie du CHU pour leur gentillesse et plus particulièrement Régine, Naïma et Emilie que j'ai souvent sollicitées et qui ont toujours répondu présentes avec le sourire. Merci pour votre amitié les filles !

Je remercie le Docteur Frédéric Velard pour son aide et ses précieux conseils, sa confiance et son amitié. Aurore, ma copine d'amour, merci pour tout ce que tu m'as appris, pour tous les bons moments partagés, pour ton SP+++ mais surtout pour ton humour dont je suis totalement fan !! Je remercie également votre bout de chou, Raphaël, pour ses raphaélismes qui redonnent le sourire !

I thank all people encountered in Liverpool for their warm welcome: Jenna, Gianluca, Kat, Nadine, Sanya, Sarah, I especially thank Dr Emma Newsham to learn me all the secrets of DIGE experiments (damned DIGE!), Dr Dong Xia for his help and his precious advices, it's was a real pleasure to work with you, Thank you so much!

Je remercie Elie pour son aide dans l'analyse par Spectrométrie de masse. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite de ta carrière.

Je remercie l'équipe de Biopuces et Séquençage de l'IGBMC de Strasbourg en particulier Madame le Docteur Christelle Thibault-Carpentier pour son aide dans l'analyse des microarrays.

Je remercie tous les membres du CJSFEAP pour leurs précieux conseils.

Je remercie Julie (*ma Coco*) pour tout son soutien et son amitié. Malgré les 382 km qui séparent nos deux labos tu as toujours été là pour moi. Je te souhaite tout le bonheur du monde pour la suite de ta très grande carrière de chercheur (j'en suis sûre !!). *On est des winneuz ma poule !!*

Je remercie Anne-Pascaline et ses petites mains très utiles surtout en fin de thèse ! Ma mini-moi, tu es quelqu'un de pétillant et ta bonne humeur est communicative ! Merci pour ton aide, ta joie de vivre et tes cookies !! Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite pour la suite.

Un grand merci à Floriane et Hélène pour votre présence et votre amitié tout au long de cette thèse. Merci pour les nombreux fous rires, les discussions toujours scientifiques au café (*elle tourne à combien ta centri ?*). Je remercie Mélanie pour son soutien et pour son amitié. Je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur pour la suite.

Je remercie tous les membres du «very famous midi pizzas » : Alexandra, Sana, Ali, Stéphane, Mehdi, Aurélie, Christelle, Gilles, Florence, Karine, Carole pour tous les fous rires. Je remercie mes collègues thésardes: Cécile, Marie-Amélie et Jeanne et tous les stagiaires venus découvrir le monde de la recherche chez nous : Pierre, Marion, Amandine, Alexandre. Je remercie également tous les étudiants et jeunes docteurs rencontrés au cours de ces années de thèse : Albin, Annabelle (*vive les pâtés croûtes*), Joan, Julien, Jérôme et tous les autres. Soyez tous remerciés pour les bons moments partagés dans les murs de l'URCA. Un grand merci à tous mes amis : Anthony, Julie, Maryline, Gauthier, Seb.

Je remercie toutes les personnes du 3^{ème} étage pour leur gentillesse et leurs encouragements. Merci à Yves et Claire Tournois pour leurs encouragements, Chantal pour son sourire et sa gentillesse, l'équipe des Biomat pour leur bonne humeur, Valérie et Aymeric pour leur sympathie. Un grand merci également à Christine Terryn, Hamid, Nathalie, Stéphanie, Mme Pisani, Coco, Aurélie et Mme Cousinat. Je remercie Mr Yves Gourdin pour sa gentillesse et sa disponibilité, Jennifer, André et Benjamin pour leur bonne humeur quotidienne.

Enfin je remercie ma famille pour tous leurs encouragements et leur confiance qui m'ont permis d'en arriver jusque là aujourd'hui. Merci Maman, Sébastien & Laetitia, Agnès & Jérôme, Juliette pour votre soutien et votre amour. Merci également à Antonin, Louison et les jumeaux, Téa et Paul, pour tous les fous rires. *Kocham cie*. Merci à mes anges gardiens...

Mes derniers remerciements vont à Laurent (*et notre Saphir de Mykonos*) qui a toujours cru en moi et qui a toujours été d'un soutien sans faille. Ton amour et ta confiance ont été mon énergie durant toutes ces années, je ne te remercierai jamais assez pour tout cela, *Love you !*

A ma maman,

A mon frère et mes soeurs,

A Laurent,

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Liste des abbréviations

Liste des Publications et des Communications

INTRODUCTION.....	1
La toxoplasmose et <i>Toxoplasma gondii</i>	5
I. Les différentes formes cliniques de la maladie.....	5
1) La toxoplasmose acquise	5
2) La toxoplasmose de l'immunodéprimé	6
3) La toxoplasmose congénitale	6
II. <i>Toxoplasma gondii</i>	7
1) Découverte du parasite.....	7
2) Les stades parasitaires de <i>T. gondii</i>	8
a. Le tachyzoïte	8
b. Le bradyzoïte	10
c. Le sporozoïte.....	11
3) Le cycle parasitaire de <i>T. gondii</i>	12
a. Cycle sexué ou gamétogonie	12
b. Cycle asexué ou schizogonie	13
4) Biodiversité des souches de <i>T. gondii</i>	14
5) Structures moléculaires de <i>T. gondii</i>	16
a. Les protéines de surface (SAG).....	16
b. Les protéines des organelles sécrétoires	17
- Les protéines de micronèmes (MIC)	18
- Les protéines de rhoptries (ROP)	19
- Les protéines de granules denses (GRA).....	20
III. Diagnostic et traitements de la toxoplasmose.....	21

1) Le diagnostic.....	21
a. Le diagnostic parasitologique.....	21
b. Le diagnostic sérologique.....	22
2) Les traitements.....	23
a. Les inhibiteurs de la synthèse folique.....	23
b. Les macrolides.....	25
c. Autres médicaments.....	25
3) Les principaux schémas thérapeutiques.....	26
4) Les échecs thérapeutiques.....	26

Les mécanismes de résistance chez les protozoaires..... 28

I. La résistance médicamenteuse chez <i>Plasmodium spp.</i>	28
II. La résistance médicamenteuse chez <i>Leishmania spp.</i>	31
III. La résistance médicamenteuse chez <i>Trypanosoma spp.</i>	33
IV. La résistance médicamenteuse chez <i>Entamoeba histolytica</i>	34
V. La résistance médicamenteuse chez <i>T. gondii</i>	35
1) Mécanismes de résistance à la clindamycine et l'atovaquone.....	35
2) Mécanismes de résistance aux antifolates.....	36
a. La voie de synthèse des folates.....	36
b. La résistance aux inhibiteurs de la synthèse des folates.....	39

La protéomique et la transcriptomique..... 42

I. La protéomique : l'ère post-génomique.....	42
1) Définition.....	42
2) La protéomique descriptive.....	44
3) La protéomique différentielle.....	45
4) Les modifications post-traductionnelles.....	47
5) Protéomique et Spectrométrie de masse.....	47
II. Protéomique et résistance chez les protozoaires.....	47
1) Protéomique et résistance chez <i>Leishmania spp.</i>	48
2) Protéomique et résistance chez <i>Plasmodium falciparum</i>	50
3) Protéomique et résistance chez <i>Trypanosoma spp.</i>	51
III. Protéomique chez <i>T. gondii</i>	51
IV. La transcriptomique.....	53

MATERIEL ET METHODES 58

Partie I. Cultures cellulaires 59

I.	Origine et caractéristiques des souches de <i>T. gondii</i> utilisées	59
1)	Souches sensibles à la sulfadiazine.....	59
2)	Souches résistantes à la sulfadiazine	60
II.	Culture cellulaire et parasitaire	61
1)	Culture cellulaire.....	61
a.	Lignée cellulaire Vero	61
b.	Entretien des cellules Vero	61
2)	Multiplication des parasites sur cellules Vero	62
3)	Congélation et décongélation.....	63
III.	Effets <i>in vitro</i> de la sulfadiazine et du probénécide sur <i>T. gondii</i>	64
1)	Effecteurs pharmacologiques.....	64
a.	La sulfadiazine (C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ; MM : 250,3)	64
b.	Le probénécide (C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S ; MM : 285,3)	65
2)	Etude de la sensibilité des souches de <i>T. gondii</i> à la sulfadiazine en présence ou non de probénécide	66
a.	Préparation des cellules	66
b.	Préparation des tachyzoïtes et infestation.....	66
c.	Ajout de la sulfadiazine et du probénécide.....	66
IV.	Dosage immuno-enzymatique (ELISA)	67
1)	Principe	67
2)	Mode opératoire	67
3)	Analyse des données de la CI ₅₀	68
V.	Coloration des cellules infestées.....	69
VI.	Développement de lignées de <i>T. gondii</i> résistantes à la sulfadiazine	70

Partie II. Biochimie..... 71

I.	Extraction des protéines totales	71
II.	Dosage des protéines	71
1)	Principe	71
2)	Protocole opératoire	71
III.	Western blot.....	72
1)	Principe	72

2) Mode opératoire	72
--------------------------	----

Partie III. Biologie Moléculaire 74

I. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR en temps réel (RT-PCRq)	74
1) Extraction des ARN totaux	74
2) Analyses quantitative et qualitative des ARN	75
3) Reverse transcription	75
a. Principe	75
b. Mode opératoire	75
4) PCR en temps réel.....	76
a. Principe	76
b. Choix des amorces	76
c. Mode opératoire	78
d. Analyse des résultats.....	78
e. Analyses statistiques	80
II. Analyse transcriptomique	80
1) Principe	81
2) Puces affymétries	81
3) Protocole opératoire	81

Partie IV. Protéomique..... 84

I. Préparation des échantillons	84
1) Obtention des parasites	84
2) Extractions des protéines	84
a. Principe	84
b. Mode opératoire	84
3) Précipitation des protéines	85
a. Principe	85
b. Mode opératoire	85
II. Electrophorèse bidimensionnelle	86
1) Principe	86
2) Réhydratation.....	87
3) Première dimension IEF	87
4) Etape d'équilibration : Réduction et Alkylation	88
a. Principe	88

b.	Mode opératoire	88
5)	Deuxième dimension : SDS-PAGE	88
6)	Coloration des gels au nitrate d'argent	89
III.	Electrophorèse bidimensionnelle différentielle	89
1)	Principe	89
2)	Plan de l'étude	90
3)	Marquage minimum.....	90
a.	Principe	90
b.	Reconstitution des CyDye	91
c.	Marquage minimum des échantillons protéiques	91
4)	Réhydratation passive	91
5)	1 ^{ère} dimension IEF.....	92
6)	Equilibration	92
7)	Seconde dimension	92
a.	Préparation des gels	92
b.	Mode opératoire	93
8)	Coloration au Sypro Ruby	93
IV.	Numérisation et analyse des gels.....	94
1)	Gels de 2-DE.....	94
2)	Gels de 2D-DIGE.....	94
V.	Digestion enzymatique	95
1)	Gels de 2-DE.....	95
2)	Gels de 2D-DIGE.....	95
VI.	Spectrométrie de masse	96
1)	Principe	96
2)	LC-MS/MS	97
3)	NanoLC-MS/MS.....	98

RESULTATS ET DISCUSSION..... 100

Partie I. Implication de la surexpression et/ou des polymorphismes des gènes cibles et des ABC transporteurs dans la résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii* 101

Partie II. Identification par DIGE de protéines différentiellement exprimées entre souches sensibles et résistantes à la sulfadiazine chez *T. gondii* 122

I.	Etude de la chimiosensibilité de la souche TgH 32045	198
II.	Etude de la sensibilité des souches de <i>T. gondii</i> à la SDZ en présence de probénécide	199
Partie IV. Analyse protéomique comparative des souches ME-49, ME-49-R^{SDZ} et TgH 32006		
.....		204
I.	Cartographie protéique	204
II.	Etude comparative des protéomes de la souche sensible et des deux souches résistantes à la sulfadiazine	209
III.	Analyse du niveau d'expression génique par RT-PCR en temps réel.....	216
IV.	Discussion sur la protéomique.....	219
Summary of Part IV. Comparative proteomic analysis of ME-49, ME-49-R^{SDZ} and TgH 32006 strains.		
.....		222
Partie V. Analyse transcriptomique comparative des souches ME-49 et ME-49-R^{SDZ}	 226
I.	Analyse transcriptomique des souches ME-49 et ME-49-R ^{SDZ}	226
II.	Analyse du niveau d'expression du gène <i>fpgs</i> par RT-PCR en temps réel sur l'ensemble des souches.....	229
III.	Discussion	232
1)	Généralités sur la Folylpolyglutamate synthase (FPGS).....	232
2)	La FPGS chez <i>T. gondii</i>	233
3)	Rôle putatif de la FPGS dans la résistance	237
4)	Rôle putatif de la FPGS dans la résistance chez <i>T. gondii</i>	237
Summary of Part V. Comparative transcriptomic analysis of ME-49 and ME-49-R^{SDZ} strains		
.....		240
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		245
BIBLIOGRAPHIE.....		249
ANNEXES		277

Liste des tableaux

Tableau I. Tableau récapitulatif des 17 souches utilisées par Meneceur et al.	41
Tableau II. Rapports tachyzoïtes / cellules utilisés pour la culture cellulaire	63
Tableau III. Anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot.....	73
Tableau IV. Couples d'amorces utilisés en RT-PCR en temps réel.....	77
Tableau V. Programme d'IEF	87
Tableau VI. Programme de migration de la seconde dimension.....	89
Tableau VII. Méthode de marquage minimum	90
Tableau VIII. Programme d'IEF	92
Tableau IX. Programme de migration de la seconde dimension pour la 2D-DIGE.....	93
Tableau X. Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés	95
Tableau XI. Données fixées pour Mascot MS/MS Ion Search	98
Tableau XII. Données fixées pour Mascot MS/MS Ion Search et OMSSA	99
Tableau XIII. Protéines différenciellement exprimées entre les souches ME-49, ME-49-R ^{SDZ} et TgH 32006 de <i>T. gondii</i>	212
Tableau XIV. Comparaison des résultats obtenus en 2-DE et en DIGE.....	215
Tableau XV. Gènes présentant des variations d'expression entre ME-49 et ME-49-R ^{SDZ} par microarrays.	227

Liste des figures

Figure 1. Ultrastructure d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i>	9
Figure 2. Endodyogénie chez <i>T. gondii</i>	10
Figure 3. Oocyste et sporozoïtes de <i>T. gondii</i>	11
Figure 4. Cycle biologique de <i>T. gondii</i>	12
Figure 5. Reconstitution 3D d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i> extracellulaire	18
Figure 6. Schéma simplifié de la voie de synthèse des folates chez <i>T. gondii</i>	24
Figure 7. Organisation structurale et fonctionnalité de PfCRT	30
Figure 8. Mécanismes de résistance à l'antimoine chez <i>Leishmania</i>	32
Figure 9. Structure chimique de l'acide folique	36
Figure 10. Principales enzymes et substrats de la voie de synthèse des folates.	38
Figure 11. De la génomique à la protéomique	43
Figure 12. Représentation schématique de l'approche protéomique descriptive	44
Figure 13. Représentation schématique de la technique DIGE	46
Figure 14. Proposition d'un modèle de mécanisme de résistance à la paromomycine chez <i>L. donovani</i>	49
Figure 15. Comparaison entre les techniques de Northern Blot (A) et puces à ADN (B).....	55
Figure 16. Observation en Microscopie électronique à balayage de cellules Vero infestées par des tachyzoïtes de <i>T. gondii</i>	62
Figure 17. Formule semi-développée de la sulfadiazine	65
Figure 18. Formule semi-développée du probénécide.....	65
Figure 19. Principe du test ELISA GII9-HRP	67
Figure 20. Obtention du logarithme de la CI ₅₀ à partir des DO et des droites de régression linéaire	69
Figure 21. Observation microscopique de cellules Vero infestées par <i>T. gondii</i>	69
Figure 22. Développement de souches résistantes à la sulfadiazine.....	70
Figure 23. Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.	79
Figure 24. Courbe de fusion des amplicons.....	80
Figure 25. Protocole opératoire de la technique de microarrays	82
Figure 26. Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle	86
Figure 27. Structure d'un spectromètre de masse	97

Figure 28. Expression relative du gène <i>TgABC.C2</i> sur les deux souches sensibles RH (type I) et ME-49 (type II), et les trois souches résistantes TgA 103001 (type I), TgH 32006 (type II) et TgH 32045 (type II variant) normalisée par rapport au gène de la β -tubuline chez <i>T. gondii</i> .	119
Figure 29. Effet <i>in vitro</i> de la sulfadiazine sur la croissance de la souche de <i>T. gondii</i> de Type II variant TgA 32045.	198
Figure 30. Effet <i>in vitro</i> de la sulfadiazine et du probénécide sur la croissance des souches sensibles (A), résistantes induites (B) et résistantes naturelles (C) de <i>T. gondii</i> .	200
Figure 31. Cartographies protéomiques comparatives de trois souches de <i>T. gondii</i> : ME-49 (A), ME-49-R ^{SDZ} (B) et TgH 32006 (C).	208
Figure 32. Expression relative des gènes <i>gra7</i> , <i>gra5</i> , <i>rop1</i> , <i>hsp60</i> , <i>cyclosporine 18</i> , <i>peroxiredoxine</i> et <i>NTPase I</i> sur la souche sensible ME-49 et sur les souches résistantes ME-49-R ^{SDZ} et TgH 32006, normalisée par rapport au gène de la β -tubuline chez <i>T. gondii</i> .	217
Figure 33. Photographie de la puce Tgondiiia520372	226
Figure 34. Expression relative du gène <i>fpgs</i> sur les souches de génotype II : ME-49 (sensible), ME-49-R ^{SDZ} (résistante induite), TgH 32006 et TgH 32045 (résistantes naturelles), normalisée par rapport au gène de la β -tubuline chez <i>T. gondii</i> .	230
Figure 35. Expression relative du gène <i>fpgs</i> sur les souches de génotype I : RH (sensible), RH-R ^{SDZ} (résistante induite) et TgA 103001 (résistante naturelle), normalisée par rapport au gène de la β -tubuline chez <i>T. gondii</i> .	231
Figure 36. Structure du folylpolyglutamate	233
Figure 37. Métabolisme des folates chez <i>T. gondii</i>	235
Figure 38. Alignements multiples de la protéine DHFS-FPGS de <i>T. gondii</i> .	236

Liste des annexes

Annexe 1. Composition des tampons pour le test ELISA GII9-HRP	278
Annexe 2. Composition du tampon de lyse RIPA	279
Annexe 3. Composition du tampon échantillon 4X	279
Annexe 4. Composition des solutions de gel SDS-PAGE	280
Annexe 5. Composition des tampons utilisés pour l'électrotransfert.....	280
Annexe 6. Composition des tampons utilisés pour l'immunomarquage	280
Annexe 7. Composition du tampon de lyse des échantillons.....	281
Annexe 8. Composition du tampon échantillon	281
Annexe 9. Composition du tampon de réhydratation pour la 2-DE.....	281
Annexe 10. Composition du tampon d'équilibration.....	281
Annexe 11. Composition de la solution de gel SDS-PAGE	282
Annexe 12. Composition du tampon de réhydratation pour la 2D-DIGE.....	282
Annexe 13. Composition de la solution de Bind Silane.....	282
Annexe 14. Composition de la solution de gel SDS-PAGE	282
Annexe 15. Composition du tampon de migration 10X.....	283

Liste des abbréviations

2-DE	Two-Dimensional gel Electrophoresis
ABC	ATP Binding Cassette
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
AMA1	Apical Membrane Antigen 1
AmB	Amphotéricine B
APS	Ammonium persulfate
AQP1	Aquaglycéroporine-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	ARN complémentaire
ARNm	ARN messenger
AT1	Adénosine Transporter 1
ATP	Adénosine Tri-phosphate
BAG	Bradyzoite antigen
BSA	Bovine Serum Albumin
BVA	Biological Variation Analysis
BZ	Benznidazole
CI50	Concentration inhibitrice à 50%
CIC	Calcifications Intracrâniennes
CQR	Chloroquino-Résistant
CQS	Chloroquino-Sensible
CRB	Centre de Ressources Biologiques
crt	Chloroquine resistant transporter
ct	Cycle threshold
Cy	Cyanine
dATP	désoxyriboadénosine Tri-phosphate
dCTP	désoxyribocytosine Tri-phosphate
dGTP	désoxyriboguanosine Tri-Phosphate
DHAP	Dihydroacetone phosphate
DHF	Dihydrofolate
DHFR	Dihydrofolate réductase

DHFS	Dihydrofolate synthase
DHNA	Dihydroneoptérin aldolase
DHPS	Dihydroptéroate synthase
DIA	Differential In-gel Analysis
DIGE	Difference In Gel Electrophoresis
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	désoxyriboNucléotides Tri-Phosphate
DO	Densité optique
DTT	1,4-Dithiothréitol
ECL	Electrochemiluminescence
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-acétique
eIF	Eukaryotic Initiation Factor
ELIFA	Enzyme-Linked Immunofiltration Assay
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMBL-EBI	The European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute
ENO	Enolase
ESI	Electrospray Ionization
ESP	Excreted-Secreted Proteins
EST	Expressed Sequence Tag
Fe-SOD	Fer-Superoxyde Dismutase
FPGS	FolylPolyGlutamate Synthase
GAP	GTPase-Activated Protein
GGH	Gamma Glutamyl Hydrolase
GPI	Glycosylphosphatidyl-Inositol
GRA	Protéines des Granules denses
GSH	Growth Stimulating Hormon
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
GTPC	GTP Cyclohydrolase
HGP	Human Genome Project
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
hsp	Heat shock protein
ICAT	Isotope-Coded Affinity Tag

ICPL	Isotope-Coded Protein Label
IEF	Isoélectrofocalisation
IFR	Institut Fédératif de Recherche
Ig	Immunoglobuline
IMC	Internal Membrane Complex
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iTRAQ	Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification
LC	Liquid Chromatography
LMT	<i>Leishmania</i> miltefosine transporter
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MDR	MultiDrug Resistance
MIC	Protéines des Micronèmes
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus-RT
MPTs	Modifications Post-Traductionnelles
MRP	MDR-associated Protein
MS	Mass Spectrometer
MTX	Méthotrexate
MudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology
NAC	Nascent polypeptide Associated Complex subunit
NK	Natural Killer
NTPase	Nucleoside triphosphatase
ODC	Ornithine décarboxylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMSSA	Open Mass Spectrometry Search Algorithm
OPD	o-Phenylenediamine Dihydrochloride
pABA	para-AminoBenzoic Acid
pb	Paires de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCD	Program Cell Death
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCRq	PCR quantitative
PFOR	Pyruvate Ferredoxine Oxydo-Réductase
Pgp	Polyglycoprotein
pI	Point Isoélectrique
PP2C	Protéine phosphatase 2C

PPPK	Hydroxymethyldihydropterin Pyrophosphokinase
PR	Paromomycine
PTR1	Ptéridine Reductase-1
PYR	Pyriméthamine
qsp	Quantité suffisante pour
RAPD-PCR	Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR
RFLP-PCR	Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR
ROP	Protéines de Ropthries
rpm	Rotation par minute
RT	Reverse Transcriptase
SAG	Surface Antigen
Sb ^{III}	Antimoine trivalent
Sb ^V	Antimoine pentavalent
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SDX	Sulfadoxine
SDZ	Sulfadiazine
SELDI	Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization
SHMT	Serine Hydromethyltransferase
SIDA	Syndrôme de l'Immunodéficience Acquise
SILAC	Stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture
SKCRP	Small Kinetoplastid Calpain-Related Protein
SRS	SAG-Related Sequence
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	TBS-Tween
TC	Toxoplasmose Congénitale
TCA	Tricarboxylic Acid
TD	Toxoplasmose Disséminée
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
TgPI	<i>Toxoplasma gondii</i> Protease Inhibitor
TG-SDS	Tris Glycine-SDS
THF	Tétrahydrofolate
Tm	Melting Temperature

TMT	Tandem Mass Tag
TOF	Time-Of-Flight
ToxoDB	<i>Toxoplasma</i> DataBase
Tris	[Tris(hydroxyméthyl)]aminométhane
TS	Thymidylate synthase
TSH	Thyroid Stimulating Hormon
Vér	Vérapamil
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
γ -GCS	Gamma-GlutamylCysteine Synthase

Liste des Publications et des Communications,

Publications scientifiques

- Publications de thèse

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Velard F., Schmid A., Geers R., Villena I.

Induction of sulfadiazine resistance in vitro in Toxoplasma gondii.

Accepté dans *Experimental Parasitology*, 2012.

Doliwa C., Xia D., Escotte-Binet S., Newsham E., Sanderson S., Aubert D., Randle N., Wastling J., Villena I.

Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant and sensitive strains of Toxoplasma gondii using difference-gel electrophoresis (DIGE).

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug resistance. En révision.

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Sauvage V., Velard F., Schmid A., Villena I.

Sulfadiazine resistance in Toxoplasma gondii: no involvement of overexpression nor polymorphisms in therapeutic targets and ABC transporters genes.

En préparation.

- Publications de Master

Poplineau M., **Doliwa C.**, Schnekenburger M., Antonicelli F., Diederich M., Trussardi-Regnier A., Dufer J.

Epigenetically-induced changes in nuclear textural patterns and gelatinase expression in human fibrosarcoma cells.

Accepté dans *Cell Proliferation*, 2012.

Communications orales

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Wastling J., Schaeffer-Reiss C., Villena I.

Résistance de souches induite et naturelle à la sulfadiazine chez T. gondii: analyse de protéomes.

Club Toxoplasme, Hôpital Cochin, Paris 5, France. 8 juin 2012.

Doliwa C., Dilezitoko Alayi T., Escotte-Binet S., Aubert D., Wastling J., Van Dorselaer A., Schaeffer-Reiss C., Villena I.

Etude du protéome chez Toxoplasma gondii : 2D-DIGE versus 2DE.

8èmes journées du Club Jeunes Société Française d'Electrophorèse et Analyse Protéomique, Arras, France. 6 Juin 2012.

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Wastling J., Schaeffer-Reiss C., Villena I.

Résistance à la sulfadiazine chez Toxoplasma gondii : approche protéomique.

Congrès de la société Française de parasitologie et de Mycologie Médicale, Rennes, France, 9 Mai 2012.

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Wastling J., Villena I.

Etude du Résistome de Toxoplasma gondii par protéomique.

7èmes journées du Club Jeunes Société Française d'Electrophorèse et Analyse Protéomique, Avignon, France. 18 au 20 mai 2011.

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Wastling J., Villena I.

Caractérisation des mécanismes de résistance à la sulfadiazine chez Toxoplasma gondii : approche protéomique et génomique.

Club Toxoplasme, Hôpital Cochin, Paris 5, France. 10 juin 2010. Réunion parrainée par la Société Française de Parasitologie.

Communications affichées

- Thèse

Doliwa C., Escotte-Binet S., Geers R., Aubert D., Villena I.

Resistance induction of Toxoplasma gondii strain by sulfadiazine pressure.

Congrès EMOP XI, Cluj-Napoca, Roumanie. 25 au 29 Juillet 2012.

Doliwa C., Xia D., Escotte-Binet S., Aubert D., Wastling J., Villena I.

« *Identification by DIGE de of proteins differentially regulated in sensitive and resistant strains of Toxoplasma gondii.* »

Scientific Meeting CRP Santé Luxembourg - SFR CAP Santé Reims, Reims, France, 28 Novembre 2011

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Wastling J., Villena I.

« *Recherche par 2D-DIGE de protéines impliquées dans la résistance à la sulfadiazine chez Toxoplasma gondii.* »

Congrès de la société Française de Parasitologie, Strasbourg, France, 18-20 Mai 2011

Escotte-Binet S., Aubert D., **Doliwa C.**, Garnotel R., Hornebeck W., Villena I.

« *Identification and expression of metallopeptidases family in Toxoplasma gondii.* »

IVth International Congress on Congenital Toxoplasmosis, Marseille, France. October 28th-30th 2010

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Wastling J., Villena I.

« *Characterization by proteomics and genomics of resistance mechanisms on Toxoplasma gondii.* »

International Symposium Cell-Microenvironment Interactions, Reims, France. June 7th-9th 2010

- Master

Poplineau M., **Doliwa C.**, Antonicelli F., Dufer J., Trussardi-Régnier A.

« *5-aza-2deoxycytidin and trichostatin A modulate proMMP-1 mRNA and protein expressions in HT-1080 human tumor cell line.* »

International Symposium Cell-Microenvironment Interactions, Reims, France. June 7th-9th 2010

Trussardi-Regnier A., **Doliwa C.**, Poplineau M., Ripamonti J., Dufer J.

« *Effets de la 5-azadéoxycytidine et de la Trichostatine A sur l'expression du gène MMP1 dans des cellules cancéreuses humaines.* »

Forum du Cancéropole du Grand-Est, Strasbourg, France. 19-20 Novembre 2009

Doliwa C., Trussardi-Regnier A., Dufer J.

«Effects of 5-azadeoxycytidine and trichostatin A on MMP1 gene expression in HT-1080 and SK-MEL28 human tumour cell lines. »

Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, Reims, France. 3-5 Juin 2009

Formations suivies

Septembre - Octobre 2011 : Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale de Niveau I (Université de Reims Champagne-Ardenne).

13-20 Septembre 2010 : Stage de Bio-informatique et Cytométrie en Flux appliqué aux protozoaires organisé par le réseau COST LoDOPP (Université de Madrid, Espagne).

Introduction

Contexte scientifique et présentation de l'étude

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire, responsable d'une infection cosmopolite très répandue, la toxoplasmose. Généralement bénigne chez les individus immunocompétents, cette infection peut être à l'origine de formes cliniques sévères en fonction de l'hôte infecté et des souches impliquées. La gravité de cette infection est liée : i) au risque de transmission fœtale du parasite en cas de contamination en cours de grossesse ; ii) au risque de toxoplasmose cérébrale ou généralisée chez les sujets immunodéprimés lors de réactivations d'une infection antérieurement acquise. *T. gondii* pénètre dans les cellules par un processus d'invasion actif qui s'accompagne de la formation d'une vacuole parasitophore à l'intérieur de laquelle le parasite se multiplie rapidement, puis induit l'éclatement des cellules hôtes pour envahir de nouvelles cellules. Les mécanismes de défense de *T. gondii* vis-à-vis des composés toxiques (drogues) ou des métabolites produits par la cellule hôte elle-même sont encore mal connus. Les thérapeutiques actuelles restent limitées et d'efficacité partielle, puisque sans action *in vivo* sur les formes kystiques.

Le traitement des infections toxoplasmiques utilise principalement l'association de la pyriméthamine et d'un sulfamide, qui agissent en synergie afin de bloquer la voie de synthèse des folates par inhibition respective de deux enzymes parasitaires : la Dihydrofolate réductase (DHFR) et la Dihydroptéroate synthase (DHPS), entraînant ainsi un arrêt de la réplication du parasite. Cependant, malgré une bonne observance du traitement, aucun des traitements actuellement proposés dans la toxoplasmose n'est à l'abri d'échecs thérapeutiques. En effet, des échecs thérapeutiques sont rapportés vis-à-vis de l'association de la pyriméthamine et de la sulfadiazine dans le traitement des formes graves de toxoplasmose survenant chez les patients immunodéprimés (Derouin, 2001). Plusieurs paramètres pharmacologiques peuvent contribuer à ces échecs: facteurs individuels d'absorption, intolérance à l'une ou l'autre des molécules ou mauvaise diffusion tissulaire. Cependant, compte tenu des cibles d'action des médicaments utilisés dans le traitement de la toxoplasmose, l'existence de facteurs de résistance ou de moindre susceptibilité en fonction de la souche parasitaire peut être suspectée.

Afin d'objectiver la résistance médicamenteuse potentielle chez *T. gondii* et devant le manque de données rapportées dans la littérature sur les variations de concentration inhibitrice de 50% (CI₅₀), les niveaux de sensibilité à différents médicaments antitoxoplasmiques (sulfadiazine, pyriméthamine et atovaquone) ont été étudiés sur diverses souches de *T. gondii* en collaboration avec l'équipe du Pr. Derouin (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3520, Université Paris VII). Des niveaux de CI₅₀ très élevés, supérieurs à 50 µg/ml, sont retrouvés pour la sulfadiazine chez trois souches : deux isolées de placentas lors de toxoplasmoses congénitales (RMS-2001-MAU et RMS-1995-ABE), et une d'un placenta de bovin (B1) (Meneceur et al., 2008). La moyenne des CI₅₀ des autres souches étant d'environ de 8,7 µg/mL, les différences de niveaux de sensibilité autorisent à parler de résistance *in vitro* pour ces trois souches. Cependant les mécanismes impliqués dans la résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii* ne sont toujours pas décrits à ce jour.

La résistance chez les protozoaires est un phénomène complexe et souvent multifactoriel que les approches cellulaires et moléculaires classiques ne permettent pas de mettre en évidence. Ainsi l'approche protéomique a été utilisée chez de nombreux protozoaires tels que *Leishmania spp*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma spp*, afin de répondre à cette problématique. Par ailleurs, de nombreuses études s'accordent à dire que l'émergence des puces à ADN a contribué à la compréhension des mécanismes de résistance médicamenteuse. Nous nous sommes intéressés à l'identification de protéines différenciellement exprimées par approche protéomique mais également à la mise en évidence des modulations d'expression des gènes par transcriptomique entre souches de *T. gondii* sensibles et résistantes à la sulfadiazine.

Le manuscrit est organisé en quatre chapitres :

Le premier chapitre est une introduction présentant : 1) la toxoplasmose et l'agent pathogène, *Toxoplasma gondii*, 2) les connaissances actuelles sur les mécanismes de résistance chez les protozoaires, 3) les techniques de protéomique et transcriptomique utilisées lors de cette étude.

Le deuxième chapitre présente un Matériel et Méthodes détaillé des différentes souches parasitaires et techniques employées au cours de l'étude.

Le troisième chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail.

Une première partie porte sur l'étude des gènes cibles, *dhps* et *dhfr*, et des gènes des ABC transporteurs dans la résistance médicamenteuse chez *Toxoplasma* dans l'article « Sulfadiazine resistance in *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression nor polymorphisms in therapeutic targets and ABC transporters genes » actuellement en préparation.

Une deuxième partie est consacrée à la comparaison par DIGE des protéomes des souches de *T. gondii* sensibles et naturellement résistantes à la sulfadiazine. Ces résultats font l'objet d'un article intitulé « Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant and sensitive strains of *Toxoplasma gondii* using difference-gel electrophoresis (DIGE) » qui est soumis au journal *International Journal for Parasitology : Drugs and Drug resistance*.

Une troisième partie traite du développement *in vitro* de souches de *T. gondii* résistantes à la sulfadiazine dans l'article « Induction of sulfadiazine resistance *in vitro* in *Toxoplasma gondii* » accepté dans le journal *Experimental Parasitology*.

Une quatrième partie s'intéresse à l'identification de protéines différenciellement exprimées entre souches sensible et résistantes (naturelle et induite) à la sulfadiazine par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE).

Enfin, une cinquième partie est consacrée à la comparaison des transcriptomes de souches sensible et résistante induite à la sulfadiazine chez *T. gondii* par l'utilisation de puces à ADN ; et à l'identification d'un candidat impliqué dans les mécanismes de résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii*.

Le quatrième chapitre présente une conclusion générale de l'ensemble de ces travaux. Des perspectives sont proposées en dernier lieu pour approfondir ces travaux de thèse.

La toxoplasmose et *Toxoplasma gondii*

La toxoplasmose est une anthrozoonose cosmopolite causé par le parasite *Toxoplasma gondii*. C'est l'une des infections parasitaires les plus répandues ; plus d'un tiers de la population mondiale aurait été exposé au parasite (Montoya et Liesenfeld, 2004) et en France, environ 45% de la population adulte est infectée (Berger et al., 2009). La séroprévalence est corrélée avec les habitudes alimentaires et l'hygiène de vie d'une population (Montoya et Liesenfeld, 2004).

Les principaux modes de contamination humaine sont dus à l'ingestion de kystes lors de consommation de viandes crues ou insuffisamment cuites (Tenter, 2009), ou d'oocystes sporulés présents dans les aliments souillés, et dans une moindre mesure à la transmission *in utero* et la transmission par greffes d'organes de tachyzoïtes. D'autres modes de contamination par les tachyzoïtes demeurent plus exceptionnels (transfusion, inoculation accidentelle au laboratoire).

I. Les différentes formes cliniques de la maladie

Trois formes cliniques principales sont distinguées : la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent, la toxoplasmose des immunodéprimés et la toxoplasmose congénitale.

1) La toxoplasmose acquise

La toxoplasmose acquise est, chez les sujets immunocompétents, le plus souvent asymptomatique (70 à 80% des cas) ou responsable d'un état clinique bénin, se manifestant par la triade classique : adénopathies (indolores), fièvre et asthénie prolongée ; ces formes ganglionnaires guérissent spontanément, le plus souvent sans traitement. Des atteintes viscérales sévères sont possibles mais exceptionnelles. Le diagnostic de la toxoplasmose acquise est basé sur la mise en évidence d'une séroconversion toxoplasmique.

La première phase de la maladie, dite phase aiguë, correspond à l'invasion des cellules hôtes par la forme infestante du parasite, à sa multiplication et à la production massive de tachyzoïtes. Le parasite est alors capable d'activer les cellules de l'immunité non spécifique, telles que les

macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK (*Natural Killer*). Lors de l'apparition des anticorps spécifiques, la parasitémie régresse. Après la mise en place de l'immunité, une deuxième phase, dite chronique, s'installe. Les tachyzoïtes transformés en bradyzoïtes, forme latente, sont enkystés dans les tissus pauvres en anticorps comme les muscles striés et cardiaques, le système nerveux central et l'œil; ces kystes vont persister chez l'individu immunocompétent tout au long de sa vie et participer au maintien d'une immunité protectrice.

2) La toxoplasmose de l'immunodéprimé

Résultant soit d'une primo-infection, soit d'une réactivation à partir des kystes présents chez un sujet antérieurement infecté, la toxoplasmose affecte les sujets présentant une immunosuppression sévère (SIDA, allogreffe de moelle osseuse, greffe d'organe, chimiothérapie).

La réactivation parasitaire correspond à une conversion des bradyzoïtes en tachyzoïtes consécutive à l'état d'immunodépression, suivie d'une multiplication et d'une dissémination des tachyzoïtes dans l'organisme du patient. L'atteinte cérébrale est la plus fréquente avec encéphalite mortelle si elle n'est pas rapidement traitée.

L'infection toxoplasmique est particulièrement grave chez les patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et dont l'immunodéficience est avancée. Selon les enquêtes, 12 à 47 % des personnes infectées par le virus du VIH et séropositives pour *T. gondii*, souffrent d'une réactivation parasitaire en l'absence d'un traitement prophylactique efficace (Kasper et Buzoni-Gatel, 1998). En France, le nombre de cas déclarés de toxoplasmose chez les patients atteints du VIH est d'environ 200 par an, après avoir sensiblement diminué entre 1992 (800 cas) et 1997 (250 cas) avec l'avènement des trithérapies (Afssa, 2005). Lors d'une greffe d'organe ou de moelle osseuse, le patient receveur, soumis au traitement immunosuppresseur mis en place pour éviter les épisodes de rejet ou à une irradiation réalisée avant greffe de moelle, peut développer une toxoplasmose lorsque le greffon est issu d'un donneur infecté (Hill et Dubey, 2002).

3) La toxoplasmose congénitale

L'un des aspects préoccupants de la toxoplasmose concerne la toxoplasmose congénitale. La toxoplasmose congénitale résulte du passage transplacentaire des parasites circulant dans le sang

maternel au cours d'une primo-infection chez la femme enceinte. L'immaturation du système immunitaire du fœtus l'empêche alors de réagir contre le parasite. La probabilité de transmission du parasite au fœtus et la gravité de l'atteinte fœtale évoluent inversement au cours de la grossesse (Desmonts et Couvreur, 1974; Montoya et Liesenfeld, 2004).

La manifestation la plus courante d'une infection précoce du fœtus par le toxoplasme, est une encéphalomyélite aux conséquences graves dont l'avortement ou une mortalité néonatale. Les enfants souffrent généralement de retards mentaux progressifs ou d'autres déficiences neurologiques (déficience psychomotrice, convulsions, retards mentaux). Si la transmission materno-fœtale du parasite intervient tardivement au cours de la grossesse, les effets sur le fœtus sont moins sévères. Cependant, ils risquent de développer dans l'enfance ou à l'adolescence des lésions oculaires (rétinchoroïdite pouvant être à l'origine de cécité).

La toxoplasmose congénitale représente 2 à 3 pour 1000 des séroconversions en France (Berger et al., 2009), soit environ 300 naissances par an (Villena et al., 2010). La prévention de la toxoplasmose congénitale a été instaurée en France dès 1978 et repose sur le contrôle du statut immunitaire vis-à-vis de la toxoplasmose pour toute femme enceinte avec, en cas de séronégativité, une surveillance sérologique mensuelle (décret de 1992). En cas de séroconversion maternelle, la datation de l'infection conduira à proposer un diagnostic anténatal permettant, en cas de positivité, de traiter l'enfant *in utero* (Villena et al., 1998a). Ces modalités de dépistage et de prise en charge précoce ont considérablement réduit la gravité des lésions sans pour autant réduire le nombre d'infections au cours de la grossesse.

II. *Toxoplasma gondii*

1) Découverte du parasite

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire responsable de la toxoplasmose. Il a été décrit en 1908 à l'Institut Pasteur de Tunis par deux médecins français, Charles Nicolle et Louis Herbert Manceaux, après qu'une épidémie eut touché des rongeurs de laboratoire (*Ctenodactylus gondii*) (Nicolle et Manceaux, 1909). Ils isolèrent un protozoaire de forme arquée qu'ils nommèrent *Toxoplasma gondii*, en référence à l'étymologie grecque *toxon* (arc) et *plasma* (forme) et au rongeur chez lequel il a été découvert. Le parasite a également été décrit en 1909 au Brésil chez le lapin

(Splendore, 1909). Les premières descriptions de cas de toxoplasmose humaine sont rapportées une vingtaine d'années plus tard: en 1923 Janku décrit une chorioretinite chez un enfant et, en 1939 Wolf décrit un cas d'encéphalite chez un enfant. La mise au point du premier test immunologique, le dye test, dans les années 1940, par Sabin et Feldman, a permis de révéler l'importance de la prévalence de la toxoplasmose humaine sans que le cycle parasitaire ne soit alors identifié. Dans les années 1960, le rôle de la consommation de viande insuffisamment cuite est rapporté (Desmonts et al., 1965). Puis, en 1969, le rôle des Félidés et notamment du chat dans l'élimination fécale des oocystes est identifié permettant d'expliquer ainsi la contamination des herbivores. Le cycle est finalement décrit dans sa totalité par Hutchinson et Frenkel (Hutchison, 1965; Frenkel et al., 1969, 1970).

T. gondii appartient au phylum des Apicomplexa et fait partie de l'ordre des Eucoccidiorida. Le genre *Toxoplasma* ne possède actuellement qu'une seule espèce *Toxoplasma gondii* au sein de laquelle sont individualisés de nombreuses souches regroupées en lignées clonales (Dardé et al., 1992; Su et al., 2012).

2) Les stades parasitaires de *T. gondii*

Le cycle de *T. gondii* présente au cours de son cycle trois stades infectieux : le tachyzoïte, le bradyzoïte et le sporozoïte. Chaque stade présente un rôle biologique distinct.

a. Le tachyzoïte

Le tachyzoïte (dérivé du grec *tachy* : à multiplication rapide) est la forme proliférative à multiplication intracellulaire obligatoire du parasite lors de la phase active de l'infection. C'est une cellule en forme d'arc de 6 à 10 μm de long et 2 à 5 μm de large. Son extrémité antérieure est effilée et son extrémité postérieure est plus large et plus arrondie. *T. gondii*, comme tous les Apicomplexa, possède dans sa partie antérieure un complexe apical comprenant un conoïde, participant à la mobilité du parasite et à sa pénétration dans les cellules, des rhoptries, des micronèmes, et des granules denses (Dubey et al., 1998). Une autre structure typique des *Apicomplexa* est l'apicoplaste, plastide, contenant une molécule d'ADN circulaire de 35 kb, dérivant d'un chloroplaste ancestral dont le rôle est encore mal défini mais qui pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante (McFadden, 2011). Le toxoplasme est aussi caractérisé par un complexe membranaire composé de

trois membranes superposées, d'un noyau, d'une unique mitochondrie, d'un réticulum endoplasmique et d'un appareil de Golgi (**Figure 1**).

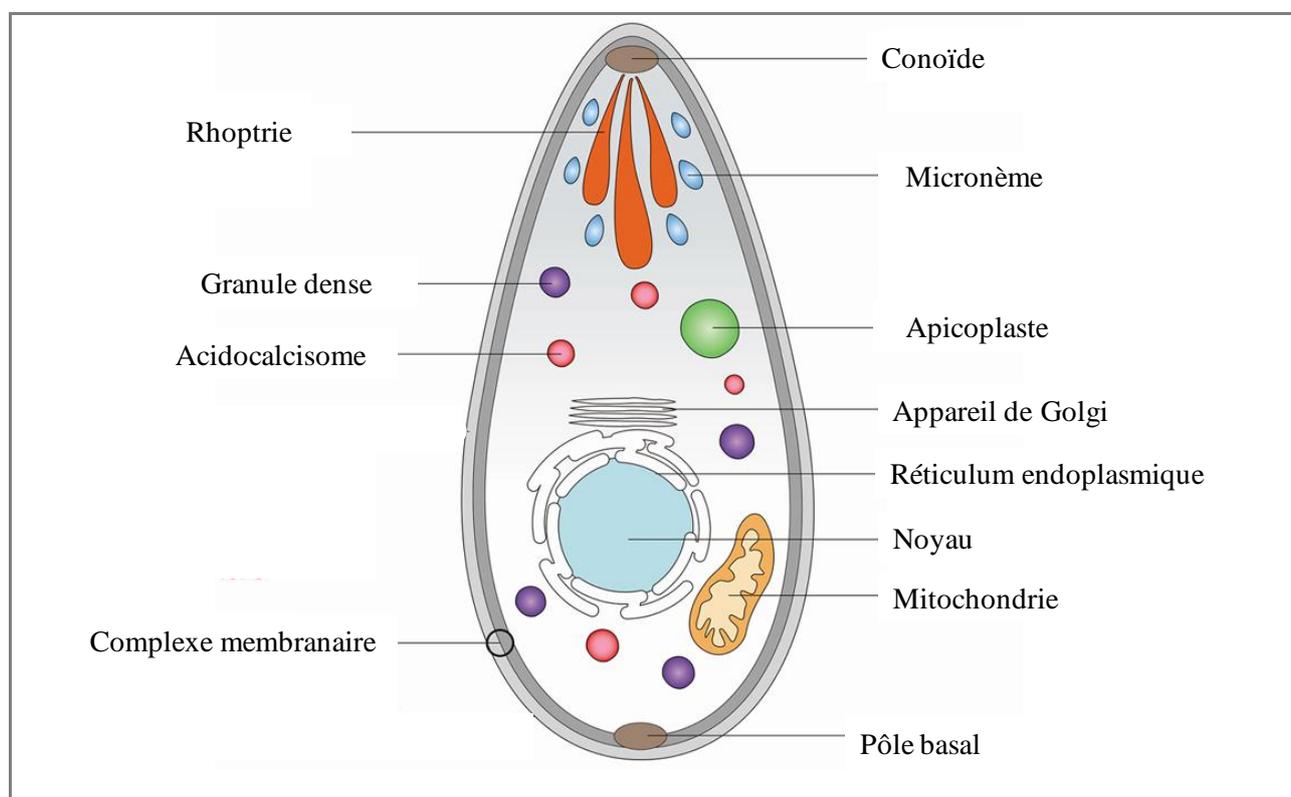


Figure 1. Ultrastructure d'un tachyzoïte de *T. gondii* (d'après Corvi et al., 2011)

Le tachyzoïte est capable d'envahir tout type cellulaire nucléé (Carruthers et Sibley, 1997). Après pénétration active et rapide (30 à 60 secondes) dans la cellule hôte, le parasite s'internalise dans la cellule hôte en s'entourant d'une vacuole parasitophore dans laquelle il se multiplie par endodyogénie (**Figure 2**). Il s'agit d'une multiplication intracellulaire asexuée au cours de laquelle deux cellules filles sont issues d'une seule et même cellule mère; le parasite se multiplie ensuite à l'intérieur de la membrane du parasite initial pour former des rosettes avant éclatement de la cellule. Ce phénomène conduit à la mort cellulaire et l'invasion rapide des cellules voisines. Le taux d'invasion varie suivant la souche de *T. gondii* et le type cellulaire (Kaufman et Maloney, 1962; Appleford et Smith, 1997). La forme tachyzoïte est fragile dans le milieu extérieur.

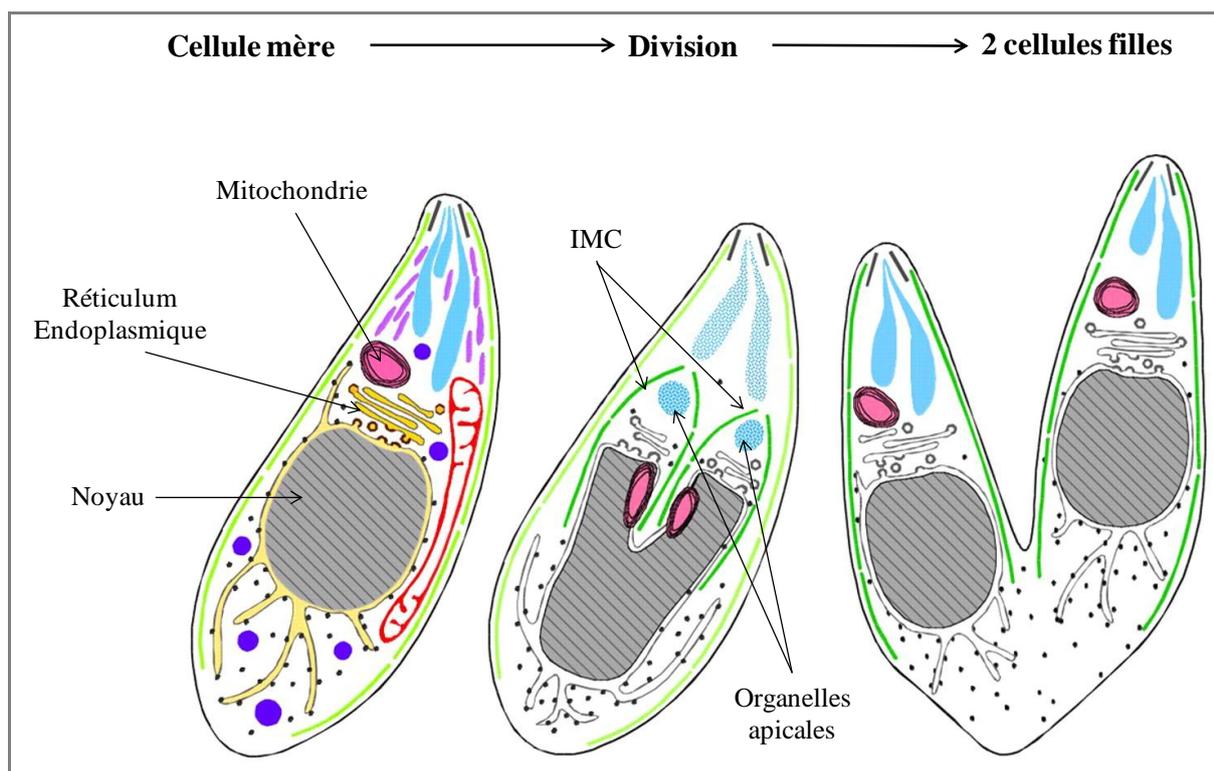


Figure 2. Endodyogénie chez *T. gondii* (d'après Nishi et al., 2008)

Quand le parasite commence à se diviser, apparaissent deux complexes membranaires internes (IMC). Le noyau, le réticulum endoplasmique et la mitochondrie se divisent et les organelles apicales des deux cellules filles se forment. Le cytoplasme entier est divisé entre les deux cellules filles et le complexe membranaire interne de la cellule mère se lyse. Enfin, un clivage divise les deux cellules filles à partir du pôle antérieur. Cette division se déroule sur toute la longueur de la cellule jusqu'au pôle postérieur.

Lors de l'instauration de l'immunité spécifique chez l'Homme, il y a interconversion de la forme tachyzoïte vers la forme bradyzoïte (dérivé du grec *brady* : à multiplication lente) ou forme végétative conduisant à la formation de kystes contenant les bradyzoïtes (Bhopale, 2003).

b. Le bradyzoïte

Le bradyzoïte est une forme de latence et de résistance intracellulaire lors de l'évolution de l'infection dans l'organisme. Sa morphologie est très superposable à la forme tachyzoïte avec une plus grande richesse en grains d'amylopectine et en micronèmes. Cette transformation s'accompagne d'un épaissement de la membrane et de la matrice de la vacuole parasitophore; ce processus aboutissant à la formation du kyste toxoplasmique intracellulaire. Les kystes (10 à 200

μm) sont des formes de résistance et de dissémination, qui peuvent contenir jusqu'à un millier de bradyzoïtes dont le métabolisme est adapté à une vie quiescente (Tomavo, 2001). La transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes et de la vacuole parasitophore en kyste intervient très rapidement après l'infection (dès 48 heures en culture cellulaire; dès le 6^{ème} jour après l'infection dans la toxoplasmose expérimentale de la souris). Les kystes peuvent se former dans n'importe quel type cellulaire mais persistent préférentiellement dans le système nerveux central et dans les muscles mais aussi au niveau d'autres viscères et de l'œil. L'éclatement des kystes est à l'origine de l'entretien de l'immunité protectrice.

c. Le sporozoïte

Huit sporozoïtes sont présents dans un oocyste sporulé. Ces derniers sont formés lors de la reproduction sexuée chez l'hôte définitif (Félidés). Durant la phase aiguë de l'infection, des milliers d'oocystes non sporulés (10 à 12 μm de diamètre) sont émis dans les fèces du chat et contiennent une masse unique, le sporoblaste. Après sporulation dans le milieu extérieur, il se forme deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes (**Figure 3**). Les sporozoïtes sont peu différents en microscopie optique et électronique des autres stades infectants (Speer et Dubey, 1998).

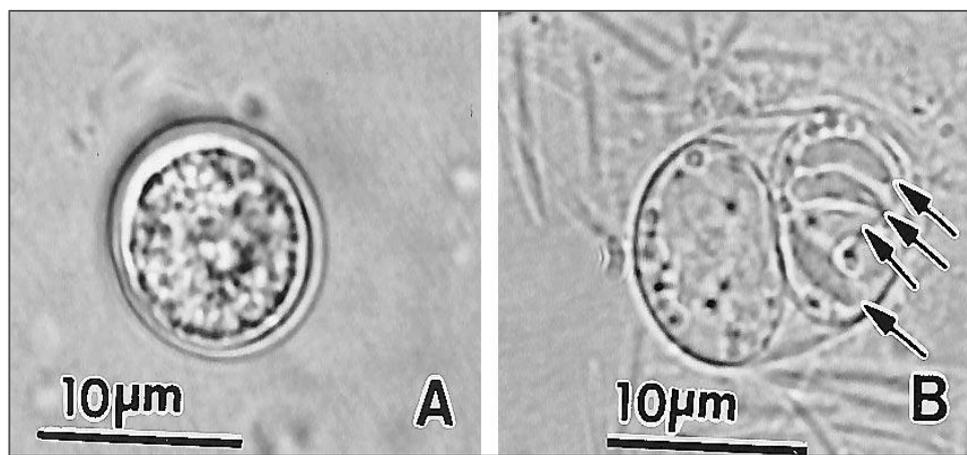


Figure 3. Oocyste et sporozoïtes de *T. gondii* (Dubey et al., 1998)

(A) Oocyste non sporulé. (B) Oocyste sporulé contenant deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes (flèches).

3) Le cycle parasitaire de *T. gondii*

Le cycle de *T. gondii* est caractérisé par deux phases : une phase de reproduction sexuée se déroulant exclusivement chez l'hôte définitif (le chat et d'autres félinés) et une phase asexuée, chez les hôtes intermédiaires (tous les animaux à sang chaud) (**Figure 4**).

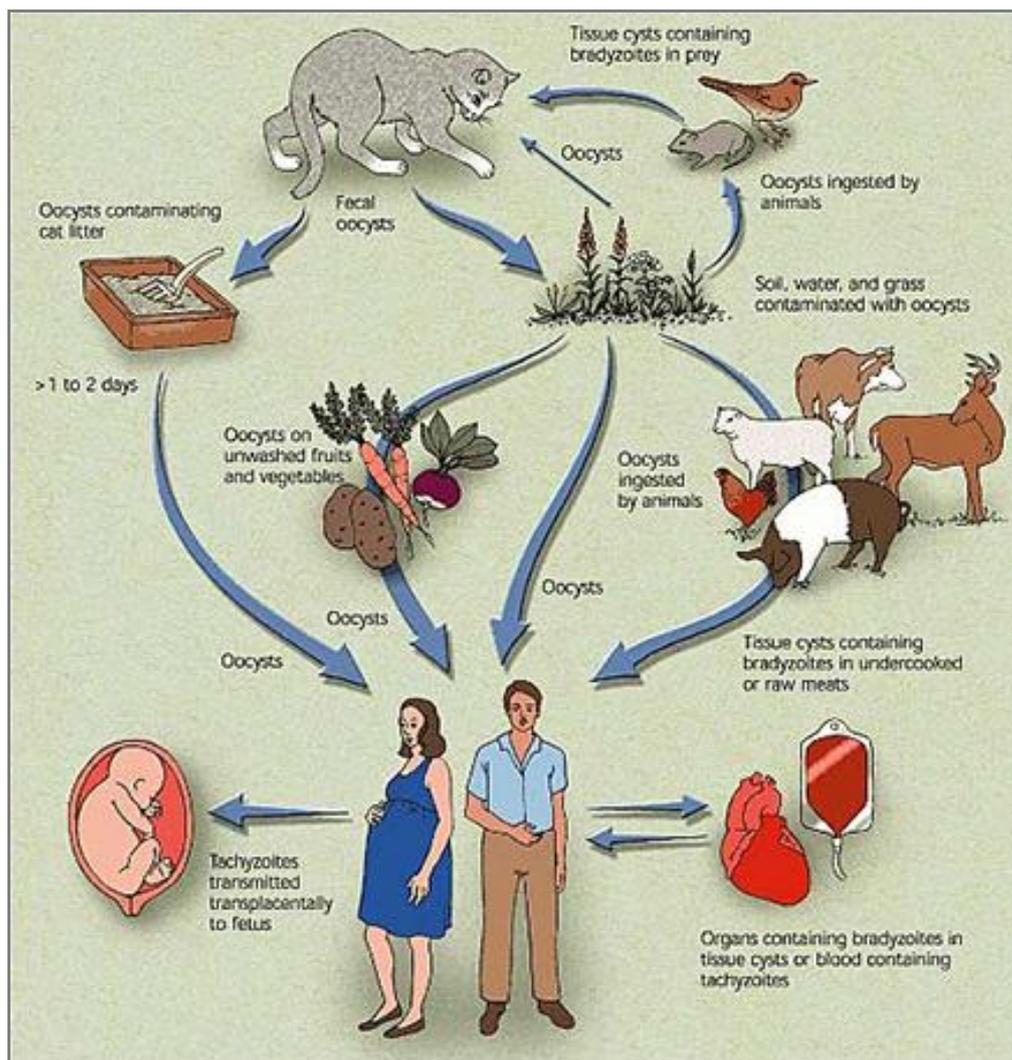


Figure 4. Cycle biologique de *T. gondii* (d'après Lynfield et Guerina, 1997)

a. Cycle sexué ou gamétogonie

Il se déroule uniquement dans le système digestif de l'hôte définitif lorsqu'il s'infeste en ingérant des kystes contenus dans les tissus de ses proies (généralement petits mammifères tels que

des rongeurs ou oiseaux). Les parasites latents contenus dans les kystes sont libérés et pénètrent dans les cellules de l'épithélium intestinal où ils se multiplient de façon active par divisions cellulaires (endodyogénie) avant de se différencier en gamétocytes mâles et femelles. La fécondation des formes sexuées aboutit à la formation d'oocystes non sporulés (non infectieux) excrétés par millions dans les fèces des félidés trois à cinq jours après l'infection (en cas d'ingestion de kystes) et durant sept à quinze jours. Dans le milieu extérieur, les oocystes deviennent infectieux en un à cinq jours (selon les conditions de température et d'hygrométrie) par un processus de maturation appelée sporogonie qui permet la formation des sporozoïtes. Les oocystes sporulés peuvent alors rester quiescents pendant plus d'une année dans le sol avant d'infester un nouvel hôte intermédiaire ou un félidé. L'habitude des chats d'enterrer leurs fèces contribue à assurer une bonne viabilité aux oocystes, en limitant l'effet délétère de la sécheresse et de la chaleur. L'excrétion des oocystes se fait pendant une durée limitée après infection des félidés, puis les ré-excrétions d'oocystes sont rares (Dubey, 1995).

b. Cycle asexué ou schizogonie

Il s'effectue tant chez l'hôte définitif que chez les hôtes intermédiaires (tous les mammifères dont l'Homme, et les oiseaux). Pour les carnivores et les omnivores, la contamination est liée habituellement à l'ingestion de kystes (contenant des centaines de bradyzoïtes) présents dans les tissus d'autres hôtes intermédiaires. Après rupture des kystes et une phase de multiplication active sous forme de tachyzoïtes qui se disséminent rapidement dans tout l'organisme, les parasites s'enkystent préférentiellement dans les tissus à faible immunité (muscles striés et système nerveux central) mais aussi au niveau d'autres viscères et de l'oeil.

Pour les herbivores et les omnivores, la contamination peut également être due à l'ingestion d'oocystes sporulés dont la paroi se rompt dans l'intestin. Les sporozoïtes libérés pénètrent alors dans les cellules épithéliales et se transforment en tachyzoïtes. Après une parasitémie brève de quelques jours, les parasites s'enkystent dans les tissus de l'hôte où ils demeurent quiescents durant toute sa vie.

Une transmission directe par des tachyzoïtes peut avoir lieu par passage transplacentaire lors d'une phase de parasitémie maternelle durant la gestation ou lors de contamination accidentelle plus exceptionnelle (transfusion, accident de laboratoire).

4) Biodiversité des souches de *T. gondii*

Le genre *Toxoplasma gondii* est constitué d'une seule espèce avec des différences intraspécifiques significatives. La classification actuelle des souches, basée sur la virulence chez la souris et la variabilité de marqueurs génétiques spécifiques, est en pleine évolution.

Les premières études sur les souches de *T. gondii* ont montré que les isolats avaient des comportements remarquablement similaires (Ferguson et Hutchison, 1981). Depuis, la biodiversité des isolats a été explorée par des techniques phénotypiques et génotypiques.

Sibley et Boothroyd ont proposé un classement des différentes souches de *T. gondii* en trois groupes ou types selon leur comportement chez la souris (après inoculation intrapéritonéale de tachyzoïtes à des souris Swiss) mais aucune corrélation stricte entre la virulence chez la souris et la pathogénicité chez l'Homme n'est établie (Sibley et Boothroyd, 1992). D'abord basées sur une caractérisation phénotypique par des techniques isoenzymatiques (Dardé et al., 1988; Dardé et al., 1992), ces méthodes ont évolué vers une caractérisation génotypique grâce au développement de la biologie moléculaire (Dardé, 2008).

Des techniques de RAPD-PCR (Guo et Johnson, 1995) et de RFLP-PCR ont ainsi été largement utilisées (Sibley et Boothroyd, 1992; Howe et Sibley, 1995). Plus récemment sont apparues des méthodes analysant le polymorphisme de nombreux gènes codant pour divers antigènes du toxoplasme (Ajzenberg et al., 2005; Nowakowska et al., 2006). Toutes les études multiloci s'accordent pour regrouper la majorité des isolats, isolés en Europe ou aux Etats- Unis, en trois génotypes principaux (I, II, et III) qui seraient équivalents à des lignées clonales (Howe et Sibley, 1995 ; Dardé, 1996) trouvées chez des hôtes variés dont l'Homme. Récemment ont été décrits des isolats atypiques dus à des recombinaisons génétiques occasionnelles entre les trois lignées principales (Grigg et al., 2001a; Ajzenberg et al., 2002) ou à la présence d'allèles nouveaux (Grigg, et al., 2001b ; Carme et al., 2002). Ces isolats sont rapportés dans des régions particulières, notamment la (Guyane et l'Amérique du Sud) et témoigneraient de la présence de réservoirs sauvages (Carme et al., 2002). Une quatrième lignée clonale a récemment été décrite en Amérique du Nord (Khan et al., 2011). Dernièrement, des méthodes de classification ont été utilisées afin d'organiser la diversité génétique de 138 génotypes uniques en 15 haplogroupes définissant six clades majeurs (Su et al., 2012).

Les trois génotypes principaux montrent une virulence variable sur la souris :

Type I : souche virulente (non kystogène) qui entraîne une toxoplasmose aiguë et la mort des souris en moins de dix jours quel que soit le fond génétique de l'hôte (Howe et al., 1996). Ces souches sont associées à une mortalité de 100% à partir d'un tachyzoïte inoculé (dose létale 100 = 1). Les isolats ont une capacité de réplication très rapide. C'est le cas de la souche RH, isolée en 1939 et utilisée comme souche de référence dans les laboratoires.

Type II : souche chronique (kystogène) qui provoque une toxoplasmose asymptomatique. Les souris survivent avec la persistance de kystes cérébraux. Ces souches sont caractérisées par une plus faible vitesse de réplication en culture cellulaire (Radke et al., 2001), même s'il n'existe pas de différence significative sur le temps de doublement pour les différents types de souches (Sibley et al., 2002). La dose létale 50% est à $\geq 10^3$ organismes.

Type III : ce sont des souches de pathogénicité intermédiaire pouvant provoquer une toxoplasmose subaiguë avec des manifestations d'ordre neurologique (encéphalite). Certaines souris meurent prématurément au bout de quinze jours tandis que d'autres meurent au bout de trois à six mois d'encéphalite. La dose létale 50% est à $\geq 10^3$ tachyzoïtes.

Chez la souris, les souches virulentes (type I) se multiplient davantage et se disséminent plus rapidement à tout l'organisme que les souches avirulentes (Hitziger et al., 2005). *In vitro* les souches virulentes ont également une plus grande capacité migratoire (Barragan et Sibley, 2002; Taylor et al., 2006). Des recombinaisons génétiques entre les souches de type I/III et II/III ont montré l'implication des protéines de Rhotries ROP18 et ROP16 dans la virulence (Saeij et al., 2006, 2007; Taylor et al., 2006). La protéine ROP18 est directement impliquée dans la multiplication du parasite. ROP18 est une sérine-thréonine kinase et appartient à la famille ROP2. Après l'invasion de l'hôte, elle est retrouvée dans la vacuole parasitophore. ROP18 est exprimée par les souches de type I et II mais très faiblement exprimée par les souches de type III en raison de la présence, dans le promoteur de ces souches, d'une séquence de 2,1kb proche du codon d'initiation de la traduction. La transfection de l'allèle ROP18 de type I dans une souche non pathogénique de type III entraîne une augmentation significative de la virulence et une augmentation de la croissance parasitaire (Taylor et al., 2006). La surexpression de ROP18 de type I dans une souche de type II

augmente également la multiplication intracellulaire (El Hajj et al., 2007). La protéine ROP16 est impliquée dans la subversion de la signalisation intracellulaire de l'hôte (Ong et al., 2010). Au cours de l'invasion cellulaire, ROP16 est localisé dans le noyau de la cellule hôte. ROP16 a une activité tyrosine kinase permettant la phosphorylation des facteurs de transcription STAT3 et STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), régulateur négatif de la réponse cellulaire Th1 (Yamamoto et al., 2009; Ong et al., 2010). L'expression de la protéine ROP16 de type I dans une souche de type II a permis de relier le polymorphisme de ROP16 ainsi que la phosphorylation de STAT3 et STAT6 à la production d'IL-12. Ainsi, l'expression d'une protéine ROP16 de type I dans les souches de type II a pour effet une diminution de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages infectés. *In vivo* les souches de type I, diminuent l'expression de l'IL-12 via ROP16 et se multiplient davantage via ROP18 ce qui conduit finalement à la mort de l'hôte (Butcher et al., 2011).

5) Structures moléculaires de *T. gondii*

T. gondii, comme d'autres organismes unicellulaires, est composé d'une multitude d'antigènes (membranaires ou cytoplasmiques) immunogènes ou faisant partie des composants structuraux. La composition de la surface du parasite est modulée de manière importante au cours de l'interconversion bradyzoïtes/tachyzoïtes. Les tachyzoïtes et les bradyzoïtes ont une structure similaire mais produisent un phénotype différent dans la cellule. Le tachyzoïte en se multipliant rapidement, est responsable de la dissémination et de complications cliniques lors de la primo-infection ou lors des réactivations, contrairement au bradyzoïte qui se multiplie lentement et ne cause pas de dommage tissulaire significatif. Les molécules exprimées à un stade spécifique semblent contrôler les différences phénotypiques entre tachyzoïtes et bradyzoïtes. On distingue les protéines de surface et les protéines contenues dans les organelles sécrétoires du parasite (micronèmes, rhoptries et granules denses) ; certaines de ces protéines peuvent être communes à plusieurs stades évolutifs.

a. Les protéines de surface (SAG)

La membrane plasmique du parasite est recouverte de nombreuses protéines. Ces protéines sont d'une grande variété et regroupent la Superfamille des SRS (SAG1-related sequence) (Jung et al., 2004). Les SRS sont des protéines de surface divisées en deux sous-familles dont les membres

prototypes sont SAG1 et SAG2A respectivement. Elles sont ancrées à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Manger et al., 1998). Plusieurs études ont montré le rôle des protéines SAG, notamment de SAG1, dans l'attachement initial du tachyzoïte à la cellule hôte. Le traitement des toxoplasmes avec des anticorps dirigés contre SAG1 inhibe l'attachement du parasite à la cellule hôte de 71% (Mineo et Kasper, 1994). Velge-Roussel et al. ont confirmé ces résultats en montrant que l'utilisation d'anticorps dirigé contre le peptide central V41T de SAG1 inhibait l'invasion de nombreuses lignées cellulaire par les tachyzoïtes (Velge-Roussel et al., 2001). De plus, il a été montré que des tachyzoïtes mutants déficients en SAG3 présenteraient une diminution d'invasion de deux fois par rapport aux parasites sauvages (Dzierszinski et al., 2000) et que SAG2 jouerait un rôle dans l'orientation du parasite sur la cellule hôte (Grimwood et Smith, 1996). SAG1 et SAG2A ne sont exprimées qu'au stade tachyzoïte (Kasper et Ware, 1985) alors que SAG3 est aussi exprimée au stade bradyzoïte (Tomavo et al., 1991).

b. Les protéines des organelles sécrétoires

Les micronèmes, les rhoptries et les granules denses sont trois organelles sécrétoires de *T. gondii* essentiels à l'invasion de la cellule hôte et à la formation de la vacuole parasitophore (**Figure 5**).

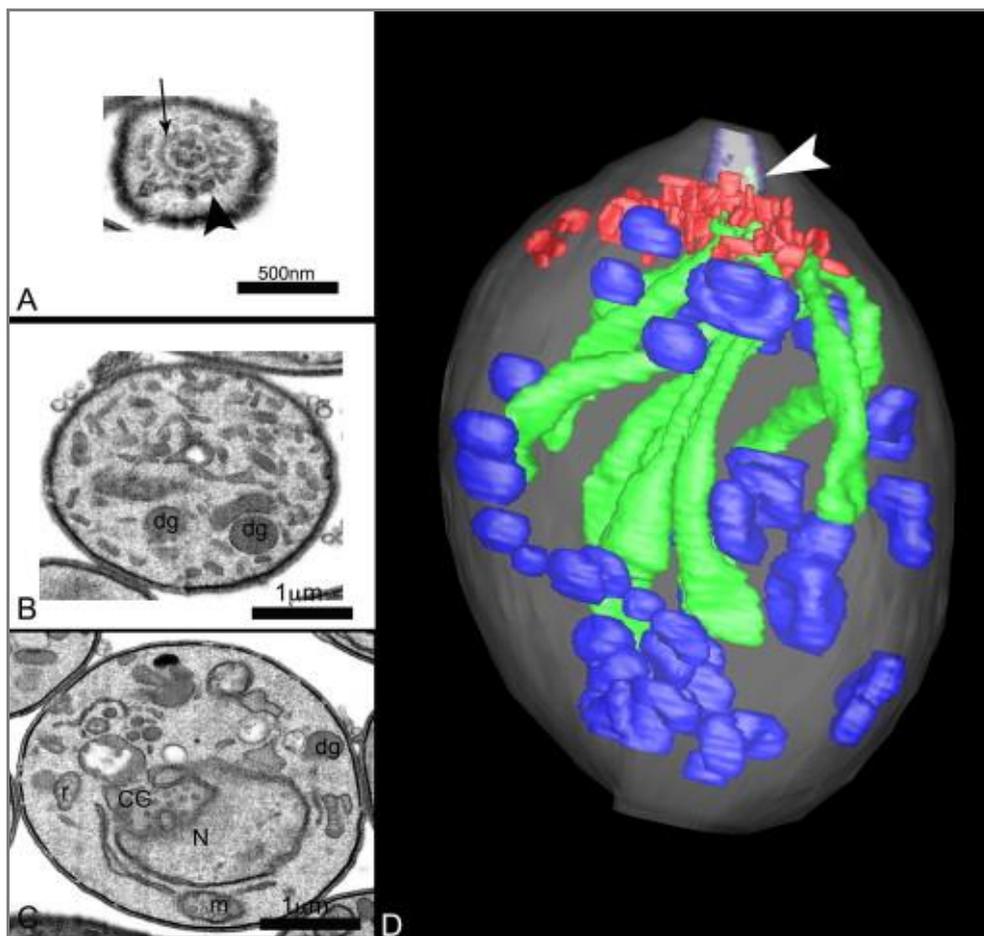


Figure 5. Reconstitution 3D d'un tachyzoïte de *T. gondii* extracellulaire (Paredes-Santos et al., 2012)

(A-D) Coupes transversales d'un parasite utilisées pour la reconstitution 3D à partir du cône apical (A), en passant par le milieu (B), jusqu'à la partie postérieure (C) du parasite par FIB-SEM dual beam. (A) Vue de face de l'anneau polaire (flèche) entouré de micronèmes (tête de flèche). (B) Des granules denses (dg) et des rhoptries (r) sont identifiés. (C) Au niveau supérieur du noyau (N), l'appareil de Golgi (CG), la mitochondrie (m) sont visibles. (D) Modèle 3D, à l'intérieur du parasite plusieurs granules denses (bleu) sont dispersés dans le cytoplasme, 10 rhoptries (vert) et de nombreux micronèmes (rouge) sont visible autour du conoïde (flèche).

- Les protéines de micronèmes (MIC)

Les micronèmes sont localisés au niveau apical du parasite. Ces petits organites allongés sont généralement orientés selon l'axe principal du parasite dans la région apicale et à la périphérie du parasite (Dubey et al., 1998). Ils jouent un rôle essentiel dans la survie et la propagation

parasitaire. Les protéines des micronèmes sont impliquées dans la motilité, l'invasion et la virulence (Cérède et al., 2005). Une vingtaine de protéines ont été identifiées à ce jour, la plupart d'entre elles étant des adhésines transmembranaires ou des protéines accessoires de ces adhésines. Elles sont libérées lors du contact initial du parasite avec la cellule hôte et participent à l'attachement du parasite à la membrane de la cellule hôte (Carruthers, 2002). La sécrétion des micronèmes est stimulée par la mobilisation du calcium intracellulaire parasitaire (Carruthers et Sibley, 1999). Dans certains cas, ces protéines ont été retrouvées fixées à des récepteurs de la cellule hôte (Garcia-Réguet et al., 2000; Brecht et al., 2001). Les micronèmes seraient impliquées dans la création de l'interface de liaison entre le parasite et la membrane plasmique. La réduction d'expression d'AMA1 (*Apical Membrane Antigen 1*), une protéine de micronème, empêche la formation de la jonction mobile ainsi que l'invasion. Les parasites sont capables d'adhérer à la cellule hôte mais ils échouent à former une association intime (Mital et al., 2005). De plus, AMA1 est associée à des protéines de rhoptries au niveau de la jonction mobile. Cette opération contribue à créer une interface entre le parasite et la membrane plasmique et qui pourrait également participer à l'exclusion de certains marqueurs hôtes de l'intérieur de la vacuole parasitophore en formation, permettant ainsi la survie du parasite (Alexander et al., 2005).

- Les protéines de rhoptries (ROP)

Les rhoptries sont des organelles sécrétoires uniques et essentielles pour le parasitisme des Apicomplexa. L'intégrité de ces organelles affecte la capacité des parasites à envahir la cellule hôte et à y établir une niche permissive pour sa réplication (Nakaar et al., 2003). Les tachyzoïtes contiennent généralement 12 rhoptries, chacune mesurant 2 à 3 µm de long (Dubey et al., 1998). Elles sont regroupées au pôle antérieur du parasite. Les rhoptries étant très conservées dans le phylum des Apicomplexa, elles sont suspectées d'avoir un rôle clé dans le cycle intracellulaire de ces pathogènes.

Il existe de nombreuses protéines de rhoptries connues à ce jour, les ROP présentes dans le bulbe et les RON présentes dans le cou. La plupart des ROP et des RON sont spécifiques au phylum des Apicomplexa et comportent peu d'homologies avec des protéines d'eucaryotes supérieurs. Cependant, certaines ROP portent des signatures enzymatiques kinases, phosphatases et protéases (Boothroyd et Dubremetz, 2008). Plusieurs RON possèdent des orthologues évidents dans des genres apparentés comme *Plasmodium spp* suggérant leur implication dans des processus communs

au phylum des Apicomplexa. Enfin, les rhoptries contiennent également des lipides et un fort taux de cholestérol (Foussard et al., 1991).

Les rhoptries déchargent leur contenu durant le processus d'invasion de la cellule hôte. Le signal de sécrétion n'est pas connu à ce jour, mais il dépend de la reconnaissance directe entre la surface apicale du parasite et des molécules réceptrices de la cellule hôte. Durant l'invasion cellulaire, Nichols et al. ont observé, au pôle antérieur du tachyzoïte, une ouverture distincte pouvant correspondre à l'ouverture à travers laquelle les rhoptries déversent leur contenu (Nichols et al., 1983). Une fois relarguées, les protéines des rhoptries ont des destinations diverses :

- Les **protéines ROP** sont relarguées durant l'invasion. Elles migrent vers trois localisations principales : la lumière de la vacuole parasitophore (VP), la membrane de la VP ou à l'intérieur de la cellule hôte. ROP1 s'accumule dans la lumière de la VP en formation mais est aussi retrouvée dans de petites vésicules dépourvues de parasites et appelées évacuoles (Ossorio et al., 1992; Håkansson et al., 2001). Les protéines ROP2 migrent généralement vers la membrane de la VP (Beckers et al., 1994; Carey et al., 2004). La protéine ROP2 y est insérée et son domaine N-terminal est exposé dans le cytoplasme de la cellule hôte. Elle est impliquée dans le recrutement des mitochondries de la cellule hôte (Sinai et al., 1997; Sinai et Joiner, 2001). Deux protéines, PP2C (protéine phosphatase 2C) et ROP16, ont été observées dans le noyau. Ce processus intervient très rapidement, puisque ces protéines sont retrouvées dans le noyau 15 minutes après l'invasion. PP2C et ROP16 migrent vers le noyau de la cellule hôte en utilisant un signal de localisation nucléaire qu'elles portent (Gilbert et al., 2007; Saeij et al., 2007).

- Les **protéines RON** (RON2, 4 et 5) forment un complexe avec la protéine de micronème AMA1. Ce complexe se localise au niveau de la jonction mobile (Alexander et al., 2005; Lebrun et al., 2005). Un nouveau complexe RON9/RON10, non présent au niveau de la jonction mobile mais plutôt responsable de l'adressage vers les rhoptries, vient d'être décrit (Lamarque et al., 2012).

- Les protéines de granules denses (GRA)

Les granules denses sont des vésicules sécrétrices de 200 nm de diamètre entourées d'une membrane unique. Leur nombre varie de 3 à 15 par parasite. Ils jouent un rôle majeur dans les modifications structurales de la VP (Mercier et al., 2005). Les protéines des granules denses sont libérées à l'intérieur de la VP pendant et après l'invasion de la cellule hôte. Il existe 12 protéines des granules denses (GRA1-10, 12 et 14) ainsi que deux NTPase I et II (*Nucleoside Triphosphatase hydrolase*) et deux inhibiteurs de protéases, TgPI 1 et 2 (Cesbron-Delauw, 1994; Ahn et al., 2005;

Rome et al., 2008; Michelin et al., 2009). Les protéines GRA s'associent à la VP et au réseau tubulaire par des interactions hydrophobes ou protéines/protéines. Elles interviennent également dans le recrutement des nutriments et dans l'inhibition des voies apoptotiques de la cellule hôte (Nash et al., 1998; Carruthers, 2002; Mercier et al., 2005). Elles participent à l'invasion, à la survie intracellulaire du parasite et à sa multiplication (Cha et al., 2001). GRA7 est impliqué dans la séquestration des vésicules endolysosomales à l'intérieur de la VP (Coppens et al., 2006). Beaucoup de protéines GRA possèdent des domaines transmembranaires putatifs. Parmi elles, GRA3 et GRA5 seraient impliquées dans l'ancrage de la membrane de la VP au réticulum endoplasmique (Kim et al., 2008).

III. Diagnostic et traitements de la toxoplasmose

1) Le diagnostic

a. Le diagnostic parasitologique

Le diagnostic biologique repose selon les circonstances sur l'isolement du parasite (ou de son ADN) et/ou de la détection d'anticorps spécifiques. Le diagnostic de certitude est apporté par la mise en évidence du parasite dans les différents prélèvements biologiques. Il repose sur l'examen direct, l'isolement du parasite et la détection d'ADN toxoplasmique. L'isolement du parasite est réalisé par inoculation à la souris qui demeure la technique de référence. L'inoculation à l'animal a l'avantage de pouvoir être pratiquée sur tout type de prélèvement. L'inoculation est réalisée par voie intrapéritonéale et, lorsque l'inoculum contient des toxoplasmes, les souris développent une infection généralement asymptomatique (dont le diagnostic est réalisé par détection d'anticorps spécifiques trois à quatre semaines après l'inoculation), avec présence de kystes intracérébraux. Cette technique présente une bonne sensibilité (variable selon la richesse de l'inoculum), une excellente spécificité et l'avantage de détecter des parasites viables; cependant son délai de réponse tardif représente un inconvénient majeur pour le diagnostic.

La biologie moléculaire a permis des progrès considérables pour le diagnostic de la toxoplasmose. Son application aux prélèvements biologiques (liquide amniotique, sang, lavage

broncho-alvéolaire, liquide céphalorachidien, humeur aqueuse, etc) est cependant réservée à des laboratoires spécialisés. Diverses techniques ont été développées avec des sensibilités rapportées variables selon les méthodes d'extraction de l'ADN utilisées et le gène détecté (Cazenave et al., 1992; Romand et al., 2001). Un choix consensuel s'établit pour l'utilisation comme cibles de gènes répétés, par exemple le gène B1 (répété 35 fois) en raison de sa spécificité au sein du génome de *T. gondii* (Burg et al., 1989) et plus récemment par amplification de la séquence de Homan (529 pb) (répété 200 à 300 fois) (Homan et al., 2000). La PCR en temps réel, d'utilisation plus récente, permet en outre une quantification de l'ADN présent dans les prélèvements (Romand et al., 2004).

b. Le diagnostic sérologique

De nombreuses techniques sérologiques sont développées; les techniques de dépistage et de diagnostic de "première intention", ainsi que les techniques dites complémentaires ou de "seconde intention" recommandées pour dater une infection ou pour mieux caractériser et comparer les anticorps produits dans le sérum ou d'autres milieux biologiques.

Les techniques de première intention appliquées au diagnostic courant de la toxoplasmose de l'adulte sont des techniques quantitatives et reposent principalement sur des réactions immuno-enzymatiques (ELISA indirect ou inverse) ou d'immuno-chimiluminescence avec des trousse standardisées commercialisées permettant la quantification des anticorps IgG, IgM ou IgA. D'autres techniques peuvent être employées en complément: l'immunofluorescence indirecte, le dye-test ou l'agglutination directe de haute sensibilité pour la détection des IgG notamment à taux limites. La détection des IgM et IgA repose sur des méthodes d'immunocapture. Ces techniques sont souvent utilisées en association notamment pour dater une infection chez une femme enceinte.

Les techniques de seconde intention sont proposées en complément pour l'analyse qualitative des anticorps. Ces techniques reposent sur la mesure de l'avidité des IgG par ELISA employée chez une femme enceinte lorsque les tests précédemment cités ne permettent pas de dater précisément la contamination, l'analyse des profils immunologiques par Western Blot (Robert-Gangneux et al., 1999) et l'ELIFA (*Enzyme linked immunofiltration assay*) (Pinon et al., 1996) dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose congénitale et de la toxoplasmose oculaire pour le Western blot. La détermination de la charge immunitaire peut être utile pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, de la toxoplasmose oculaire ou de la toxoplasmose cérébrale.

Le diagnostic courant de la toxoplasmose du patient immunocompétent est sérologique. Le titrage des IgG et des IgM permet de définir le statut sérologique.

Chez la femme enceinte, la sérologie permet de définir le statut immunitaire et d'assurer la surveillance en cas de séronégativité, enfin de poser le diagnostic de séroconversion pendant la grossesse. Le diagnostic anténatal de toxoplasmose congénitale repose sur le diagnostic parasitaire (recherche d'ADN toxoplasmique et inoculation à la souris) par analyse du liquide amniotique. L'association des deux techniques permet d'obtenir une sensibilité de l'ordre de 80% (Romand et al., 2001). Le diagnostic postnatal est essentiellement sérologique.

2) Les traitements

Les médicaments reconnus actifs vis à vis de *T. gondii* se repartissent en deux grandes familles, les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique et les macrolides (Derouin, 2001). Ces médicaments sont en majorité actifs sur les tachyzoïtes et sont sans effet sur les kystes (à l'exception de l'atovaquone qui présente une activité sur les tachyzoïtes et les kystes).

a. Les inhibiteurs de la synthèse folique

Les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique comprennent les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (DHFR) et les inhibiteurs de la dihydroptéroate synthase (DHPS). Ceux-ci sont utilisés en association du fait d'une action synergique par un effet "en cascade" sur deux enzymes essentielles au métabolisme de l'acide folique du parasite, la DHPS et la DHFR (**Figure 6**).

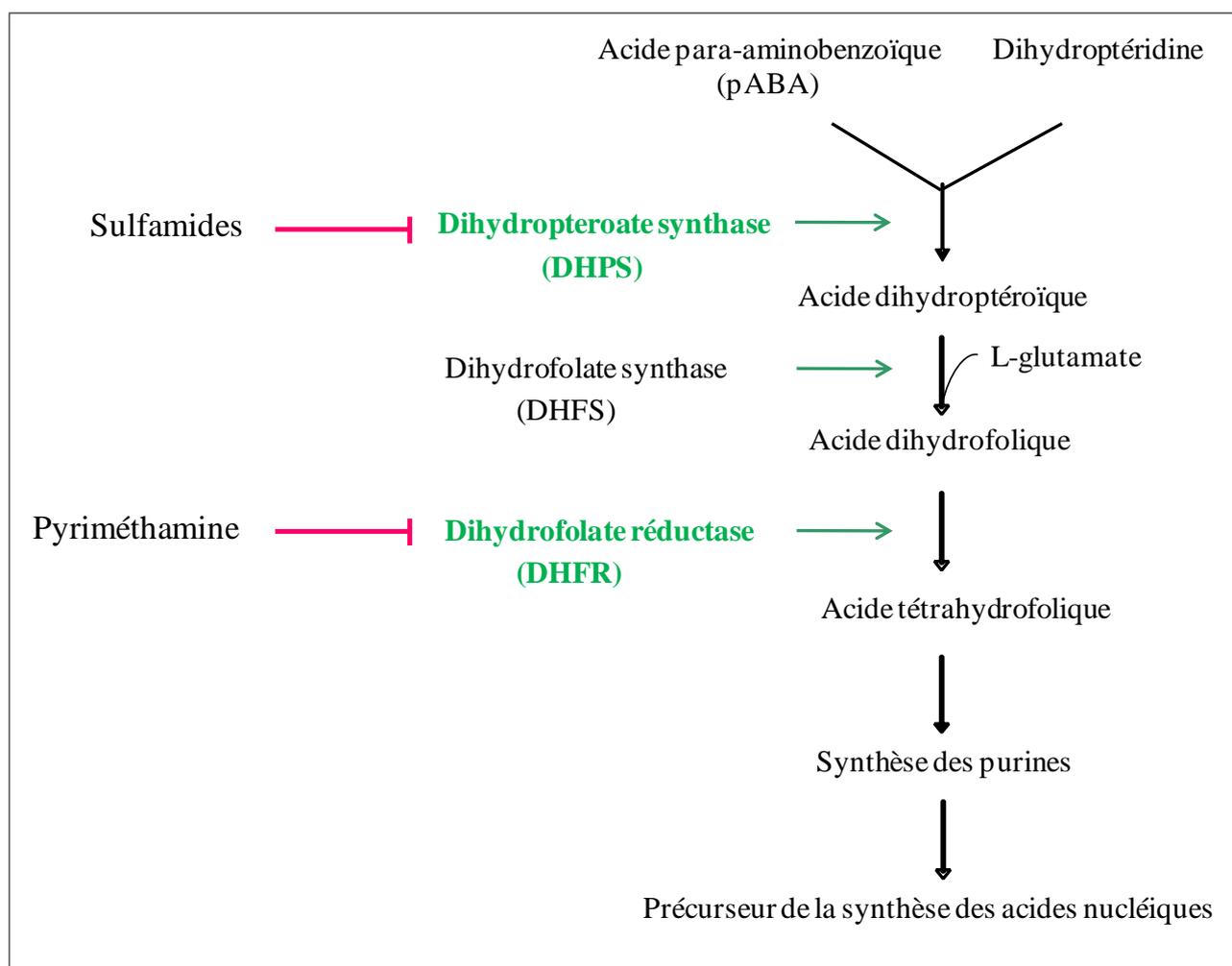


Figure 6. Schéma simplifié de la voie de synthèse des folates chez *T. gondii*

Ces médicaments agissent en inhibant la synthèse folique du parasite mais également celle de l'hôte. En conséquence, ils ont un effet antiparasitaire puissant (altérations de la synthèse des bases puriques et de la division parasitaire) qui s'accompagnent d'effets indésirables hématologiques (neutropénie, thrombopénie). Ces médicaments diffusent bien dans l'organisme et franchissent la barrière placentaire.

Parmi les inhibiteurs de la DHFR, l'un des plus actifs est la pyriméthamine, qui a un effet parasiticide sur les tachyzoïtes de *T. gondii* à de très faibles concentrations. Pour limiter les effets secondaires hématologiques, la pyriméthamine est administrée avec de l'acide folinique. Le triméthoprime est également actif sur *T. gondii* à des concentrations 50 ou 100 fois plus élevées que la pyriméthamine.

Pour les inhibiteurs de la DHPS, de nombreux sulfamides sont actifs sur *T. gondii* et leur choix est surtout orienté par leur pharmacocinétique. La sulfadiazine et le sulfaméthoxazole ont des demi-vies courtes (10-12 heures) imposant une administration quotidienne; la sulfadoxine est un sulfamide retard, moins actif que la sulfadiazine mais dont l'administration peut être hebdomadaire.

Les associations les plus actives usuellement prescrites sont pyriméthamine et sulfadiazine, pyriméthamine et sulfadoxine (effet retard), ainsi que triméthoprime et sulfaméthoxazole. Ces associations sont utilisées pour le traitement et la prophylaxie secondaire des formes graves de toxoplasmose chez les immunodéprimés. L'association pyriméthamine-sulfamides est utilisée dans le cadre de la toxoplasmose congénitale (traitement anténatal visant à traiter le fœtus puis traitement post-natal).

b. Les macrolides

Les macrolides comprennent une grande variété de molécules. Ces antibiotiques ne sont actifs qu'à des concentrations élevées du fait d'un effet uniquement parasitostatique dont le mode d'action est encore mal connu. Ces molécules ne diffusent pas correctement dans certains organes comme le cerveau et l'œil, limitant leur intérêt dans le traitement des formes graves de toxoplasmose. En revanche, les macrolides se concentrent bien dans le placenta et pourrait permettre de réduire la transmission materno-fœtale du parasite.

La spiramycine est le principal macrolide utilisé dans le traitement de la toxoplasmose acquise et en cours de grossesse. Les autres macrolides présentent de meilleures concentrations tissulaires, mais sont contre-indiqués chez la femme enceinte.

La clindamycine a des caractéristiques pharmacologiques voisines de celles des macrolides; elle est habituellement utilisée en association avec la pyriméthamine dans le traitement des toxoplasmoses cérébrales ou oculaires essentiellement chez l'immunodéprimé. Le mode d'action de la clindamycine est bien documenté; elle agirait en perturbant la synthèse protéique du parasite au niveau du cytoplasme et de l'apicoplaste (Blais et al., 1993; Beckers et al., 1995).

c. Autres médicaments

L'atovaquone, qui agit par inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (cytochrome B1) du parasite a pour avantage d'être à la fois actif sur les tachyzoïtes et sur les kystes de *T. gondii*. Cependant l'utilisation de ce médicament est réduite du fait de sa mauvaise biodisponibilité.

3) Les principaux schémas thérapeutiques

- Traitement de la toxoplasmose acquise

Les formes asymptomatiques ou bénignes ne justifient d'aucun traitement. Dans les formes sévères avec atteinte viscérale, le traitement par l'association de la pyriméthamine et de sulfamides est efficace.

- Traitement de la toxoplasmose congénitale

Le traitement préventif de la toxoplasmose congénitale en cas de séroconversion maternelle repose sur l'administration de spiramycine jusqu'à l'accouchement ou jusqu'au résultat du diagnostic anténatal, bien que son efficacité sur la réduction de la transmission materno-fœtale soit discutée (Gilbert et al., 2001; Thiébaud et al., 2007). En cas de contamination fœtale prouvée, le traitement prénatal de la toxoplasmose congénitale repose sur l'administration de l'association de pyriméthamine et de sulfadiazine ou de pyriméthamine et de sulfadoxine, avec administration concomitante d'acide folinique. L'efficacité de ce schéma thérapeutique sur les lésions fœtales semble établie (Villena et al., 1998a; Foulon et al., 1999). Cependant, ces données sont à nuancer en l'absence d'étude prospective contrôlée (Gras et al., 2001; Thiébaud et al., 2007). Le traitement postnatal de la toxoplasmose congénitale repose sur l'administration prolongée des mêmes associations toujours en présence d'acide folinique. Ce traitement est généralement continu pendant au moins 12 mois voire 24 mois selon les équipes (Villena et al., 1998b; Wallon et al., 2004).

- Traitement de l'immunodéprimé

Le traitement curatif des formes graves chez l'immunodéprimé repose généralement sur la combinaison de la pyriméthamine et des sulfamides (Luft et al., 1993; Derouin, 2001) en associant de l'acide folinique; des associations pyriméthamine-clindamycine ont été également utilisées.

4) Les échecs thérapeutiques

La toxoplasmose congénitale fait apparaître dans son évolution naturelle des poussées de chorioretinite sans que les mécanismes physiologiques ne soient clairement établis (Wallon et al., 2004). Le traitement semble actif sur les lésions fraîches et peut diminuer les séquelles. Des lésions de chorioretinites peuvent apparaître sous traitement malgré une bonne observance de celui-ci et des

concentrations sériques des molécules correctes comme en attestent les dosages pharmacologiques des médicaments (Trenque et al., 2004). Par ailleurs des échecs thérapeutiques sont rapportés vis-à-vis des principales molécules utilisées (association de la pyriméthamine et de la sulfadiazine) dans le traitement des formes graves de toxoplasmose survenant chez les patients immunodéprimés (Derouin, 2001). Plusieurs paramètres pharmacologiques peuvent contribuer à ces échecs: facteurs individuels d'absorption, intolérance à l'une ou l'autre des molécules (sulfamides) ou mauvaise diffusion tissulaire. Cependant, compte tenu des cibles d'action des médicaments utilisés dans le traitement de la toxoplasmose, l'existence de facteurs de résistance ou de moindre susceptibilité en fonction de la souche parasitaire peut être suspectée.

Les mécanismes de résistance chez les protozoaires

En 1973, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définissait, dans les cas de paludisme, la résistance médicamenteuse comme étant « la capacité d'une souche à survivre ou à se reproduire malgré l'administration et l'absorption d'un médicament employé à des doses égales ou supérieures aux doses ordinairement recommandées mais comprises dans les limites de tolérance du sujet ». Depuis, cette définition s'est étendue à d'autres espèces de parasites. En effet, depuis une vingtaine d'années, les études portant sur les phénomènes de résistance aux antiparasitaires chez les protozoaires n'ont cessé d'augmenter, reflétant ainsi l'importance de la résistance médicamenteuse en santé publique. Parmi les mécanismes identifiés conduisant à la résistance aux drogues, ceux basés sur la mutation de gènes cibles, la surexpression de gènes et les mécanismes d'efflux des drogues semblent être les plus à même d'expliquer ces phénomènes chez les protozoaires *Plasmodium spp*, *Leishmania spp*, *Trypanosoma spp*, et *Entamoeba spp*.

I. La résistance médicamenteuse chez *Plasmodium spp*.

Le paludisme, aussi appelé malaria, est la parasitose la plus répandue dans le monde. Elle est causée par des protozoaires du genre *Plasmodium* comprenant quatre espèces pathogènes principales pour l'Homme : *P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum* qui représente l'espèce la plus dangereuse pour l'homme causant la mort de plus d'un million de personnes par an principalement en Afrique sub-saharienne, où le paludisme est endémique (Murray et al., 2012). La transmission du parasite se fait par la piqûre d'un moustique femelle du genre Anophèle.

Pendant longtemps, les traitements des infections à *Plasmodium spp* reposaient principalement sur l'utilisation la chloroquine, la quinine et l'association de pyriméthamine-sulfadoxine, et dans une moindre mesure la méfloquine, l'amodiaquine et la doxycycline. Ces molécules furent pendant longtemps très efficaces pour lutter contre *Plasmodium* mais leur prescription sans contrôle a favorisé l'émergence de souches résistantes.

Les mécanismes de résistance médicamenteuse chez *Plasmodium* sont complexes et nombreux : surexpression de gènes, mutations ou encore phénomènes d'efflux de drogues.

Les premiers cas de résistance chez *Plasmodium* ont été observés en Indochine suite à une utilisation massive de pyriméthamine en monothérapie. La sélection rapide de parasites résistants a conduit à l'utilisation de chloroquine dans les années 1940 (Verdrager, 1986).

La chloroquine a ensuite été administrée dans les infections à *Plasmodium*. Elle agit en traversant la membrane de l'érythrocyte parasité et en se concentrant dans la vacuole digestive du parasite ; elle entraîne ainsi une accumulation de molécules d'hématine (produit de dégradation de l'hème de l'hémoglobine, toxique pour *Plasmodium*) qui entraîne la lyse du parasite. La chloroquine est efficace pour *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Cependant, des phénomènes de résistance à la chloroquine ont été rapportés pour *P. falciparum* en Afrique tropicale, Amérique du Sud et Asie du Sud-Est (Le Bras et Durand, 2003).

Les premières études sur la résistance à la chloroquine chez *P. falciparum* ont montré qu'elle était réversible sous l'action de modulateurs d'efflux des pompes membranaires comme le vérapamil et qu'elle était liée à un défaut d'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive (Martin et al., 1987). Par analogie avec les lignées tumorales chez les mammifères, deux gènes *mdr*-like ont été identifiés chez *Plasmodium* : *pfmdr1* et *pfmdr2* (Foote et al., 1989; Wilson et al., 1989); cependant aucun de ces deux candidats n'a pu être relié directement à la résistance à la chloroquine chez *Plasmodium* (Wellems et al., 1990). Le rôle de PfMDR1 dans la résistance médicamenteuse a pu être déterminé, par la suite, lors de l'analyse de l'expression du gène dans des isolats de terrains et des souches rendus résistantes à la méfloquine *in vitro* : une augmentation du nombre de copies du gène ainsi qu'une augmentation de l'expression de *pfmdr1* a pu être démontrée, celles-ci s'accompagnant d'une diminution de la sensibilité à la méfloquine mais également à l'halofantrine et la quinine (Wilson et al., 1993; Cowman et al., 1994). De façon intéressante, des études ont montré que le nombre de copies du gène et l'expression de *pfmdr1* sont inversement corrélés avec la résistance à la chloroquine mais positivement avec la résistance à la méfloquine (Barnes et al., 1992).

Trois polymorphismes (S1034C, N1042D, et D1246Y) du gène *pfmdr1* ont été identifiés sur des isolats d'Amérique du Sud en relation avec la résistance à la chloroquine (Foote et al., 1990). Des études récentes de transfection du gène muté dans des parasites sensibles à la chloroquine contenant

le gène sauvage *pfmdr1*, ont démontré que la protéine mutée confère la résistance vis à vis de la quinine et, comme attendu, de la chloroquine mais pas vis à vis de la méfloquine, l'halofantrine ni de l'artémisine (Duraisingh et al., 2000; Reed et al., 2000). D'autres mutations sont également rapportées telles N86Y et Y184F. Ainsi, en Thaïlande, une corrélation positive existe entre la résistance à la méfloquine et la mutation N86Y (Lopes et al., 2002). La mutation Y184F ne semble pas impliquée dans la résistance à la chloroquine, du fait de sa présence dans les souches sensibles à la chloroquine (Foote et al., 1990).

L'étude du génome de parasites issus du croisement de souches chloroquino-sensibles (CQS) et chloroquino-résistantes (CQR) a permis l'identification d'un gène lié à la résistance à la chloroquine : *pfcr1* (*Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*) (Wellems et al., 1991) (**Figure 7**). Ce gène code pour une protéine transmembranaire de 49 kDa localisée dans la vacuole digestive et n'appartenant pas à la famille des ABC transporteurs. La comparaison de séquences de l'allèle *pfcr1* des souches parentales a permis d'identifier plusieurs mutations ponctuelles chez les souches de phénotype CQR, dont la mutation K76T. Des études de transfection ont ensuite permis de préciser l'importance de cette mutation dans la résistance à la chloroquine. Fidock et al. ont montré que cette mutation était associée à l'augmentation de l'acidité de la vacuole digestive, et ainsi que le transport d'ions au travers de la membrane de la vacuole digestive était affecté (Fidock et al., 2000).

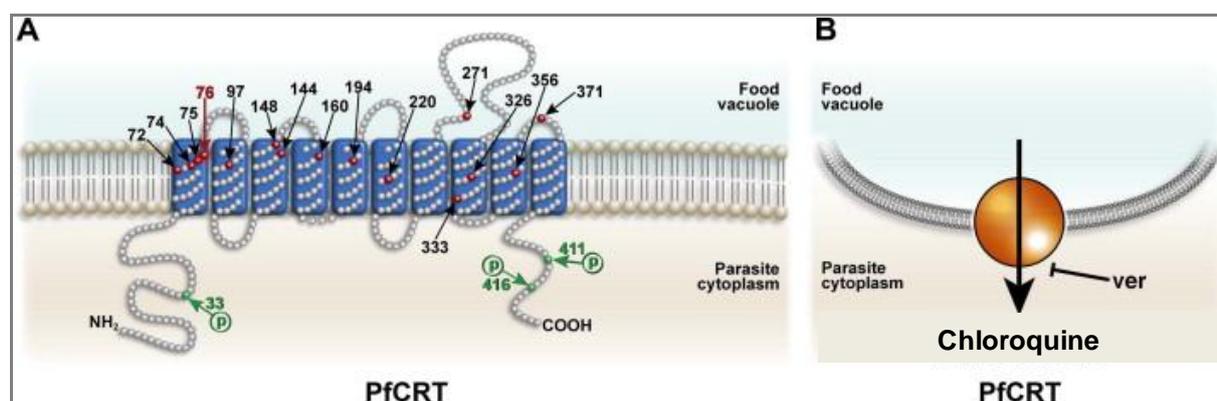


Figure 7. Organisation structurale et fonctionnalité de PfCRT (d'après Sanchez et al., 2010)

(A) Organisation structurale de PfCRT. Les polymorphismes sont indiqués par les flèches noires. La mutation K76T, trouvée dans les souches chloroquino-résistantes, est indiquée par la flèche rouge. (B) PfCRT mutée est capable d'effluer la chloroquine en dehors de la vacuole digestive du parasite, où elle s'accumule. L'efflux de la chloroquine est inhibé en présence de Vérapamil (Ver) dans les souches Chloroquino-sensibles.

De plus, la présence de la mutation N86Y de *pfmdr1* accroît le niveau de résistance liée à l'expression de la protéine PfCRT mutée en K76T pour des isolats de *P. falciparum* du Soudan. Ceci suggère une action conjointe de ces gènes dans la résistance à la chloroquine (Babiker et al., 2001).

Enfin, la résistance aux antifoliques et aux antifoliniques est déterminée par des mutations de gènes impliqués dans la synthèse des folates du parasite. Les mutations ponctuelles au niveau du gène codant la dihydroptéroate synthase (*pfdhps* A437G, K540E et A581G) sont responsables de la résistance à la sulfadoxine et aux sulfones (Triglia et al., 1998). Chez les protozoaires dont *Plasmodium*, la dihydrofolate réductase (DHFR) et la thymidylate synthase (TS) sont fusionnées dans une protéine bifonctionnelle PfDHFR-TS. Les mutations au niveau du gène *pfdhfr-ts* sont responsables de la résistance à la pyriméthamine et au cycloguanil, le métabolite actif du proguanil. La substitution S108N de PfDHFR-TS est la mutation clé de la résistance de *P. falciparum* aux antifoliniques (Cowman et al., 1988; Peterson et al., 1988; Wu et al., 1996). Elle peut être associée à d'autres mutations de PfDHFR-TS (N51I, C59R et I164L). Plus le nombre de mutations est élevé, plus le niveau de résistance des parasites est important (Nzila-Mounda et al., 1998).

II. La résistance médicamenteuse chez *Leishmania* spp.

La leishmaniose est une parasitose de l'Homme et de nombreux mammifères. Elle se présente sous deux entités cliniques : les leishmanioses cutanées et les leishmanioses viscérales. La leishmaniose est causée par des protozoaires du genre *Leishmania* et transmises par la piqûre de certaines espèces de phlébotomes. L'incidence des leishmanioses est d'environ 1 à 2 millions de nouveaux cas par an. Le traitement prescrit en première intention, essentiellement dans les leishmanioses viscérales et cutanéomuqueuses, est un composé à base d'antimoine pentavalent (Sb^V), une molécule utilisée depuis plus de 50 ans. Quelques traitements alternatifs sont disponibles, comme l'amphotéricine B et la pentamidine, cependant plus toxiques.

Depuis les années 1940, le traitement de la leishmaniose fait appel à l'utilisation de dérivés d'antimoine pentavalents qui deviennent actifs *in vivo* après réduction en antimoine trivalent (Sb^{III}). Cependant la chimiorésistance à l'antimoine pentavalent est en constante augmentation du fait de son utilisation massive. Les mécanismes de résistance impliqués seraient dû à une

diminution de la réduction de l'antimoine trivalent, une diminution de la formation de complexes actifs avec des thiols ou encore une augmentation de leur efflux extracellulaire par des transporteurs de la famille des ABC transporteurs (**Figure 8**).

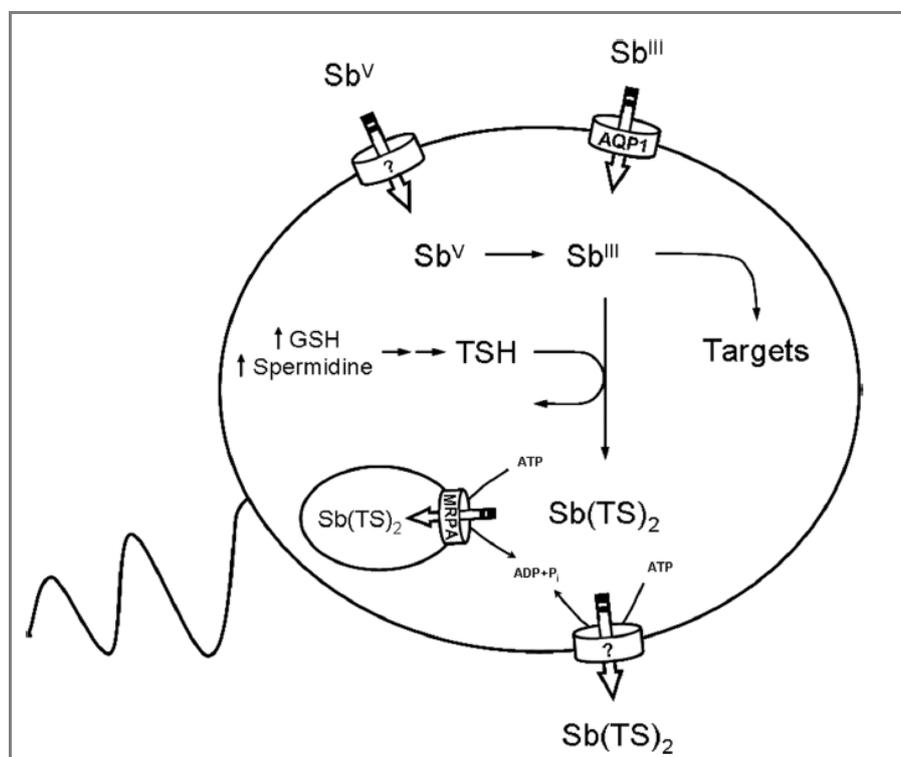


Figure 8. Mécanismes de résistance à l'antimoine chez *Leishmania* (Leprohon et al., 2011)

L'aquaglycéroporine-1 (AQP1) est responsable de l'absorption de Sb^{III} alors que le mode d'entrée de Sb^V est inconnu. Une fois à l'intérieur de la cellule, Sb^V est réduit sous sa forme biologiquement active Sb^{III} par les réductases. Les taux de TSH sont augmentés dans les parasites résistants à l'antimoine en raison de l'augmentation de l'expression des γ -GCS et des enzymes ODC, responsable respectivement de la synthèse de la GSH et de la spermidine. Sb^{III} est conjugué à la TSH avant d'être transporté à l'intérieur d'une vésicule de détoxification par l'ABC transporteur MRPA ou avant d'être expulsé par une protéine membranaire dont l'identité est encore inconnue.

Depuis les années 1960, l'amphotéricine B (AmB) est utilisé en traitement de seconde intention dans les cas de leishmanioses. L'AmB est un antifongique qui agit en formant un canal transmembranaire en s'associant avec l'ergostérol présent dans la membrane du parasite, permettant ainsi l'accumulation du médicament à l'intérieur du parasite aboutissant à la mort du pathogène. Aucun cas clinique de résistance à l'AmB n'a encore été décrit dans la littérature. Cependant la résistance à l'AmB a pu être démontrée en laboratoire et serait due à une absence de synthèse d'ergostérol par le parasite résistant, celui-ci étant remplacé par un autre stérol modifiant ainsi la

fluidité et la perméabilité de la membrane parasitaire (Mbongo et al., 1998). L'AmB piégé en petite quantité dans le parasite résistant pourrait être efflué par la protéine MDR1 (Purkait et al., 2012).

La pentamidine est une amine aromatique antiparasitaire. Son mécanisme d'action résulterait d'une modification de l'activité des enzymes de la voie de biosynthèse des polyamines et de protéines d'efflux. Une diminution de son accumulation dans la mitochondrie parasitaire a également été décrite.

La miltéfosine est un dérivé de la phosphocholine, son mécanisme d'action reste mal connu. Deux mécanismes indépendants semblent être à l'origine de la résistance à la miltéfosine chez *Leishmania* : i) une augmentation de l'efflux de la molécule due à la surexpression de deux protéines appartenant à la famille des ABC transporteurs, LiABCG4 et LiABCG6 (Castanys-Muñoz et al., 2007, 2008); ii) une diminution voire une inactivation de l'expression d'une protéine responsable de l'absorption de la miltéfosine, LMT (*Leishmania miltefosine transporter*) et de sa sous-unité β , LdRos3 (Sánchez-Cañete et al., 2009).

Enfin, l'étude de la résistance aux antifolates utilisant le méthotrexate comme modèle chez *Leishmania* a permis de mettre en évidence différents types de mécanismes de résistance tels que la mutation de la DHFR-TS (Guimond et al., 2003), la surexpression du gène *bt1* codant pour un transporteur de la bioptérine (El Fadili et al., 2004) ou encore une surexpression du gène de la FPGS (Folylpolyglutamate synthase) (El-Fadili et al., 2003). Ces mécanismes seront précisés dans la suite de ce manuscrit.

III. La résistance médicamenteuse chez *Trypanosoma spp.*

Les trypanosomiasés sont des maladies parasitaires à transmission vectorielle, engendrées par des protozoaires flagellés, les trypanosomes. La trypanosomiase se présente sous deux entités cliniques très différentes selon l'espèce incriminée : la trypanosomiase Africaine, ou maladie du sommeil, due à *T. brucei spp* (*T. gambiense* et *T. rhodesiense*), et la trypanosomiase Sud-Américaine, encore appelée maladie de Chagas, due à l'espèce *T. cruzi*.

Le mélarsoprol est l'un des traitements les plus utilisés pour traiter les trypanosomiasés. Cependant de nombreux échecs thérapeutiques ont été rapportés (Brun et al., 2001). Les mécanismes de résistance au mélarsoprol ont largement été étudiés et plusieurs mécanismes expliquant cette résistance ont été rapportés. La résistance au mélarsoprol serait augmentée avec l'inactivation du gène *TbATI*, codant pour l'adénosine transporteur P2 (Matovu et al., 2003). Un autre mécanisme permettrait d'expliquer la résistance au mélarsoprol : l'augmentation de la protéine TbMRPA, appartenant à la famille des ABC transporteurs, augmenterait de 10 fois la résistance au mélarsoprol (Shahi et al., 2002).

IV. La résistance médicamenteuse chez *Entamoeba histolytica*

L'amibiase est une affection parasitaire à transmission féco-orale, due à un protozoaire, *Entamoeba histolytica*. Elle se présente sous deux entités cliniques : l'amibiase digestive et l'amibiase viscérale. Le traitement de l'amibiase repose sur les amoebicides tissulaires, principalement le métronidazole qui agit directement sur la forme active du parasite en altérant ses organelles et l'émétine qui agit en inhibant la synthèse protéique du parasite.

La résistance médicamenteuse sur les isolats cliniques d'*Entamoeba* est peu décrite à ce jour, mais l'apparition d'échec thérapeutique avec le métronidazole ainsi que les différences de niveaux de sensibilité à ce médicament suggèrent la possibilité d'un développement d'une résistance clinique.

Afin de comprendre les mécanismes pouvant être impliqués dans la résistance médicamenteuse chez *Entamoeba*, des souches d'*E. histolytica* ont été rendues résistantes au métronidazole après une exposition continue, *in vitro*, à des concentrations croissantes du médicament (Samarawickrema et al., 1997). Aucune diminution de l'activité de la pyruvate : ferredoxine oxydoréductase (PFOR), protéine impliquée dans les mécanismes de résistance au métronidazole chez les organismes anaérobies tels que *Giardia* (Upcroft et Upcroft, 1993; Townson et al., 1996), n'a été rapportée dans les souches résistantes au métronidazole. Cependant une surexpression de la Fe-Superoxyde Dismutase (Fe-SOD) et de la peroxiredoxine a été observée dans les souches résistantes (Wassmann

et al., 1999), suggérant leur implication dans les mécanismes de résistance au métronidazole chez *E. histolytica*.

Des clones mutants d'*E. histolytica* présentant une résistance à l'émétine ont été obtenus par mutagenèse. L'étude de ces clones a montré de grandes similarités avec des protéines MDR décrites dans les cellules tumorales de mammifères. Six gènes (*EhPgp1- EhPgp6*) codant pour des protéines MDR ont été identifiés dans les souches résistantes à l'émétine chez *E. histolytica*. Il apparaît qu'*EhPGP5* est le seul gène qui ne soit pas exprimé dans des souches sensibles d'*Entamoeba*, la présence de drogues étant indispensable à son expression. De nombreuses études s'intéressent aux mécanismes de régulation de l'expression de ces gènes dans les souches résistantes aux drogues (Orozco et al., 2002).

V. La résistance médicamenteuse chez *T. gondii*

1) Mécanismes de résistance à la clindamycine et l'atovaquone

Les mécanismes de résistance à la clindamycine et l'atovaquone chez *T. gondii* concernent des souches obtenues expérimentalement permettant d'obtenir des mutants stables résistants à la clindamycine et l'atovaquone.

La clindamycine agirait en perturbant la synthèse protéique de *T. gondii* au niveau de l'apicoplaste. Une mutation ponctuelle de la grosse sous-unité de l'ARNr de l'apicoplaste de *T. gondii* à la position 1857 a été identifiée chez deux souches mutantes résistance à la clindamycine. Cette mutation correspondant, à la mutation 2061 chez *E. coli* (Douthwaite, 1992) et aux mutations 2058 et 2059 chez les bactéries résistantes aux antibiotiques (Sigmund et al., 1988), permet d'identifier l'apicoplaste comme cible de la clindamycine (Camps et al., 2002).

Les mitochondries des protozoaires ont été identifiées comme des cibles thérapeutiques sensibles aux analogues de l'ubiquinone, dont l'atovaquone (Romand et al., 1993; Ellis, 1994). McFadden et al., ont montré que la cible moléculaire de l'atovaquone chez *T.gondii* était le domaine Q(o) du gène du cytochrome b, suggérant que des mutations dans cette région pourraient conduire à une résistance à cette drogue. Deux mutations, M129L et I254L, ont été identifiées sur quatre souches résistantes à l'atovaquone obtenues par mutagenèse. Ces mutations interviennent dans les régions formant le domaine Q(o) dans la structure tertiaire du cytochrome b (McFadden et al.,

2000). Des études sur *Plasmodium* et *Pneumocystis* ont aussi montré que des mutations dans la région Q(o) du cytochrome b conduisent à des résistances à l'atovaquone (Walker et al., 1998; Srivastava et al., 1999; Kazanjian et al., 2001).

2) Mécanismes de résistance aux antifolates

Parmi les protozoaires parasites d'importance clinique, *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium sp.* présentent une évolution commune. Ils sont membres du phylum des Apicomplexa et possèdent une vulnérabilité dans leur métabolisme des folates, qui forme la base des traitements employés (Ho-Yen et al., 1992).

a. La voie de synthèse des folates

Le terme folate désigne l'ensemble des différentes formes de l'acide folique. Cette molécule est composée de trois parties bien distinctes: un noyau ptérine conjugué à un acide para-aminobenzoïque (pABA) sur lequel s'articule une chaîne de glutamate (**Figure 9**).

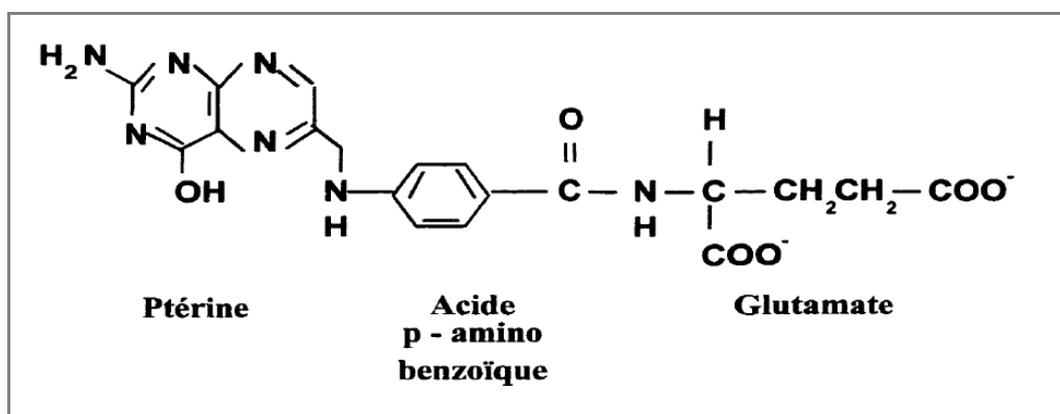


Figure 9. Structure chimique de l'acide folique

La plupart des bactéries, des levures et quelques parasites dont *Plasmodium spp.* et *T. gondii* sont capables de synthétiser *de novo* les folates (Massimine et al., 2005). Ces organismes ont besoins de conjuguer la ptérine avec le pABA pour former le dihydroptéroate. Cette réaction est catalysée par la dihydroptéroate synthase (DHPS). Cette enzyme est une cible thérapeutique contre

laquelle sont dirigés les sulfamides. La plupart des microorganismes sont capables de synthétiser les folates à partir de GTP, pABA et L-glutamate.

La dihydrofolate synthase (DHFS) catalyse l'addition de l'acide glutamique au 7,8-dihydroptéroate conduisant à la synthèse du 7,8-dihydrofolate. La dihydrofolate reductase (DHFR) réduit le dihydrofolate (DHF) en tetrahydrofolate (THF). Ce folate réduit est modifié en 5,10-méthylènetétrahydrofolate pour servir de donneur de carbone dans la synthèse du thymidylate, réaction catalysée par la thymidylate synthase (TS). (**Figure 10**).

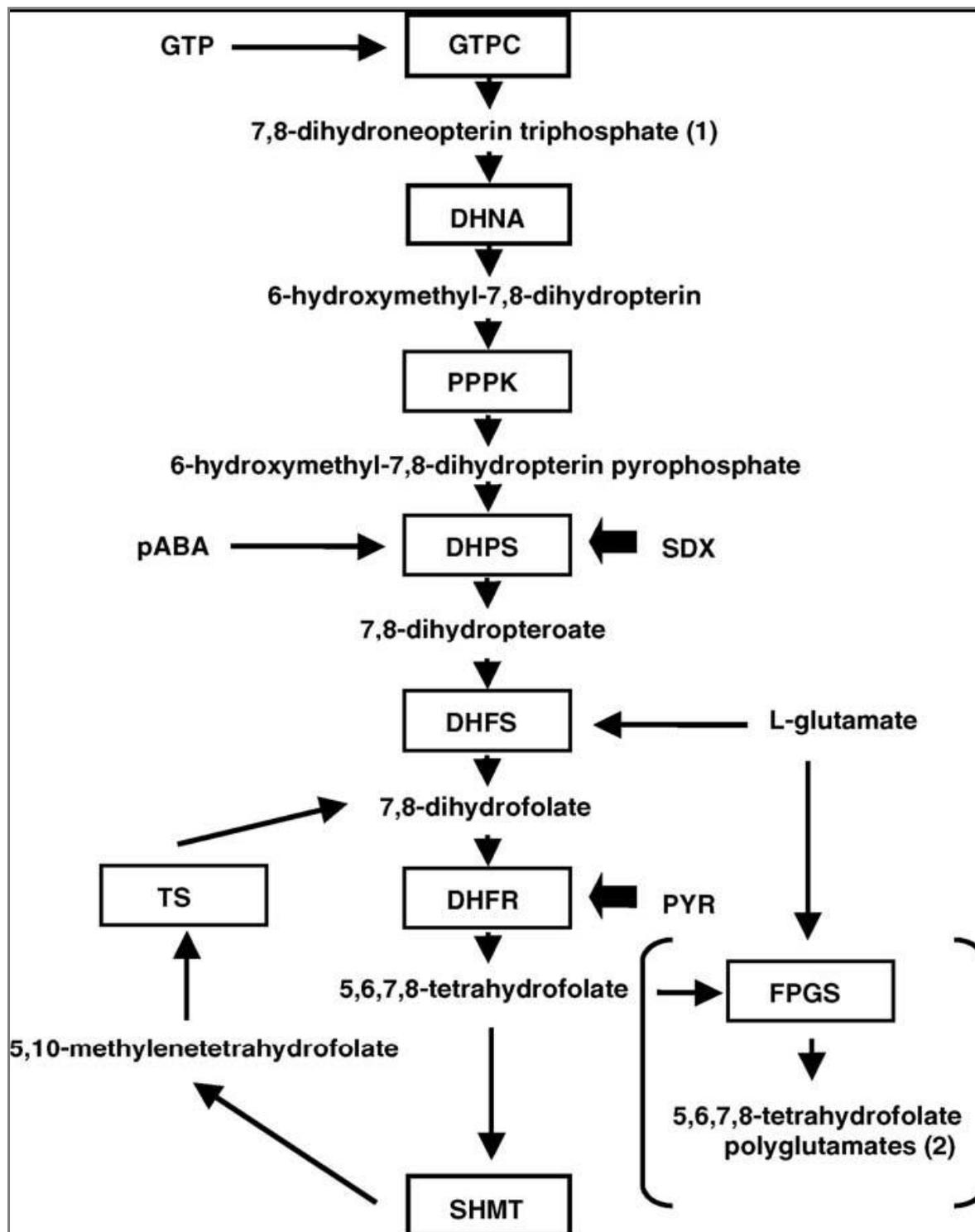


Figure 10. Principales enzymes et substrats de la voie de synthèse des folates (Hyde, 2005).

GTP : Guanosine Triphosphate; GTPC : GTP Cyclohydrolase; DHNA : Dihydroneopterin aldolase; PPPK : Hydroxyméthyl-dihydropterin pyrophosphokinase; DHPS : Dihydroptéorate synthase; DHFS : Dihydrofolate synthase; TS : Thymidylate synthase; DHFR : Dihydrofolate réductase; FPGS : Folylpolyglutamate synthase; SHMT : Serine HydroMethylTransferase.

Au niveau cellulaire, les formes actives de l'acide folique sont les dérivés du DHF et du THF. Les folates intracellulaires des microorganismes et des cellules de mammifères sont principalement sous forme de polyglutamates comprenant dans leur structure 4 à 6 résidus glutamates (Moran, 1999). Cette polyglutamylation est réalisée par la folylpolyglutamate synthase (FPGS), enzyme qui possède des similitudes de séquences avec la DHPS. Les polyglutamates sont mieux retenus que les glutamates dans la cellule et sont de meilleurs substrats et cofacteurs d'enzymes impliquées dans le métabolisme des folates et mieux accumulés dans les mitochondries.

b. La résistance aux inhibiteurs de la synthèse des folates

Les traitements des infections toxoplasmiques reposent principalement sur l'association de la pyriméthamine et d'un sulfamide, qui agissent en synergie afin de bloquer la voie de synthèse des folates par inhibition respective de deux enzymes : la dihydroptéroate synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR). Les mécanismes de résistance aux antifolates chez *T. gondii* sont encore peu décrits dans la littérature.

Aspinall et al. (2002) ont mis en évidence, après séquençage de 32 souches provenant de toxoplasmoses humaines, six mutations sur le gène *dhps*. Une mutation affectant le résidu 407 de la protéine codée par le gène *dhps* a été trouvée sur un isolat clinique, Swa-20, provenant d'une toxoplasmose congénitale n'ayant pas été soumise à un traitement anténatal, suggérant ainsi une résistance intrinsèque de la souche (Aspinall et al., 2002).

Cette même mutation avait également été mise en évidence sur une souche (R-Sul^R-5) rendue résistante *in vitro* au sulfaméthoxazole par mutagénèse dirigée (Pfefferkorn et al., 1992) soulignant l'implication possible de cette mutation dans la résistance aux sulfamides.

Dans le cadre d'une étude précédente réalisée au sein du laboratoire portant sur 20 souches toxoplasmiques, trois nouvelles mutations ont été mises en évidence pour le gène *dhps*: deux silencieuses en position 370 et 654 et une entraînant un changement d'acide aminé (Alanine en Valine) en position 587 trouvée pour une souche (RMS-1995-ABE) isolée d'un placenta. Comme Aspinall et al., aucun polymorphisme entraînant un changement d'acide aminé sur la région codante du gène *dhfr* n'a été retrouvé (Beaumont, 2004).

Devant le manque de données rapportées dans la littérature sur les variations de concentration inhibitrice de 50% (CI₅₀), les niveaux de sensibilité à différents médicaments antitoxoplasmiques (sulfadiazine, pyriméthamine et atovaquone) ont été étudiés sur diverses souches de *T. gondii* en collaboration avec l'équipe du Pr. Derouin (Université Paris VII). Cette étude a permis d'identifier trois souches résistantes *in vitro*, sur cellules MRC-5, à la sulfadiazine chez *T. gondii* parmi 17 souches choisies sur des critères de diversité génomique ou s'accompagnant de signes cliniques. Parmi elles, certaines ont été responsables de toxoplasmose congénitale avec apparition de chorioretinites sous traitement malgré des taux sériques réputés efficaces (**Tableau I**). Des niveaux de CI₅₀ très élevés, supérieurs à 50 µg/ml, sont retrouvés pour la sulfadiazine chez trois souches : deux isolées de placentas lors de toxoplasmoses congénitales (RMS-2001-MAU et RMS-1995-ABE), et une d'un placenta de bovin (B1). Parmi ces trois souches, il est intéressant de noter que seule la souche RMS-1995-ABE avait reçu un traitement *in utero* par pyriméthamine/sulfadoxine pendant la période foetale durant 12 semaines. La moyenne des CI₅₀ des autres souches étant d'environ de 8,7 µg/mL, les différences de niveaux de sensibilité autorisent à parler de résistance *in vitro* pour ces trois souches (Meneceur et al., 2008). Aucune corrélation entre génotype et résistance n'a pu être déterminée.

Souches	Nomenclature CRB	Origine	Type	Clinique	Pyriméthamine	Sulfadiazine	Atovaquone
RH	RH	Humaine	I	Encéphalite	0,1±0,05	6,52±5,09	0,05±0,01
ENT	TgH 00004	Humaine	I	TC	0,34±0,07	4,28±5,55	0,07±0,04
B1	TgA 103001	Animale (bovin)	I		0,35±0,18	>50	0,1±0,03
RMS-1995-ABE	TgH 32006A	Humaine	II	TC, Chorioretinite	0,17±0,06	>50	0,11±0,02
ME-49	ME-49	Animale (ovin)	II		0,09±0,02	6,55±2,76	0,05±0,02
TRS-2004-REV	TgH 39011A	Humaine	II	TC, CIC	0,18±0,02	6,26±7,41	0,07±0,03
TOU-1998-TRI	TgH 38017A	Humaine	II	TC, Chorioretinite bilatérale	0,15±0,11	2,95±1,63	0,07±0,02
RMS-2005-HAG	TgH 32060A	Humaine	II	TC, CIC, Hydrocéphalie, Chorioretinite	0,11±0,04	6,7±1,13	0,04±0,03
GRE-1995-MAE	TgH 17002A	Humaine	II	TC, Hydrocéphalie, TD	0,11±0,10	14,95±7,14	0,03±0,00
PSP-2005-MUP	TgH 29026A	Humaine	III	Encéphalite, VIH+	0,14±0,00	18,8±11,6	0,06±0,02
GRE-1998-TRA	TgH 17009A	Humaine	III	TC	0,39±0,04	16,85±5,87	0,05±0,01
RMS-2003-TOU	TgH 32054A	Humaine	III	TC	Echec	Echec	Echec
NED	TgH 00003	Humaine	III	TC	0,19±0,09	9,25±5,73	0,03±0,01
RMS-1994-LEF	TgH 32005A	Humaine	Atypical	TC, Chorioretinite	0,07±0,00	9,65±5,73	0,04±0,01
RMS-2003-DJO	TgH 32052A	Humaine	Atypical	Encéphalite, VIH+	0,09±0,00	4,9±4,33	0,08±0,02
RMS-2001-MAU	TgH 32045A	Humaine	Atypical, II/I ou II/III	TC, Chorioretinite	0,12±0,08	>50	0,06±0,01

Tableau I. Tableau récapitulatif des 17 souches utilisées par Meneceur et al. (2008)

TC : toxoplasmose congénitale, CIC : calcifications intracrâniennes, TD : toxoplasmose disséminée.

Par analogie avec *Plasmodium* et afin de caractériser les mécanismes de résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii*, les travaux précédents réalisés au sein du laboratoire ont porté sur l'étude des mutations et des variations d'expression des gènes cibles, *dhps* et *dhfr*, ainsi que sur les ABC transporteurs *TgABC.B1*, *TgABC.B2* et *TgABC.C1* entre les souches sensibles et les trois souches de *T. gondii* résistantes à la sulfadiazine. Cependant, aucun phénomène de surexpression ou de mutations de ces gènes n'a pu être relié à la résistance chez *T. gondii* (Schmid, 2008).

Les mécanismes impliqués dans la résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii* ne sont toujours pas décrits à ce jour. Les techniques d'études des gènes et des protéines communes n'ayant pas permis de mettre en évidence chez *T. gondii* les mécanismes de résistance à la sulfadiazine, nous nous sommes intéressés, dans cette étude, à des techniques plus globales et novatrices: la protéomique et la transcriptomique.

La protéomique et la transcriptomique

I. La protéomique : l'ère post-génomique

1) Définition

La protéomique s'intéresse à l'étude du protéome, c'est-à-dire à l'ensemble des protéines constituant un organisme vivant dans sa globalité, un tissu, une cellule ou un compartiment cellulaire à un moment donné. L'approche protéomique vise aussi à établir l'identité, la quantité et la fonction des protéines, et à en déterminer l'expression en fonction des conditions environnementales (Kenyon et al., 2002; Patterson et Aebersold, 2003). Le terme protéomique est récent et a été utilisé pour la première fois en 1997 dans une publication scientifique : « *Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics* » (James, 1997). Il dérive de protéome, terme inventé en 1994, par analogie avec le mot génomique qui dérive lui-même du terme génome représentant l'ensemble des gènes d'un organisme.

L'intérêt pour la protéomique a été renforcé par le séquençage du génome humain (*Human Genome Project*, HGP), débuté dans les années 90 et terminé le 14 avril 2003, ayant permis l'identification d'environ 30 000 gènes. En effet, la connaissance du génome humain ne permet pas de connaître les protéines exprimées dans une cellule à un instant de sa vie et ainsi de répondre aux besoins de biomarqueurs associés aux maladies ou aux phénomènes de résistance et de toxicité liés aux médicaments (Bailey, 2001). Le génome ne représente que le premier niveau de complexité du vivant. Les fonctions biologiques ne sont pas régulées ni médiées par le génome, mais principalement par les protéines qui représentent aussi des cibles médicamenteuses. De plus, le faible nombre de gènes laisse à penser que la complexité des différents organismes va être induite par une variation de l'expression des protéines. Cependant la complexité de ces systèmes biologiques ne repose pas uniquement sur l'expression des gènes codants pour les diverses protéines, mais aussi sur leur quantité, les modifications post-traductionnelles, l'épissage différentiel ainsi que les interactions des protéines entre elles expliquent entre autre la complexité de ces systèmes biologiques (**Figure 11**).

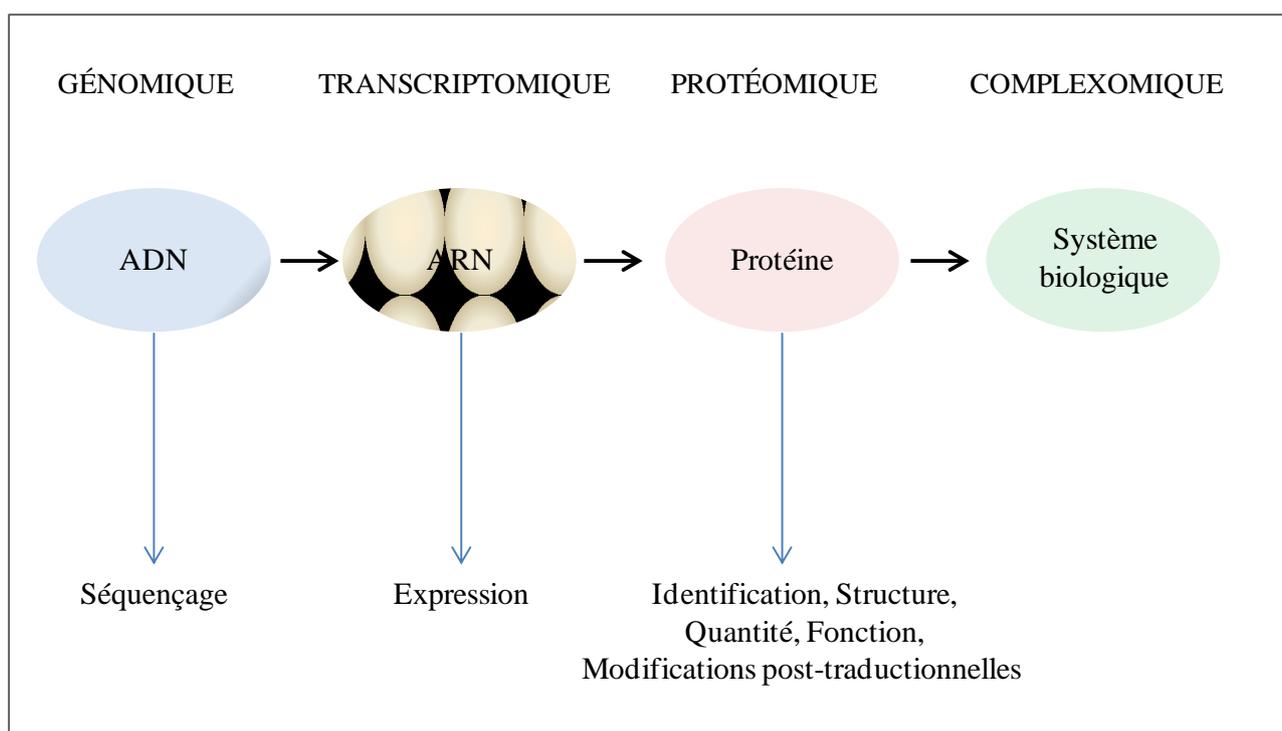


Figure 11. De la génomique à la protéomique (d'après Patterson et Aebersold, 2003)

En effet, à un génome ne correspond pas un unique protéome mais une myriade de protéomes. C'est ainsi que la chenille et le papillon qui possèdent un génome identique et se distinguent uniquement par la sélection des protéines exprimées ou non sont devenus l'emblème de la protéomique : au cours du développement, les cellules d'un individu avec le même génome sont capables de se différencier en différents types tissulaires par l'expression de protéomes caractéristiques (Lottspeich, 1999).

On distingue classiquement deux types d'analyse protéomique, d'une part l'approche descriptive qui consiste à identifier des protéines présentes à un moment donné, dans un compartiment cellulaire donné, et d'autre part l'approche différentielle dont l'objectif est de quantifier les variations protéiques entre deux états distincts (malade/sain, résistant/sensible, traitement/pas de traitement...). Ces deux approches sont complémentaires et permettent d'obtenir une vision globale de la physiologie du système biologique étudié.

2) La protéomique descriptive

La protéomique descriptive permet d'établir des cartographies ou des listes exhaustives de protéines donnant une vision globale du protéome de l'échantillon biologique étudié. La méthode la plus fréquemment utilisée pour séparer les protéines d'un mélange complexe est l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) (**Figure 12**).

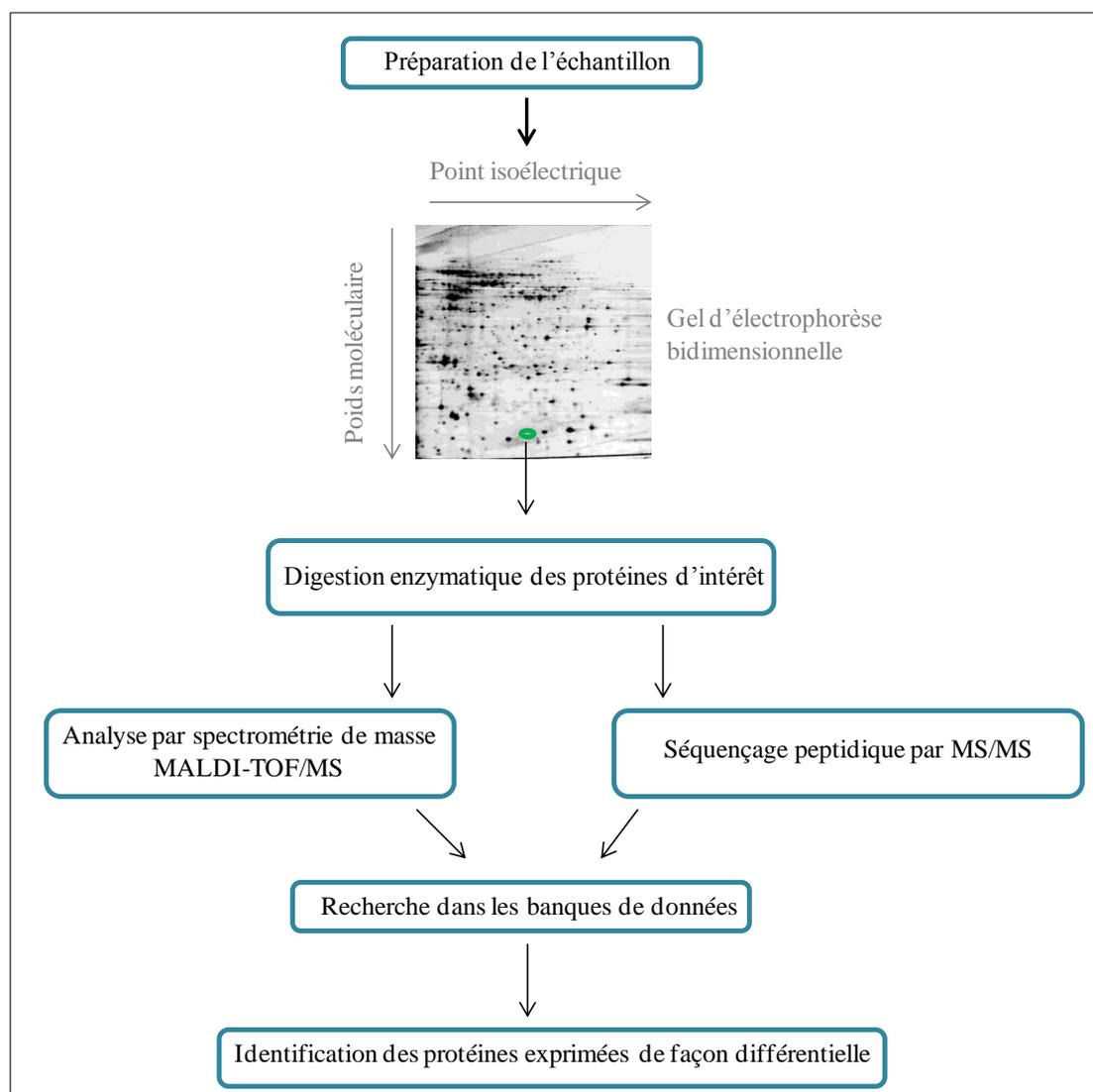


Figure 12. Représentation schématique de l'approche protéomique descriptive

Cette technique, introduite par O'Farrell en 1975, a longtemps été l'unique méthode d'analyse globale du protéome. La 2-DE permet de fournir une carte protéique où chaque protéine apparaît sous la forme d'une tache ou « spot » suite à la séparation d'un échantillon protéique en

deux dimensions. Les protéines sont, dans un premier temps, séparées en fonction de leur charge globale nette (première dimension), puis dans un second temps, en fonction de leur poids moléculaire (deuxième dimension). Après coloration des gels, les spots protéiques d'intérêt sont sélectivement prélevés puis analysés par spectrométrie de masse après digestion trypsique des protéines directement dans les pièces de gel. La détection des protéines moins abondantes dépend de la méthode de révélation employée. Les colorations à l'argent et fluorescentes sont les plus sensibles et permettent de détecter jusqu'à 0,5 ng de protéine par spot protéique (Rabilloud, 2012). La 2-DE est une approche puissante, permettant de séparer plusieurs milliers de protéines sur un gel. Toutefois, elle présente un certain nombre de limites : la technique est difficile à reproduire, la détection de protéines ayant un pI ou un poids moléculaire extrême est limitée, de même que les protéines hydrophobes ou membranaires. En revanche, la 2-DE reste une méthode particulièrement efficace pour différencier les isoformes protéiques ainsi que les protéines présentant des modifications post-traductionnelles.

D'autres techniques ont également été développées par la suite afin de pouvoir identifier un plus grand nombre de protéines (méthode MudPIT, séparation par LC-MS/MS, Off-Gel IEF).

3) La protéomique différentielle

La 2-DE est une méthode puissante de séparation des protéines. Cependant, la grande variabilité inter-gels liée au système, rendant difficile la comparaison des cartes protéiques entre elles, a limité son utilisation en protéomique quantitative, jusqu'à la mise au point de la technologie DIGE (Difference In Gel Electrophoresis) par Unlü et al. en 1997 (**Figure 13**) (Unlü et al., 1997).

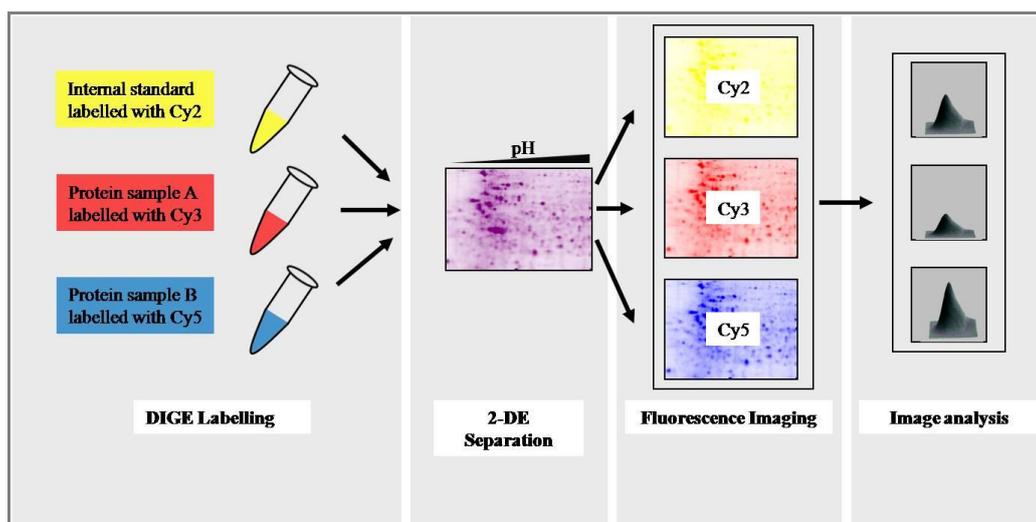


Figure 13. Représentation schématique de la technique DIGE

La DIGE permet de séparer plusieurs échantillons protéiques à comparer sur un même gel bidimensionnel. Ceci est rendu possible par le marquage de chacun des échantillons à l'aide de fluorophores, les cyanines Cy2, Cy3 et Cy5, de taille et de charge similaires mais de propriétés spectrales distinctes. La DIGE implique l'utilisation d'un échantillon de référence, le standard interne, constitué d'un mélange d'une portion égale de chaque échantillon de l'expérience. Le standard interne, marqué à la Cy2, est inclus dans tous les gels 2D de l'expérience, par co-migration avec 2 échantillons respectivement marqués par les Cy3 et Cy5. Le standard interne permet ainsi de comparer entre eux tous les gels de l'expérience. Par gel, 3 images parfaitement superposables sont obtenues grâce à un scanner de fluorescence. L'abondance de chaque spot protéique sur un gel est mesurée relativement à celle du spot correspondant dans le standard interne présent sur le même gel (Marouga et al., 2005). La DIGE est la seule technique permettant la quantification relative des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.

D'autres techniques permettent également la quantification de protéines, par spectrométrie de masse, grâce à un marquage isotopique ou la quantification directe sans marquage, dite *label-free* (comptage de spectres, indice d'abondance protéique).

4) Les modifications post-traductionnelles

Une modification post-traductionnelle est une modification chimique ou biologique d'une protéine s'accompagnant le plus souvent d'un changement de la fonction de la protéine. Plus de 300 MPTs ont été répertoriées à ce jour, parmi lesquelles la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la palmitoylation, la sulfatation, l'oxydation, etc. L'exemple le plus connu de modifications complexes est le code des histones : en effet différents acides aminés des histones sont précisément méthylés, acétylés, phosphorylés et ubiquitinés, ce qui module leur interaction avec les acides nucléiques et d'autres protéines régulatrices. La spectrométrie de masse est aujourd'hui l'outil de choix pour identifier les MPTs.

5) Protéomique et Spectrométrie de masse

L'identification en masse des protéines est l'étape cruciale de toute approche protéomique. La spectrométrie de masse permet, en effet, de répondre à de nombreuses questions biologiques en identifiant les protéines mais également en les caractérisant (modifications post-traductionnelles, chimiques, mutations d'acides aminés, etc). Les techniques d'ionisation MALDI et ESI couplées à des analyseurs de plus en plus résolutifs et de plus en plus sensibles permettent l'analyse de quantités très faibles (quelques femtomoles à subfemtomoles) de protéines (Aebersold et Mann, 2003).

II. Protéomique et résistance chez les protozoaires

Il est possible par une approche protéomique de s'intéresser aux effets d'agents pharmacologiques et le cas échéant aux mécanismes de résistance du parasite, mais également de définir des marqueurs immunologiques induits par l'infection parasitaire pouvant servir à terme au développement de tests diagnostiques ou de cibles thérapeutiques ou vaccinales. Dans cette partie nous nous intéresserons à l'utilisation des techniques de protéomique appliquées à la compréhension des mécanismes de résistance médicamenteuse chez les parasites.

1) Protéomique et résistance chez *Leishmania spp*

L'étude des mécanismes de résistance médicamenteuse chez *Leishmania spp* fait l'objet de nombreuses publications scientifiques. Chez *Leishmania major*, une comparaison quantitative du protéome d'une souche sensible versus résistante au méthotrexate (MTX), a permis à Drummelsmith et al., d'identifier une nouvelle cible de ce médicament, la ptéridine réductase PTR1. Une mutation du gène *ptr1* induit une surexpression de la protéine responsable du phénomène de résistance (Drummelsmith et al., 2003). De plus, l'analyse protéomique comparative de souches de *L. major* présentant un niveau de sensibilité élevé au MTX et de souches de terrain, a montré une implication d'autres protéines dans le développement de la résistance au MTX : la Méthionine Adénosyltransférase et la S-Adénosylméthionine (Drummelsmith et al., 2004).

Vergnes et al. ont utilisé la 2-DE afin de comparer les protéomes de souches de terrain de *L. donovani* sensibles et résistantes à l'antimoine pentavalent (Sb^{V}). Onze protéines ont présenté des niveaux d'expression différents entre les souches. Parmi ces protéines, il a été rapporté le rôle de hsp83, 14-3-3 protein et SKCRP14.1 dans le programme de mort cellulaire (PCD, *program cell death*) chez de nombreux organismes, suggérant que le PCD est altéré dans les souches résistantes (Vergnes et al., 2007). La comparaison des protéomes, par électrophorèse bidimensionnelle, de souches sensibles et résistantes à l'antimoine trivalent (Sb^{III}) chez *Leishmania* a permis d'identifier des facteurs associés à la résistance à l'antimoine. Neuf protéines exprimées différemment entre les souches sensibles et résistantes à Sb^{III} ont pu être identifiées par spectrométrie de masse et classées en deux groupes distincts : i) les protéines du stress et ii) les protéines impliquées dans le transport et le métabolisme. Ces deux groupes peuvent être directement reliés aux mécanismes de résistance à l'antimoine. De plus, la surexpression de deux enzymes, la S-adénosylméthionine et la S-Adénosylhomocystéine hydrolase, impliquées dans le métabolisme des thiols, renforcent l'importance de ce métabolisme dans la résistance à l'antimoine chez *Leishmania* (Walker et al., 2012). La technique *iTRAQ* (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) suivie d'une analyse par spectrométrie de masse a permis à Biyani et al., d'identifier un grand nombre de protéines surexprimées dans les souches résistantes à l'antimoine parmi lesquelles les protéines impliquées dans la glycolyse, le stress oxydatif et la survie intracellulaire du parasite (Biyani et al., 2011).

L'approche protéomique a également permis à Singh et al. d'évoquer l'implication du facteur d'initiation eIF4 dans la résistance de *Leishmania* à la Miltéfosine (Singh et al., 2008).

En utilisant la technique *SILAC* (*Stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell culture*) suivie d'une analyse par LC-MS/MS, Chawla et al. ont pu mettre en évidence une surexpression de protéines impliquées dans la survie intracellulaire et le trafic vésiculaire dans les souches résistantes à la paromomycine chez *L. donovani*, et ainsi proposer un modèle de mécanisme de résistance à la paromomycine chez *L. donovani* (**Figure 14**) (Chawla et al., 2011).

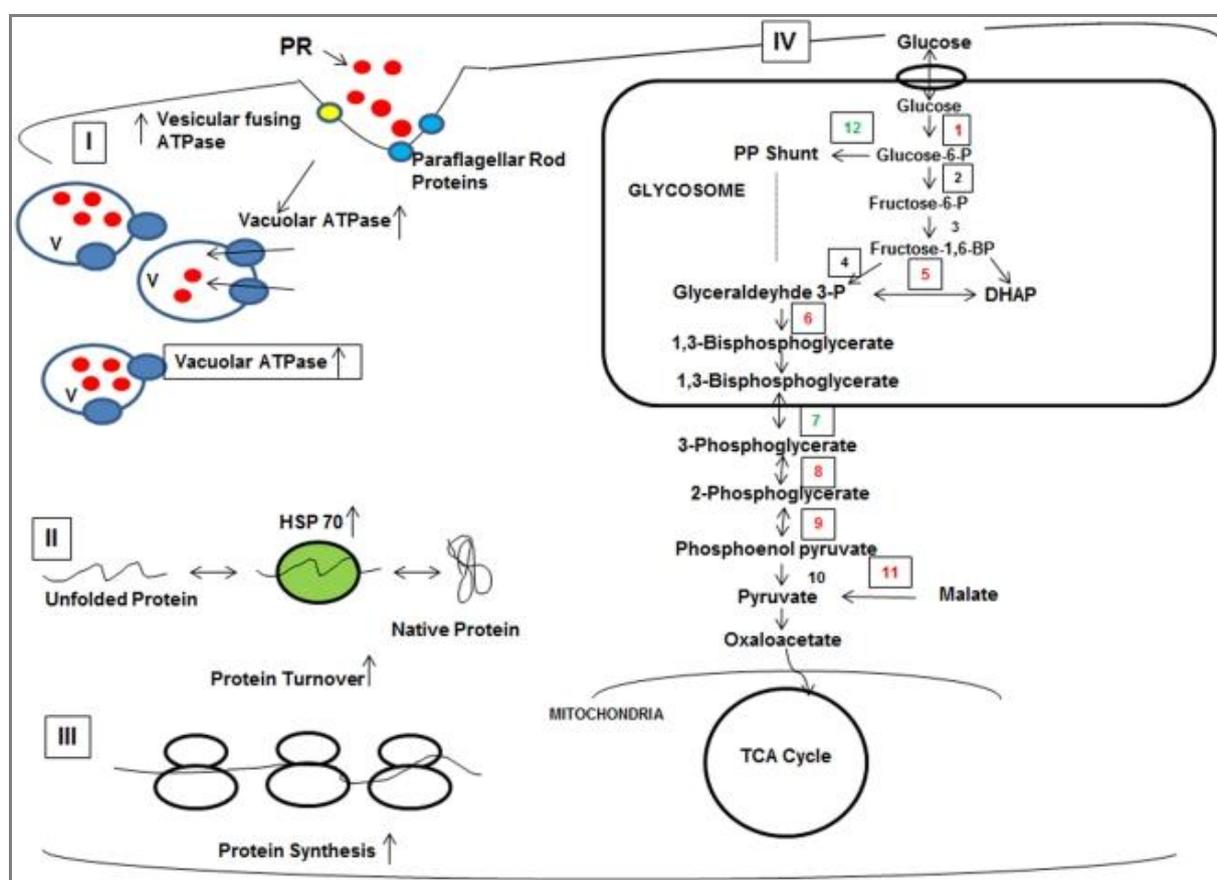


Figure 14. Proposition d'un modèle de mécanisme de résistance à la paromomycine chez *L. donovani* (Chawla et al., 2011)

(I) La paromomycine (PR, cercles rouges) interagit avec les protéines paraflagellaires Rod (bleu) et la prefoldine (jaune) puis pénètre dans le parasite par endocytose avant d'être séquestrées dans les vacuoles. Une surexpression des pompes vacuolaires ATPases et une augmentation du nombre de vacuoles a été observé dans les souches résistantes. (II) Les protéines chaperonnes se trouvent surexprimées dans les cellules résistantes à la suite du stress causé par la paromomycine, celles-ci

sont également impliquées dans le renouvellement des protéines. (III) La surexpression d'un grand nombre de protéines ribosomales induit une augmentation de la synthèse des protéines totales. (IV) Une importante augmentation de la glycolyse a également été observée. Les protéines marquées en rouge représentent les protéines sur-régulées et celles marquées en vert représentent les protéines sous-régulées dans les souches résistantes à la paromomycine. (1) hexokinase, (2) phosphoglucose isomérase, (3) phosphofructokinase, (4) aldolase (5) triose phosphate isomérase, (6) glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, (7) phosphoglycérate kinase, (8) 2,3-bisphosphoglycérate-phosphoglycérate mutase indépendante, (9) enolase, (10) pyruvate kinase, (11) enzyme malique, (12) glucose-6-phosphate déshydrogénase.

2) Protéomique et résistance chez *Plasmodium falciparum*

Afin de comprendre le mécanisme d'action de la doxycycline chez *P. falciparum*, deux approches protéomiques complémentaires, la 2D-DIGE et l'iTRAQ, ont été utilisées. Les protéomes de souches exposées ou non à la doxycycline ont ainsi été analysées. Les résultats montrent que 32 protéines présentant des différences d'expression entre les souches exposées ou non à la doxycycline ont été identifiées par 2D-DIGE et 40 protéines par iTRAQ. Six protéines dont la S-adénosylméthionine synthase et la 1-Cis peroxyredoxine, identifiées par 2D-DIGE ont également été identifiées par iTRAQ, toutes ces protéines présentent des modulations d'expression similaires entre les deux techniques. Une majorité de protéines, présentant une variation des niveaux d'expression telles que 1- et 2- Cis peroxyredoxine, a déjà été décrite dans la littérature comme étant liée à la résistance médicamenteuse chez *Plasmodium* (Briolant et al., 2010).

Une analyse comparative par 2-DE de protéomes de souches sensibles et résistantes à la chloroquine, et d'une souche cultivée en présence de chloroquine à la CI_{50} suggère que la chloroquine provoque un stress oxydatif des souches de *Plasmodium* (Radfar et al., 2008). L'analyse, par SELDI-TOF, de protéomes de groupes de souches sensibles et résistantes à la chloroquine a permis d'identifier 10 protéines pouvant potentiellement être utilisées comme marqueurs de résistance à la chloroquine (Koncarevic et al., 2007).

3) Protéomique et résistance chez *Trypanosoma spp.*

Chez *Trypanosoma brucei*, l'analyse comparative par 2-DE de protéines issues de lignées sensibles (386) et résistantes (386Mr) au Cymelarsan[®], a permis l'identification d'une protéine, NAC (*Nascent polypeptide Associated Complex subunit*) présente dans la lignée sensible 386 mais absente de la lignée résistante 386Mr. Afin de visualiser les différents isoformes de cette protéine, un western blot a été réalisé sur gel 2-DE et a ainsi permis de détecter la présence de trois isoformes de la protéine NAC dans la population sensible 386 alors qu'un seul isoforme de NAC a été observé dans la population résistante 386Mr (Foucher et al., 2006).

Chez *Trypanosoma cruzi*, une analyse protéomique a été réalisée afin de comprendre les mécanismes de résistance au Benznidazole (BZ). Pour cela, les protéomes de populations résistantes (BZR) et sensibles (BZS) *in vivo* au BZ et de populations rendues résistantes au BZ *in vitro* (17LER) et de la souche parentale sensible au BZ (17WTS) ont été comparés par 2-DE. L'identification des 56 protéines d'intérêt par spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence 10 protéines pouvant devenir de nouvelles cibles médicamenteuses dans la maladie de Chagas (Andrade et al., 2008).

III. Protéomique chez *T. gondii*

Si rien n'a été décrit sur l'approche par protéomique des mécanismes de résistance chez le toxoplasme, plusieurs études de protéomique subcellulaire ont été réalisées sur ce pathogène. En effet, l'identification et la caractérisation de la fonction des protéines chez *T. gondii* a été au centre des travaux de nombreuses équipes de recherche depuis le développement de techniques novatrices qui ont permis l'étude génomique et moléculaire de *T. gondii*. Parmi ces thèmes de recherche, de nombreuses études ont porté sur les mécanismes d'invasion de l'hôte, la structure et la composition des organelles, l'interconversion tachyzoïtes/bradyzoïtes et l'organisation du cytosquelette (Weiss et al., 2009).

Les premières analyses protéomiques de *T. gondii* ont permis de cartographier le protéome du parasite, et d'identifier de nombreuses protéines par spectrométrie de masse : Jungblut et al. ont

réalisé une cartographie de 300 spots protéiques parmi lesquels 7 protéines ont été retenues comme marqueurs de diagnostic par immunoblot de sérums de patients (Jungblut et al., 1999); Cohen et al. ont permis la cartographie d'environ 1 000 polypeptides parmi lesquels 71 protéines ont pu être identifiées par MALDI-MS (Cohen et al., 2002). En utilisant l'A23187, Kawase et al. ont stimulé la sécrétion de protéines dépendante du Ca^{2+} , telles que les micronèmes, puis a réalisé une analyse comparative des protéomes de tachyzoïtes de *T. gondii* traités avec de l'A23187 et du DMSO. Sept protéines ont montré une augmentation de leur expression : MIC2, MIC4, MIC6, MIC10, AMA1, ROP9 et TgSPATR (Kawase et al., 2007).

Dans une étude globale des protéines de *T. gondii* permettant d'identifier 2252 protéines, seulement 626 avaient un marqueur de séquence (EST), 1131 ont été retrouvées par microarrays et 72 n'avaient pas de transcription démontrée. Ceci suggère que l'analyse protéomique permet d'identifier les gènes exprimés qui sont «manqués» par l'analyse de transcription conventionnelle (Xia et al., 2008). Des observations similaires ont d'ailleurs été observées dans les cellules de mammifères (Cox et Mann, 2007). Les différences entre les gènes exprimés identifiés par la protéomique et la transcription sont peut-être dûes à des mécanismes de contrôles post-traductionnels, ainsi que le « *stock-and-go* » hypothèse décrite chez *Plasmodium* (Mair et al., 2006). En effet, les méthodes de protéomique ne permettent pas détecter tous les gènes exprimés.

L'approche protéomique a également montré sa puissance dans la description des protéines des rhoptries. Bradley et al. ont développé une méthode performante permettant de purifier les rhoptries. En effet, les protéines ROP sont difficiles à étudier en protéomique en raison de leur nature hydrophobe. Un total de 38 protéines non identifiées précédemment a été détecté après 1D-LC-MS/MS. Une combinaison d'approches dont l'étiquetage d'épitopes a ensuite permis de déterminer la localisation des protéines identifiées et de proposer la production d'anticorps contre des peptides et des protéines recombinantes. Parmi les 13 protéines pour lesquelles des antisérums ont été produits, 12 sont localisées dans les ROPs. Plusieurs protéines ont été identifiées dans la fraction des rhoptries (famille des ROP et des RON): ROP1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 et 16, RON1, R2, R3, R4, Toxofilin, et Rab11. Une découverte majeure de cette analyse protéomique a été la reconnaissance de protéines RON intervenant dans la formation de la jonction mobile lors de l'invasion de la cellule hôte (Bradley et al., 2005). El Hajj et al. ont utilisé la technique

d'immunoprécipitation couplée à l'analyse MS pour identifier et caractériser les protéines de la famille ROP2 : ROP2, 4, 5 et 7 (El Hajj et al., 2006).

L'analyse des protéines de *T. gondii* par 2-DE a montré la présence de complexes isoformes pour de nombreuses protéines, suggérant ainsi l'importance de modifications post-traductionnelles dans la biologie du parasite. Fauquenoy et al. ont ainsi montré, par analyses protéomiques et glycomiques, que de nombreuses protéines clés dans l'interaction hôte-parasite, dont la protéine TgGAP50 associée à la motilité ou « *gliding* » du parasite, subissaient des N-glycosylations du type oligomannosidique ($\text{Man}_{5-8}(\text{GlcNAc})_2$) et paucimannosidique ($\text{Man}_{3-4}(\text{GlcNAc})_2$) (Fauquenoy et al., 2008). Par la suite, l'étude de la protéine TgGAP50 a permis de montrer que ces N-glycosylations jouaient un rôle important dans la motilité et la pénétration du parasite dans la cellule hôte (Fauquenoy et al., 2011). L'approche protéomique a également été utilisée pour définir la présence de SUMOylation (*Small Ubiquitin-like Modifier*) chez *T. gondii*. En utilisant des parasites présentant une étiquette FLAG pour les protéines SUMOylées et une chromatographie d'affinité contenant une résine anti-FLAG, un total de 120 protéines ont été identifiées. Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses catégories biologiques : machinerie transcriptionnelle, biosynthèse des ribosomes, traduction, protéines des rhoptries et protéines du stress. Les protéines SUMOylées ont également été retrouvées dans la membrane de la vacuole parasitophore du bradyzoïte, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Braun et al., 2009).

Jusqu'à ce jour, aucune étude de protéomique n'a été réalisée sur la résistance chez *T. gondii*.

IV. La transcriptomique

La transcriptomique est l'étude de l'ensemble des ARN messagers (ARNm), également appelés transcrits, présents dans une population à un instant donné. Elle repose sur la quantification systématique des ARNm, ce qui permet d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données. Plusieurs techniques permettent d'avoir accès à cette information et en particulier celle des puces à ADN.

Les puces à ADN, également appelées *DNA arrays*, *DNA chips*, *DNA micro-arrays* ou *micro-arrays*, ont été développées au début des années 1990 et connaissent depuis un essor important. En effet, elles permettent de mesurer simultanément et quantitativement l'expression de plusieurs milliers de gènes, voire un génome entier, à partir d'un support solide de taille réduite. Depuis leur apparition, les puces à ADN sont devenues des outils majeurs pour la recherche en biologie fondamentale et clinique.

Le principe de fonctionnement des puces à ADN repose sur la propriété d'hybridation spécifique entre deux séquences complémentaires d'acides nucléiques. Une puce à ADN est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement s'inspire de technologies telles que le *Southern blot* ou le *Northern blot*, qui sont couramment utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence nucléique spécifique au sein d'un échantillon biologique complexe, par hybridation à une sonde de séquence complémentaire portant un marquage radioactif (**Figure 15**).

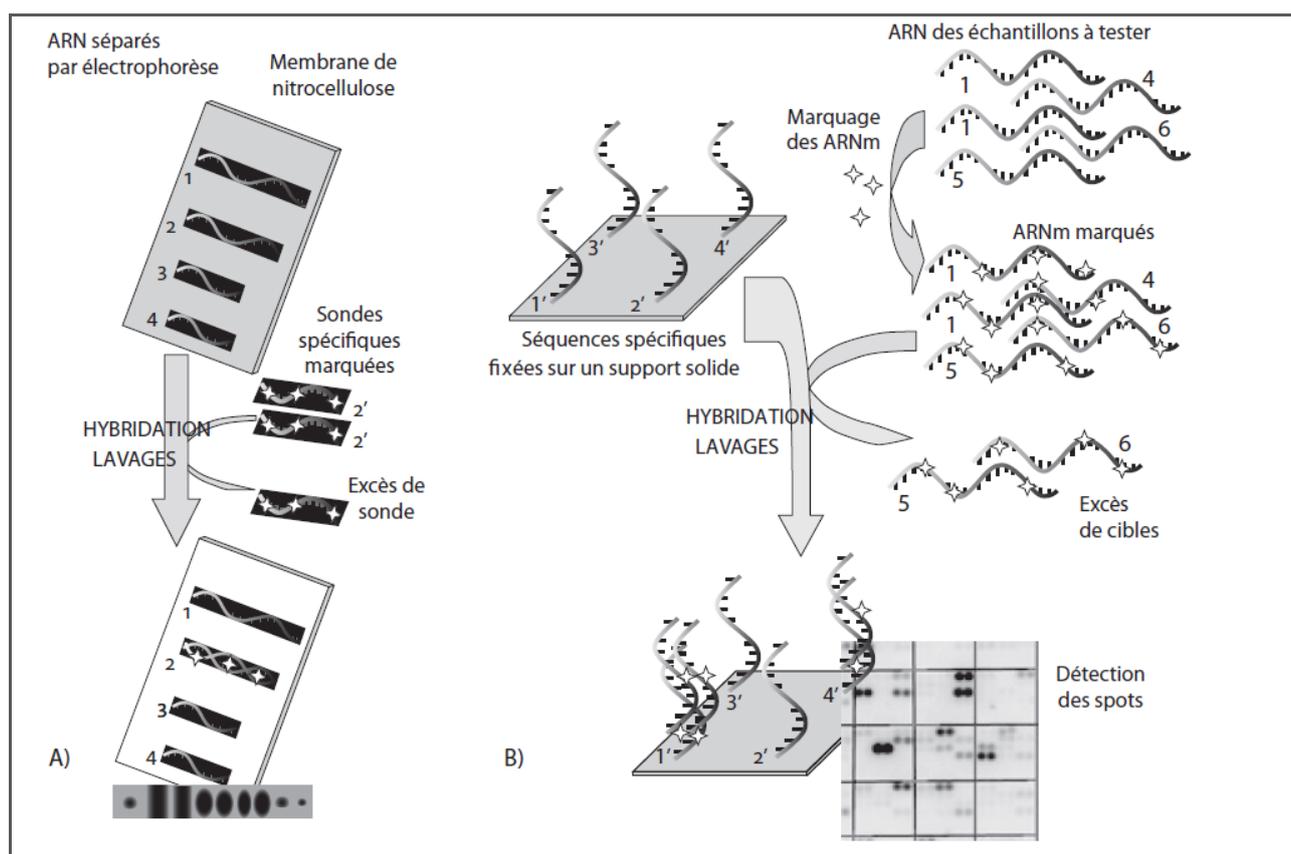


Figure 15. Comparaison entre les techniques de *Northern Blot* (A) et puces à ADN (B)

La confection des puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée de milliers de séquences en parallèle. Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « spots », chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience.

Les puces à ADN représentent aujourd'hui un outil de choix dans l'étude des mécanismes de résistance médicamenteuse. Cette technique a été utilisée dans différentes études de la résistance, incluant le contrôle de l'expression génique chez *C. albicans* sélectionné *in vitro* pour la résistance au fluconazole ou l'amphotéricine B (Barker et al., 2004), mais également chez de nombreuses espèces de bactéries (Mongodin et al., 2003; Haas et al., 2005).

Chez *Leishmania*, l'utilisation de puces à ADN a permis de mettre en évidence la surexpression du gène de la S-adénosylhomocystéine hydrolase dans les souches résistantes à l'antimoine (Guimond et al., 2003), mais également la surexpression de la folylpolyglutamate synthase (FPGS) et de l'ABC transporteur MRPA dont la transfection a conféré une résistance au sodium stiboglutamate, drogue utilisée dans le traitement des Leishmanioses (El Fadili et al., 2005). Enfin, la synthèse de puces à ADN ciblant la famille des ABC transporteurs chez *Leishmania* a permis à Leprohon et al., de mettre en évidence la surexpression de trois gènes codant pour les ABC transporteurs, ABCA3, ABCC3 et ABCH1, dans deux souches résistantes à l'antimoine. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCRq (Leprohon et al., 2006).

Chez *Plasmodium falciparum*, l'étude de parasites mutants résistants, sélectionnés *in vitro* par culture en présence de dihydroartémisine, a permis de mettre en évidence, par utilisation de puces à ADN, la surexpression de *pfmdr1* et de plusieurs protéines chaperonnes. En absence de pression médicamenteuse, la résistance de cette souche est réversée et la surexpression de *pfmdr1* n'est pas conservée (Cui et al., 2012).

Chez *Toxoplasma*, à ce jour, rien n'a été décrit sur l'utilisation des puces à ADN dans l'étude des mécanismes de résistance médicamenteuse, malgré le développement récent d'une puce à ADN pour le parasite *Toxoplasma* par la société Affymetrix et l'équipe du Pr D. Roos (Université de Pennsylvanie, USA).

L'objectif de ce travail de thèse a été de réaliser une étude des mécanismes de résistance à la sulfadiazine chez *Toxoplasma gondii* par une approche protéomique et une approche transcriptomique afin de mettre en évidence la ou les protéine(s)/gène(s) impliqué(e)s dans les mécanismes de résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii*.

Dans une première partie, nous avons confirmé de précédents résultats obtenus au laboratoire quant à l'implication des gènes cibles des inhibiteurs de la synthèse des folates *dhps* et *dhfr*, et sur trois gènes de protéines ABC transporteurs *TgABC.B1*, *TgABC.B2* et *TgABC.C1* dans les mécanismes de résistance chez *T. gondii* et étendre l'analyse à un autre ABC transporteur toxoplasmique, *TgABC.C2*.

Dans une seconde partie, nous avons comparé par 2D-DIGE les protéomes de souches de *T. gondii* sensibles et naturellement résistantes à la sulfadiazine afin d'identifier une ou plusieurs protéines impliquées dans la résistance médicamenteuse.

Dans une troisième partie, nous avons 1) développé un test de chimiosensibilité permettant de déterminer les niveaux de sensibilité à la sulfadiazine des souches étudiées sur notre modèle cellulaire ; 2) à partir de deux souches de référence RH et ME-49, obtenu *in vitro* par pression médicamenteuse croissante deux souches de *T. gondii* résistantes à la sulfadiazine.

Dans une quatrième partie, nous avons mis en évidence par 2-DE les protéines différentiellement exprimées entre souches sensible et résistantes (naturelle et induite) à la sulfadiazine par 2DE.

Enfin, dans une cinquième partie, nous avons comparé les transcriptomes de souches sensible et résistante induite à la sulfadiazine chez *T. gondii* par l'utilisation de puces à ADN.

Matériel et méthodes

Partie I. Cultures cellulaires

I. Origine et caractéristiques des souches de *T. gondii* utilisées

Toutes les souches utilisées, lors de cette étude, proviennent du Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma* (CRB *Toxoplasma*, France).

1) Souches sensibles à la sulfadiazine

La souche **RH** a été isolée aux Etats-Unis en 1939 chez un enfant de six ans mort d'encéphalite. L'inoculation à des souris du surnageant de broyats de cerveau a provoqué la mort des souris entre le 17ème et le 21ème jour. De nouvelles souris infestées avec des broyats d'organes d'animaux morts ont survécu sept à huit jours. Depuis 1939, la souche RH a fait l'objet de multiples passages intrapéritonéaux de tachyzoïtes chez la souris, tous les trois à quatre jours. Cette souche de référence de génotype I est utilisée dans de nombreux travaux réalisés sur *T. gondii* et a été décrite comme sensible aux sulfamides avec une CI_{50} égale à 6,5 $\mu\text{g/mL}$ pour la sulfadiazine sur cellules fibroblastiques MRC-5 (Meneceur et al., 2008).

La souche **ENT** a été isolée à Strasbourg en 1989 à partir d'un placenta à la naissance sans transmission congénitale à l'enfant. C'est une souche virulente de génotype I décrite comme sensible aux sulfamides avec une CI_{50} égale à 4,3 $\mu\text{g/mL}$ pour la sulfadiazine sur cellules fibroblastiques MRC-5 (Meneceur et al., 2008).

La souche **ME-49** a été isolée en France à partir d'un placenta d'ovin. L'inoculation des broyats d'organes entraîne chez les souris inoculées une ascite discrète. Les souris survivent sans manifestation clinique et produisent des kystes. C'est une souche de référence de génotype II également utilisée dans de nombreux travaux sur *T. gondii* et décrite comme sensible aux sulfamides avec une CI_{50} égale à 6,5 $\mu\text{g/mL}$ pour la sulfadiazine sur cellules fibroblastiques MRC-5 (Meneceur et al., 2008).

La souche **PRU** a été isolée à Limoges en 1964 et est issue d'organes d'un enfant mort de toxoplasmose congénitale à l'âge de neuf jours (Martrou et al., 1965). C'est une souche de génotype II sensible aux sulfamides (donnée non publiée).

2) Souches résistantes à la sulfadiazine

Les souches TgH 32006, TgH 32045 et TgA 103001 (précédemment décrites respectivement comme RMS-1995-ABE, RMS-2001-MAU et B1), ont été décrites comme des souches résistantes, présentant des niveaux de sensibilité aux sulfamides différents des souches RH et ME-49 (Meneceur et al., 2008). En effet, elles sont caractérisées par des CI_{50} supérieures à 50 $\mu\text{g/mL}$ pour la sulfadiazine sur cellules MRC-5, contrairement à l'ensemble des souches actuellement testées qui présentent une CI_{50} moyenne de 8,7 $\mu\text{g/mL}$.

La souche **TgH 32006 (RMS-1995-ABE)**, souche de type II, a été isolée à Reims en 1995 d'un placenta. Le diagnostic de toxoplasmose congénitale a été posé en période anténatale sur l'amniocentèse et avait donné lieu à un traitement *in utero* par pyriméthamine/sulfadoxine des deux fœtus pendant 12 semaines. Les deux enfants ont présenté des lésions de chorioretinite durant leur première année de vie malgré un traitement anti-toxoplasmique bien conduit. Des rechutes de chorioretinites ont eu lieu ensuite pour l'une des deux jumelles. La souche isolée de liquide amniotique a été perdue.

La souche **TgH 32045 (RMS-2001-MAU)** a été isolée à Reims en 2001 d'un placenta, secondairement à une séroconversion maternelle de fin de grossesse (9^{ème} mois), n'ayant pas donné lieu à un diagnostic anténatal et avec absence de traitement par pyriméthamine/sulfadoxine durant la grossesse. Cette souche a été responsable d'une toxoplasmose congénitale avec secondairement une chorioretinite chez l'enfant. Cette souche provoque une mortalité rapide chez les souris lors de son isolement, fait inhabituel. Elle a été phylogénétiquement incluse dans le cluster de type II en raison de ses caractéristiques génétiques de type II (Ajzenberg et al., 2004), c'est une souche de type II variant.

La souche **TgA 103001 (B1)** est isolée sur un fœtus de bovin portugais (Canada et al., 2002). C'est une souche de type I virulente pour la souris.

II. Culture cellulaire et parasitaire

1) Culture cellulaire

a. Lignée cellulaire Vero

La lignée cellulaire Vero a été isolée à partir de cellules épithéliales de rein de singe vert d'Afrique (*Cercopithecus aethiops*) et est répertoriée par l'ATCC sous la référence CCL-81. La lignée a été développée le 27 Mars 1962 par Y. Yasumura et Y. Kawakita à l'Université de Chiba (Japon). La lignée cellulaire Vero tient son nom de l'acronyme « *Verda Reno* » qui signifie « rein vert » en espéranto. Les cellules Vero sont des cellules adhérentes de forme fusiforme qui prolifèrent en formant un tapis cellulaire. Cette lignée est très utilisée en virologie et en recherche clinique pour le développement de vaccin. De plus, il a été montré que les cellules Vero étaient un excellent hôte pour la multiplication rapide des tachyzoïtes de *T. gondii* (Saadatnia et al., 2010). Pour notre étude, le choix du modèle Vero s'est imposé en raison de la grande quantité de parasites récoltée (exemple de quantité de RH récolté pour un flacon de culture de 25 cm², 6 millions sur cellules myéломocytaires humaines THP-1 et 150 millions sur cellules Vero).

b. Entretien des cellules Vero

Les cellules sont cultivées en milieu IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen, France*) contenant une source de glutamine stabilisée, le Glutamax[®], et additionné de 5% de Sérum de Veau Fœtal (Biowest, France) préalablement décomplémenté (30 min à 56°C) et filtré, et additionné de 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine) (Invitrogen, France). Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture de 25 cm² (Nunc, Dutscher, France) sous un volume de 5 mL de milieu complet à une densité initiale de 16 000 cellules/cm². Les cultures sont maintenues dans une étuve sous atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂. Un entretien est effectué lorsque les cellules arrivent à 90 % de confluence, les cellules subissent alors un « passage ». Elles sont rincées avec du PBS 1X sans calcium et sans magnésium puis détachées du flacon de culture par incubation

en présence de 0,05 % Trypsine/EDTA (Invitrogen) pendant 5 min à 37°C. Pour stopper l'action de la trypsine, du milieu complet est ajouté. La viabilité des cellules est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu trypan : celui-ci est exclu des cellules viables qui demeurent ainsi incolores, contrairement aux cellules mortes qui se chargent de bleu (Boyse et al., 1964). Après numération grâce à une cellule de Kova[®] Slide, le nombre de cellules désiré estensemencé dans des flacons de culture. Toutes les manipulations sont faites stérilement sous un Poste de Sécurité Microbiologique II (PSMII) (Astec, France).

2) Multiplication des parasites sur cellules Vero

Les tachyzoïtes sont cultivés sur les cellules Vero en IMDM/Glutamax[®] supplémenté de 2% de SVF décomplémenté, filtré et additionné de 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine) (**Figure 16**).

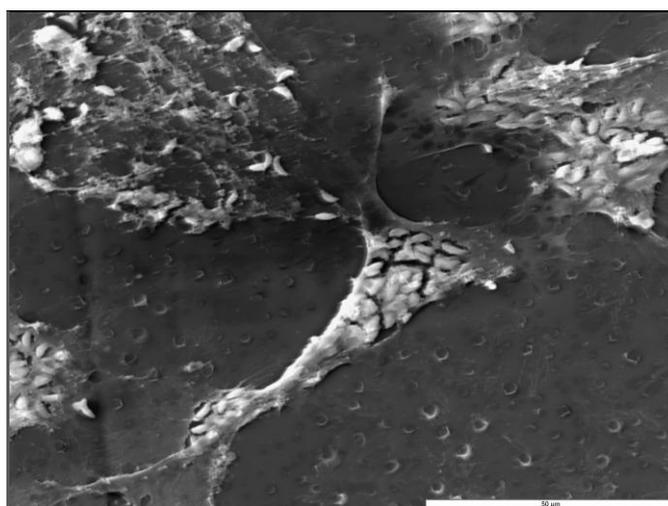


Figure 16. Observation en Microscopie électronique à balayage de cellules Vero infestées par des tachyzoïtes de *T. gondii* (G : X 1000)

Selon le génotype de la souche (I, II et II variant), le rapport tachyzoïtes / cellules a été déterminé afin d'obtenir une sortie des parasites en 4 jours entre deux passages successifs (**Tableau II**):

Génotype de la souche	Rapport tachyzoïtes / cellules
Type I	1 / 1
Type II	4 / 1
Type II variant	6 / 1

Tableau II. Rapports tachyzoïtes / cellules utilisés pour la culture cellulaire

Un entretien est effectué lorsque les tachyzoïtes, après éclatement des cellules, se retrouvent dans le milieu extracellulaire. Les cellules Vero sontensemencées dans des flacons de culture (1 million de cellules dans une T25), comme précédemment décrit, puis incubées 3 h à 37°C permettant ainsi aux cellules d'adhérer avant infestation par les tachyzoïtes. Après numération grâce à une cellule de Kova[®] Slide, le nombre de tachyzoïtes désiré estensemencé dans les flacons de culture contenant les cellules Vero. La croissance parasitaire s'effectue à 37°C en atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO₂. Afin d'éviter tous risques de dérives phénotypiques, les tachyzoïtes et les cellules Vero ne sont utilisés que jusqu'aux passages 15 et 30, respectivement. Toutes les manipulations sont faites stérilement sous Poste de Sécurité Microbiologique II (PSMII) (Astec, France).

Les parasites et les cellules sont régulièrement testés pour les contaminations mycoplasmaïques par PCR en temps réel (Ishikawa et al., 2006). Ces manipulations sont effectuées par la Plateforme Régionale de Biologie Innovante (PRBI, Reims).

3) Congélation et décongélation

Afin de garantir une meilleure reproductibilité des résultats, les cellules et les parasites sont congelés et décongelés régulièrement, pour réaliser les expériences sur des parasites de passages identiques. Les protocoles de congélation et décongélation sont similaires pour les deux modèles cellulaires. Les cellules et parasites sont cultivés comme décrit précédemment.

Avant congélation, les parasites et cellules sont centrifugés à 800 g pendant 10 min, remis en suspension dans 1 mL de milieu de culture, et comptés sur une cellule de Kova[®] Slide. Les parasites et cellules sont ensuite répartis dans les cryotubes à une concentration de 8 millions pour les

parasites et 2 millions pour les cellules dans 1,5 mL de milieu de congélation. Ce dernier est composé de milieu IMDM/Glutamax[®] additionné de 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine), 10% de SVF et 10% de DMSO (DiméthylSulfoxyde). Les cryotubes sont ensuite placés dans une boîte d'isopropanol conservée à -80°C, permettant une congélation lente n'altérant pas le matériel biologique, pendant 48h avant d'être placés dans une cuve d'azote liquide ou laissés à -80°C si la décongélation se fait dans les quelques mois à venir.

Pour la décongélation, les cryotubes sont transférés de l'azote liquide ou du -80°C directement dans un bain-marie à 37°C pour une décongélation rapide. Le contenu des cryotubes est transféré dans une flasque de 25 cm² contenant 5 mL de milieu de culture pour les cellules, et dans une T25 contenant 500 000 cellules pour les parasites. Les milieux sont changés après 24 h et les cellules et parasites sont cultivés comme décrit précédemment.

III. Effets *in vitro* de la sulfadiazine et du probénécide sur *T. gondii*

1) Effecteurs pharmacologiques

a. La sulfadiazine (C₁₀H₁₀N₄O₂S ; MM : 250,3)

La sulfadiazine ou 4-amino-*N*-pyrimidin-2-yl-benzenesulfonamide est un sulfanomide (**Figure 17**). En association avec la pyriméthamine, elle est utilisée pour traiter la toxoplasmose. C'est un antagoniste compétitif de l'acide para-amino benzoïque qui va agir en empêchant la production d'acide folique au sein de l'organisme.

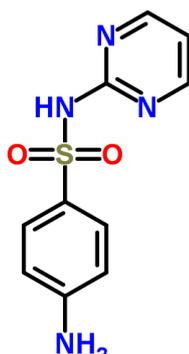


Figure 17. Formule semi-développée de la sulfadiazine

La solution mère de sulfadiazine (Sigma-Aldrich, France) est préparée extemporanément à 100 mg/mL dans une solution composée de 50% de NaOH 2N et 50% de milieu de culture complet.

b. Le probénécide (C₁₃H₁₉NO₄S ; MM : 285,3)

Le probénécide ou acide 4-(Dipropylsulfamoyl) benzoïque est un diurétique employé à l'heure actuelle dans le traitement de la goutte et/ou de l'hyperuricémie (**Figure 18**). C'est un inhibiteur compétitif de l'activité d'efflux des MRP (Multidrug resistance-associated protein) (Loe et al., 1996) et des échangeur d'anions organiques (Nzila et al., 2003).

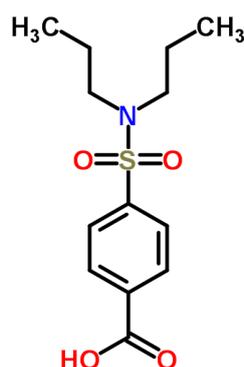


Figure 18. Formule semi-développée du probénécide

La solution mère de probénécide (Sigma-Aldrich, France) est préparée à 10 mM dans une solution composée de 10% de NaOH 2N et 90% de milieu de culture IMDM.

2) Etude de la sensibilité des souches de *T. gondii* à la sulfadiazine en présence ou non de probénécide

a. Préparation des cellules

Les cellules Vero sont ensemencées en plaque 96 puits, à raison de 200 μ L d'une suspension contenant 15 000 cellules par puits, de façon à obtenir un tapis cellulaire sub-confluent pour une infestation par les tachyzoïtes. Les plaques de culture sont incubées 3 h à 37°C permettant ainsi aux cellules d'adhérer avant infestation par les tachyzoïtes.

b. Préparation des tachyzoïtes et infestation

Les tachyzoïtes entretenus sur cellules Vero sont centrifugés à 800g pendant 10 minutes, remis en suspension dans 1 mL de milieu IMDM à 2 % SVF et comptés sur cellules de Kova[®] Slide comme décrit précédemment. Tous les puits de la plaque, à l'exception de huit puits témoins (cellules Vero seules), sont inoculés avec 50 μ L d'une suspension de parasites : 7 500 parasites pour le type I, 30 000 parasites pour le type II et 45 000 parasites pour le type II variant, puis les plaques de culture sont incubées 3 h à 37°C afin de permettre aux tachyzoïtes de pénétrer à l'intérieur des cellules.

c. Ajout de la sulfadiazine et du probénécide

La sulfadiazine (SDZ) et le probénécide sont ajoutés 3 h après l'infestation des cellules par *T. gondii*. La sulfadiazine est ajoutée dans les puits à différentes concentrations finales (0, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 et 1000 μ g/mL) en présence ou non de probénécide à une concentration finale de 0,5 mM ou 1 mM dans les puits. Des études préliminaires ont montré que les concentrations finales de NaOH 2N à la dilution de SDZ et du probénécide n'ont pas inhibé la croissance de *T. gondii* et des cellules. Après 72 h d'incubation à 37°C, les cultures sont fixées par addition de 200 μ L de méthanol glacé (-20°C) pendant 5 minutes à 4°C, séchées à température ambiante pendant 5 minutes, puis stockées à -20°C. Chaque condition est répétée dans 8 puits et réalisée en duplicate.

IV. Dosage immuno-enzymatique (ELISA)

1) Principe

L'évaluation de la croissance parasitaire est mesurée en utilisant un anticorps monoclonal GII9 reconnaissant spécifiquement une protéine de surface du tachyzoïte, SAG1 (Surface Antigen 1) et couplé à la peroxydase qui va, en dégradant le substrat, engendrer une coloration du milieu. L'intensité de la coloration, évaluée par une mesure de l'absorbance à 450 nm, est proportionnelle à la quantité de parasites présents dans le puits (**Figure 19**).

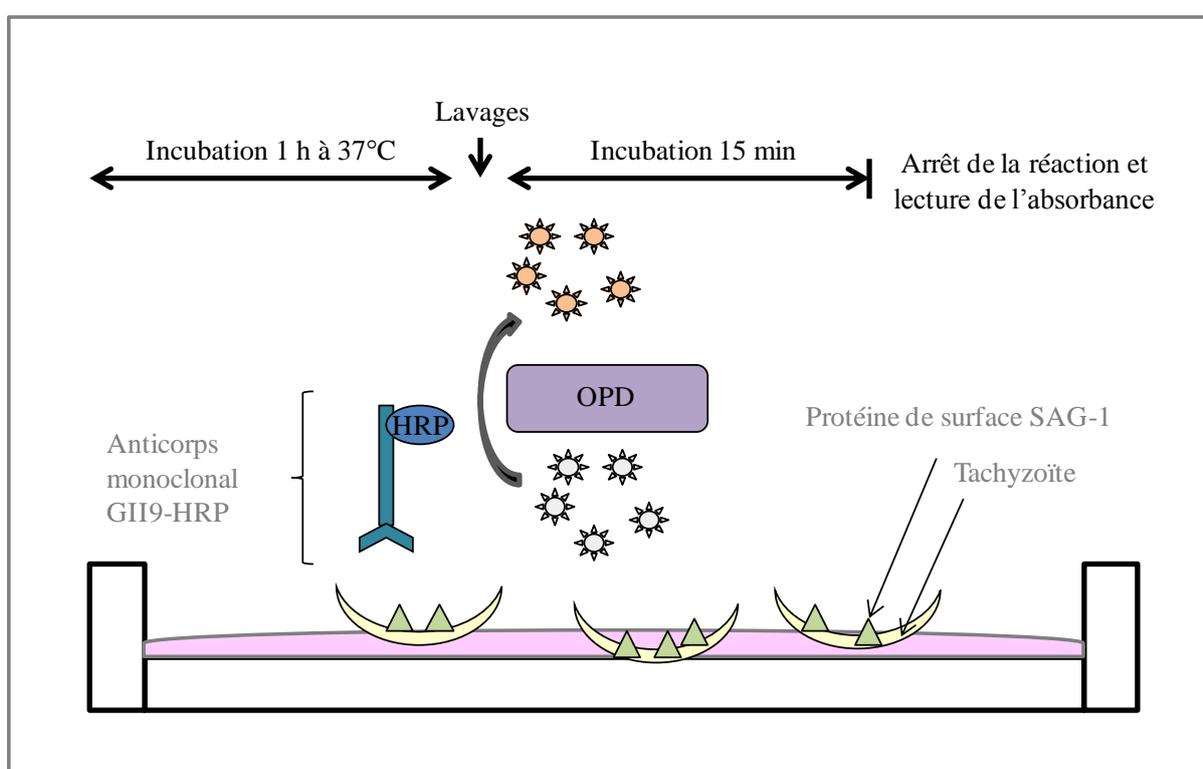


Figure 19. Principe du test ELISA GII9-HRP

2) Mode opératoire

Les plaques sont réhydratées avec 200 μL de PBS 1X pendant 10 min à température ambiante. Puis 60 μL d'anticorps monoclonal anti-*T. gondii* SAG1 conjugué à la peroxydase (1,01 mg/mL) (Argene Biosoft, France) dilué au 1:3000^{ème} dans le tampon de conjugué (**Annexe 1**) sont ajoutés

dans chaque puits et incubé 1 h à 37°C. Quatre lavages sont effectués avec le tampon de lavage (**Annexe 1**). L'activité de la peroxydase est alors déterminée par l'addition de 200 µL par puits de substrat OPD (o-Phénylenediamine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich, France) pendant 15 minutes, à température ambiante, et à l'abri de la lumière. Une tablette d'OPD est dissoute dans 10 mL de tampon de substrat (**Annexe 1**). La réaction est stoppée par l'ajout de 100 µL par puits d'acide chlorhydrique 1 N. Deux cents microlitres de surnageant sont prélevés dans chaque puits et transférés dans une nouvelle plaque 96 puits. L'absorbance est alors lue à 450 nm, une seconde lecture à 630 nm est utilisée comme référence.

3) Analyse des données de la CI₅₀

L'effet des différentes concentrations de sulfadiazine est représenté par une courbe de régression linéaire. On estime que la moyenne des valeurs de Densité Optique (DO) pour les témoins représente une croissance parasitaire de 100%. La courbe de régression linéaire représente le pourcentage de croissance parasitaire en fonction du logarithme népérien (Ln) de la concentration de sulfadiazine en µg/mL. La courbe obtenue, de forme sigmoïde, est exprimée selon une séquence de trois droites de régression linéaire du type : $y = ax + b$, où y représente la DO, reflet de la croissance parasitaire, et x, le logarithme de la concentration en sulfadiazine. La première droite (d1) indique l'absence d'effet inhibiteur de la sulfadiazine, la deuxième droite (d2) indique l'augmentation de l'effet inhibiteur et la troisième droite (d3) illustre l'effet résiduel des plus fortes concentrations. Le calcul de la CI₅₀ se fait selon la **Figure 20**.

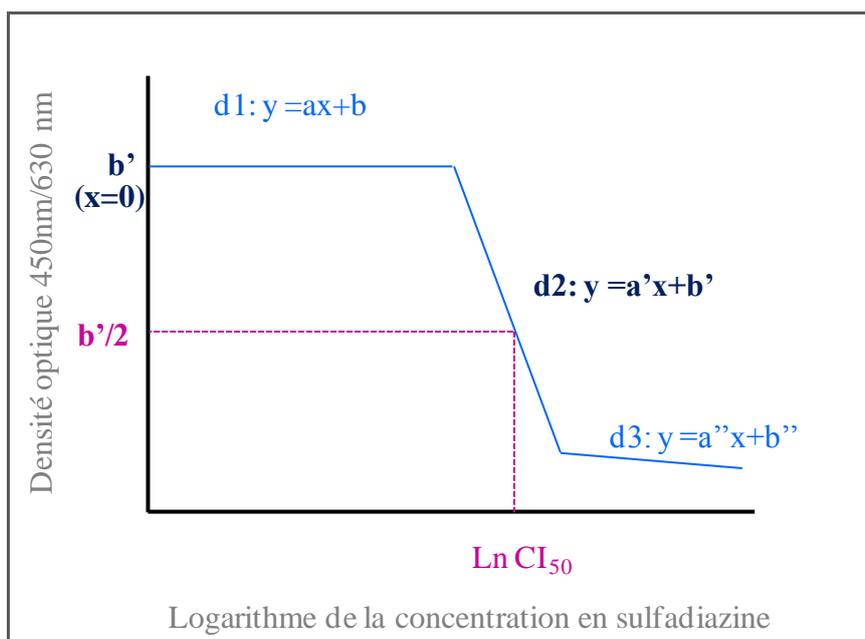


Figure 20. Obtention du logarithme de la CI_{50} à partir des DO et des droites de régression linéaire

V. Coloration des cellules infestées

Les plaques de culture sont hydratées avec 200 μ L de PBS 1X pendant 10 minutes avant d'être colorées par le réactif RAL 555 (RAL Diagnostics, France). Chaque puits est incubé 1 minute en présence d'éosine puis 1 minute en présence de bleu de méthylène. L'excès de colorant est ensuite éliminé par plusieurs lavages au PBS 1 X et les plaques sont séchées à l'air.

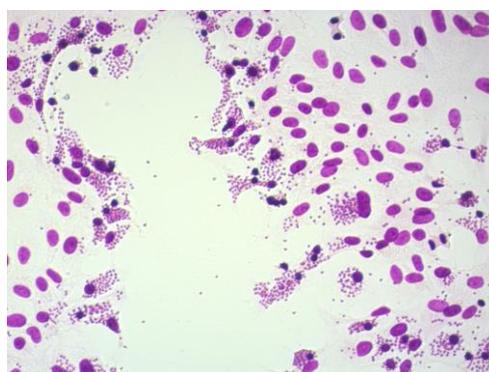


Figure 21. Observation microscopique de cellules Vero infestées par *T. gondii* (G : X20)

L'observation est réalisée sur le vidéomicroscope Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Allemagne) en collaboration avec le Dr Frédéric Velard, ingénieur de la plate-forme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire – IBiSA, Université de Reims Champagne-Ardenne (**Figure 21**).

VI. Développement de lignées de *T. gondii* résistantes à la sulfadiazine

Les tachyzoïtes des souches RH et ME-49 sont cultivés sur cellules Vero en milieu IMDM/Glutamax[®], supplémenté de 2% de SVF préalablement décomplémenté et additionné de 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine). La sulfadiazine est ajoutée à une valeur proche de la CI_{50} des souches parentales RH et ME-49, soit 50 $\mu\text{g/mL}$, puis la concentration est doublée tous les trois à cinq passages des parasites (50, 100, 200, 400 et 800 $\mu\text{g/mL}$) lorsque les parasites présentent une croissance reproductible à 4 jours (**Figure 22**). Les cellules et parasites sont lavés au PBS 1X, 24 h après l'ajout de sulfadiazine, afin d'éviter toute cristallisation du médicament suite à l'acidification du milieu. La croissance parasitaire s'effectue à 37°C en atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO_2 . Une congélation des tachyzoïtes a été réalisée pour chaque concentration avant passage à la concentration suivante.

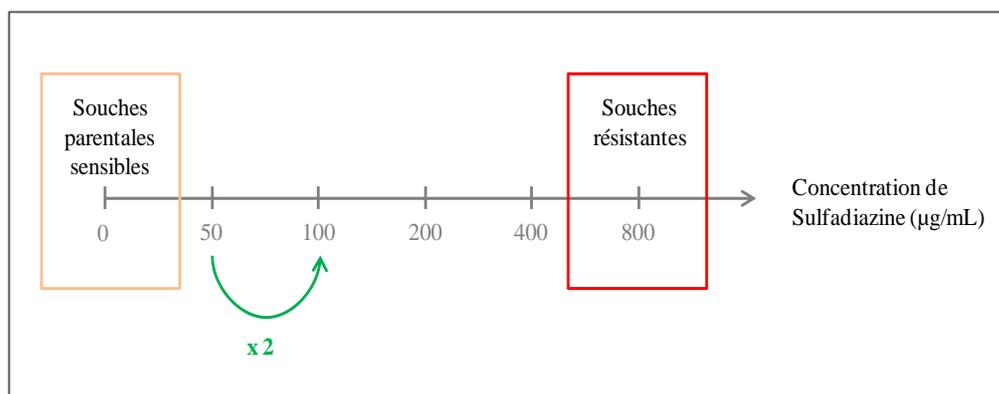


Figure 22. Développement de souches résistantes à la sulfadiazine

Partie II. Biochimie

I. Extraction des protéines totales

Les parasites extracellulaires sont récupérés des cultures cellulaires puis lavés, à deux reprises, dans du PBS 1X suivie d'une centrifugation à 1 500 g pendant 10 min à 4°C. Chaque culot sec de tachyzoïtes est repris dans 50 µL de tampon de lyse RIPA (**Annexe 2**) pendant 1 h dans la glace, suivi de deux cycles de congélation à -80°C/décongélation à température ambiante.

Après centrifugation de 15 minutes à 15 000 g à 4°C, le surnageant est récupéré puis les protéines des échantillons sont dosées, puis ces derniers sont conservés à -80°C avant utilisation.

II. Dosage des protéines

1) Principe

Le dosage des protéines totales est réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Cette technique est un dosage colorimétrique basé sur la propriété du bleu de Coomassie de se lier avec l'arginine et les groupements hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. L'intensité de la coloration (absorbance) est alors directement proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon, que l'on détermine par lecture sur une courbe d'étalonnage réalisée avec une gamme étalon de BSA réalisée entre 0 et 2 mg/mL.

2) Protocole opératoire

La gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution d'albumine à 2 mg/mL fournie avec le kit : Coomassie Plus Protein Assay (ThermoScientific, France) 10 µL de chaque étalon sont déposés en duplicate sur une plaque 96 puits, avec les échantillons à doser dilués au 1/12^{ème},

également en dupliquât. Puis 300 µL de réactif Coomassie Plus Protein Assay sont ajoutés dans chaque puits. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 595 nm.

III. Western blot

1) Principe

Le western blot est une technique permettant de détecter et d'identifier des protéines spécifiques dans un échantillon. Après extraction, les protéines de l'échantillon sont séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose afin de les rendre accessibles à la détection par les anticorps. Après saturation des sites d'interactions non-spécifiques, la membrane est incubée avec l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt (anticorps primaire). Puis le complexe antigène-anticorps formé est reconnu par un deuxième anticorps (anticorps secondaire) dirigé spécifiquement contre l'anticorps primaire. La révélation des protéines d'intérêt se fait alors par chimioluminescence, les anticorps secondaires étant couplés à la peroxydase.

2) Mode opératoire

Dix microgrammes de protéines sont mises en solution dans un tampon d'échantillon 4X (**Annexe 3**) contenant 8% de β-mercaptoéthanol, afin de réduire les ponts disulfures, puis chauffés à 95°C pendant 5 min. Les échantillons ainsi que 10 µL de marqueur de masse moléculaire (Dual color, Biorad, France) sont déposés dans un gel de polyacrylamide composé d'un gel de concentration à 4 % et d'un gel de séparation à 12,5 % (**Annexe 4**). La migration est réalisée sous une tension constante de 120 V pendant 1 h dans le tampon de migration 1X (Tampon TG-SDS 10X, Euromedex, France). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Biorad, France) préalablement équilibrée dans le tampon de transfert 1X (**Annexe 5**). L'électrotransfert est réalisé dans le tampon de transfert 1X pendant 1 h 10 sous une tension constante de 120 V.

La membrane de nitrocellulose est ensuite lavée dans du tampon TBS pendant 10 minutes, puis saturée toute la nuit à 4°C sous agitation dans une solution de saturation composée de 5 % (m/v) de lait écrémé dilué dans du TBS-T (**Annexe 6**). La membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation pendant 1 h à température ambiante sous agitation douce. Après 3 lavages de 10 min au TBS-T, la membrane est incubée 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase et dirigé contre l'anticorps primaire, dilué dans la solution de saturation sous agitation douce. Les différents anticorps primaires et secondaires utilisés sont répertoriés dans le **Tableau III**.

	Anticorps	Origine	Dilution	Fournisseur et Référence
Anticorps primaire	Anti-ENO2	Lapin	1/5000	Dr S. Tomavo Institut Pasteur/ UMR 8204/ INSERM U1019 Lille
	Anti-IMC1	Souris	1/5000	Dr S. Tomavo Institut Pasteur/ UMR 8204/ INSERM U1019 Lille
	Anti-MIC2	Souris	1/1000	Dr JF. Dubremetz CNRS/UMR5235 Montpellier
	Anti-ROP2	Souris	1/2000 (Type I) 1/1000 (Type II)	Dr JF. Dubremetz CNRS/UMR5235 Montpellier
	Anti-GRA7	Souris	1/2000	Ref 5-241-178 (Bonhomme et al., 1998)
	Anti-SAG1	Souris	1/1000	Argene Biosoft, France
Anticorps secondaire	Anti-souris HRP	Chèvre	1/3000	Biorad, France
	Anti-lapin HRP	Chèvre	1/3000	Santa Cruz, USA

Tableau III. Anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot

Après 3 lavages de 10 min au TBS-T suivi d'un lavage de 10 min au TBS, les protéines sont révélées par chimioluminescence (kit ECLTM, Amersham).

Partie III. Biologie Moléculaire

I. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR en temps réel (RT-PCRq)

Cette technique (RT-PCRq) comporte deux étapes clés : une étape de transcription inverse (RT) qui permet de synthétiser les ADNc à partir des ARNm, et une étape d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La PCR est par définition une réaction en chaîne au cours de laquelle des brins d'ADN néosynthétisés au cours d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. Un cycle de PCR est composé de trois étapes (dénaturation-hybridation-élongation) et est répété de nombreuses fois au cours de la réaction. Cette technique permet d'étudier l'expression des gènes étudiés en les comparant à celle d'un gène de ménage dont l'expression est considérée comme constante.

1) Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont isolés avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, France), conformément aux instructions fournies par le fabricant. Un tampon de lyse RLT, contenant de l'isothiocyanate de guanidinium et du β -mercaptoéthanol (10 μ L/mL) permettant l'inactivation des ribonucléases, est ajouté sur le culot de parasites afin d'obtenir une dissolution complète du culot de tachyzoïtes. Le lysat est alors déposé dans une colonne QIAshredder (Qiagen, France) et centrifugé à vitesse maximale pendant 2 min afin d'éliminer, par une action mécanique, la majeure partie des débris cellulaires et d'obtenir un échantillon parfaitement homogénéisé. L'ARN est alors précipité par ajout d'éthanol. La solution est alors déposée à la surface d'une colonne de purification (QIAamp, Qiagen, France) ne retenant que les brins d'ARN dont la taille est supérieure à 200 nucléotides. Après plusieurs lavages, les ARN sont élués dans 40 μ L d'eau exempte de DNase et RNase (Sigma, France).

2) Analyses quantitative et qualitative des ARN

Avant chaque RT-PCR, les ARN extraits sont contrôlés puis quantifiés. L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose 2 % (p/v) contenant 0,01 % (v/v) de GelRed™ (FluoProbes®, Interchim) dans du tampon TAE 1X (solution Tris Acétate EDTA) pendant 1 h sous une tension de 90 V. La présence de deux bandes nettes et distinctes après révélation sous ultraviolets reflète la qualité des ARN ribosomiaux majoritaires (18S et 26S chez *T. gondii*) et donc par extrapolation, la qualité des ARN totaux. Les ARN ne répondant pas à ces conditions sont exclus de toute analyse par RT-PCR.

La concentration en ARN est déterminée par lecture de la DO à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanovue™, GE Healthcare). La contamination protéique est estimée par une lecture à 280 nm. La pureté de l'échantillon est alors évaluée par la mesure du rapport d'absorption DO_{260}/DO_{280} qui doit être compris entre 1,7 et 1,9. Les ARN totaux sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

3) Reverse transcription

a. Principe

Cette réaction est effectuée par une réverse transcriptase qui est une ADN polymérase ARN dépendante capable d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc), à l'aide de désoxyribonucléotides.

b. Mode opératoire

La synthèse d'ADNc à partir d'ARN est réalisée avec le kit iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad) conformément aux instructions fournies par le fabricant. Dans un tube stérile de 0,2 mL, 1 µg d'ARN totaux est mélangé à 4 µL d'iScript Reverse transcription Supermix contenant la transcriptase inverse MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase), des inhibiteurs de ribonucléases, du $MgCl_2$, des dNTPs, des oligo(dT)s, et des randoms primers sous un volume réactionnel final de 20 µL. Les échantillons sont incubés dans un thermocycleur (PCR Express, Hybaid) pendant 5 min à 25°C, puis 50 min à 42°C, température

optimale pour la réaction de polymérisation et enfin 5 min à 85°C afin d'inactiver l'enzyme. L'ADNc est aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

4) PCR en temps réel

a. Principe

Après une étape de transcription inverse des ARNm en ADNc, une séquence nucléotidique spécifique est amplifiée à l'aide d'un couple d'amorces encadrant la région cible. Au cours de cette PCRq, l'incorporation d'un fluorochrome (SYBR[®] Green) permet la quantification et le suivi en temps réel de la quantité de produit d'amplification néoformé. Par analyse, il est ensuite possible de déterminer la concentration en ARNm initialement présent dans l'échantillon. Afin de standardiser et normaliser les différentes analyses, il est réalisé en parallèle la quantification d'un gène de ménage : la *β-tubuline*. Les RT-PCRq sur ce gène, dit de référence, permettent de comparer les résultats d'une PCRq à l'autre, et de pouvoir déterminer le niveau d'expression de plusieurs gènes dans un échantillon. Ainsi, la quantité d'ADNc reflétant la quantité d'ARNm de départ est mesurée de façon relative après normalisation par rapport à un gène de référence.

b. Choix des amorces

Les amorces utilisées sont dessinées grâce au logiciel en ligne ProbeFinder (Roche Applied Science) (http://www.roche-applied-science.com/sis/rtqcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000) afin d'avoir un pourcentage de GC de 40% à 60% et des températures d'hybridation ($T_m \sim 60^\circ\text{C}$) similaires au sein de chaque couple d'amorces, sens et anti-sens. Les couples d'amorces de chaque gène sont choisis sur deux exons consécutifs afin d'éviter toute amplification d'ADNg et la spécificité des amorces est vérifiée dans les bases de données ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>) et EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>). Les amorces sont synthétisées par la société Invitrogen[™]. Elles sont répertoriées dans le **Tableau IV**. Les amorces sont reconstituées à 100 pmol/μL, aliquotées et conservées à -20°C.

Gène	Séquence des amorces (sens puis anti-sens)	Taille du produit amplifié
<i>β-tubuline</i>	5'-TCT TCC GCC CTG ACA ACT TC-3' 5'-CCG CAC CCT CAG TGT AGT GA-3'	81 pb
TgABC.B1	5'-GCG TGT GTT TGC ACT GAT TGA-3' 5'-TTG CGT TGT CGC GAA CTT C-3'	81 pb
TgABC.B2	5'-AGA CCT AAC GGC GGA AGC -3' 5'- CAT CTG CCG AAC AAA AGA CTG-3'	94 pb
TgABC.C1	5'-ACA CTC TCC CTT CAT TCA CAA G-3' 5'-CAG AAG GTG AAT CAG TGG AAT GG-3'	65 pb
TgABC.C2	5'- TCC GAT TTT CCA GGA CTT CTC-3' 5'- CCA TCT TTT CTT CGC TTT GC-3'	101 pb
ROP2	5'- TCA CGC TTC AGC TCA TAA GG-3' 5'-GAA AAT CGG CAT GCA CAA G-3'	66 pb
MIC2	5'-GGG GTA TGT GCT GTT GAC G-3' 5'-GTG GCA TTT CCG CAA GAC-3'	77 pb
ENO2	5'-GCG ACC AGA AGG GTA TTG AC-3' 5'-AGC CCC ACT CGT TCT TAG TTC-3'	66 pb
IMC1	5'-GAA CGC TTG CTC AAG GAG A-3' 5'-TTG AAG ACC TGC TCC ACC TT-3'	104 pb
Hsp70	5'-TCG ATC AAC CCC GAT GAG-3' 5'-TGG TAA CTC CCT TCA AGA TCG-3'	70 pb
Hsp90	5'-GGA GAT CAA TCC GAC GAA TC-3' 5'-TTG TCT GCG TTG CTC TTC TTC-3'	60 pb
GRA7	5'-CGA GAA GAG AGC CAT TGG AG-3' 5'-CCT CGC TTC CTG AAA TGA AC-3'	64 pb
GRA5	5'-CAG GTA CAA CAA CAC GAA CAA AA-3' 5'-TGC AGT CCT CAC TGG ATG TC-3'	87 pb
ROP1	5'-AGC CTA CGG AAG AGC AAC AG-3' 5'-TGT CCT TCG GGT TGT TCG-3'	85 pb
Hsp60	5'-TGG AAA GCT GAT TGC AGA TG-3' 5'-TTC CCT TCG GAC ACA GTG AT-3'	69 pb
NTPase I	5'-GTA CCG TCC TGC CCT CTT C-3' 5'-GAC GTC GGC ACT TGG ATA AC-3'	88 pb
ENO1	5'-GAG GCT CTG AAT CTC CTT GTT G-3' 5'-CTG CGT CAA ATG CGA TCT T-3'	76 pb
Cyclophiline 18 kDa	5'-GAG ATT TCG AGA ACC ACA ACG-3' 5'-GTT TTC GTC GTC AAA TCT TCG-3'	68 pb
BAG1	5'-TGA GCG AGT GTC CGG TTA TT-3' 5'-ATT CCG TCG GGC TTG TAA T-3'	66 pb
SAG1	5'-ACG GGG GAT TCT GCT AGT CT-3' 5'-GGG GAA CTT CTC GAT TGG A-3'	66 pb
Peroxi-redoxine	5'-GCC TGG AGA AAC GTG GAA T-3' 5'-GAG CAA CGG GAA GGA AAT C-3'	60 pb
FPGS	5'- ACATTGCGCCGCTATACGCACC-3' 5'-ATCCACAGGCGACCAACACAC-3'	68 pb

Tableau IV. Couples d'amorces utilisés en RT-PCR en temps réel

c. Mode opératoire

La PCR en temps réel est réalisée grâce à l'iCycler IQTM (Bio-Rad, France). Il s'agit d'un thermocycleur à air pulsé, qui assure une répartition homogène de la température d'un échantillon à un autre ; l'homogénéité de la température étant un critère très important conditionnant la précision et la reproductibilité des mesures effectuées. La réaction se déroule en plaque 96 puits. Le système de détection des produits formés est l'agent intercalant SYBR[®] Green.

Le volume final de réaction, pour chaque puits, est de 25 μ L contenant notamment 400 nM de chaque amorce. Le fluorochrome (SYBR Green), le $MgCl_2$ (6 mM), les désoxynucléotides libres (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (400 μ M de chaque), la Taq ADN polymérase (50 unités/mL) et les tampons (KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM, pH 8,4) sont contenus dans le mélange appelé SYBR Green (Biorad, France). Ce mélange contient également la fluorescéine (20 nM), nécessaire à la calibration de l'appareil.

Chaque puits réactionnel contient ainsi 12,5 μ L de mix PCR, 1 μ L d'amorce sens, 1 μ L d'amorce anti-sens, 5,5 μ L d'eau stérile et 5 μ L d'ADNc à quantifier.

Les tubes sont ensuite placés dans le thermocycleur et incubés : 3 min 30 s à 95°C afin d'activer la Taq ADN polymérase Hot start, puis l'amplification se déroule sur 40 cycles de 15 s à 95°C (dénaturation) suivies d'1 min à 60°C (étape combinée d'hybridation et d'élongation).

d. Analyse des résultats

L'intensité de la fluorescence à chaque cycle, due à l'incorporation de l'intercalant de l'ADN double brin, est proportionnelle à la quantité d'ADN formé. La PCR en temps réel permet la détermination d'un cycle seuil (cycle threshold ou Ct) correspondant au premier cycle d'amplification au-delà duquel elle est exponentielle ; le signal d'émission de fluorescence est donc statistiquement et significativement plus élevé que la ligne base. Dans chaque série de PCR, un témoin sans ADNc (blanc de PCR) est réalisé pour vérifier l'absence de contamination par d'autres produits post-PCR. De plus, une courbe standard est établie à partir de 5 dilutions en série (1/5, 1/10, 1/20, 1/40 et 1/80) d'une solution d'ADNc contenant la β -tubuline afin d'obtenir à partir de sa pente, l'efficacité de la PCR (**Figure 23**). Celle-ci est définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle. Une PCR de performance acceptable est caractérisée par une efficacité de 100 % \pm 10%. La dilution au 1/20 est retenue pour effectuer la

quantification de l'expression des différents gènes étudiés. Les taux d'expression des ARNm sont normalisés par rapport à ceux de la β -tubuline.

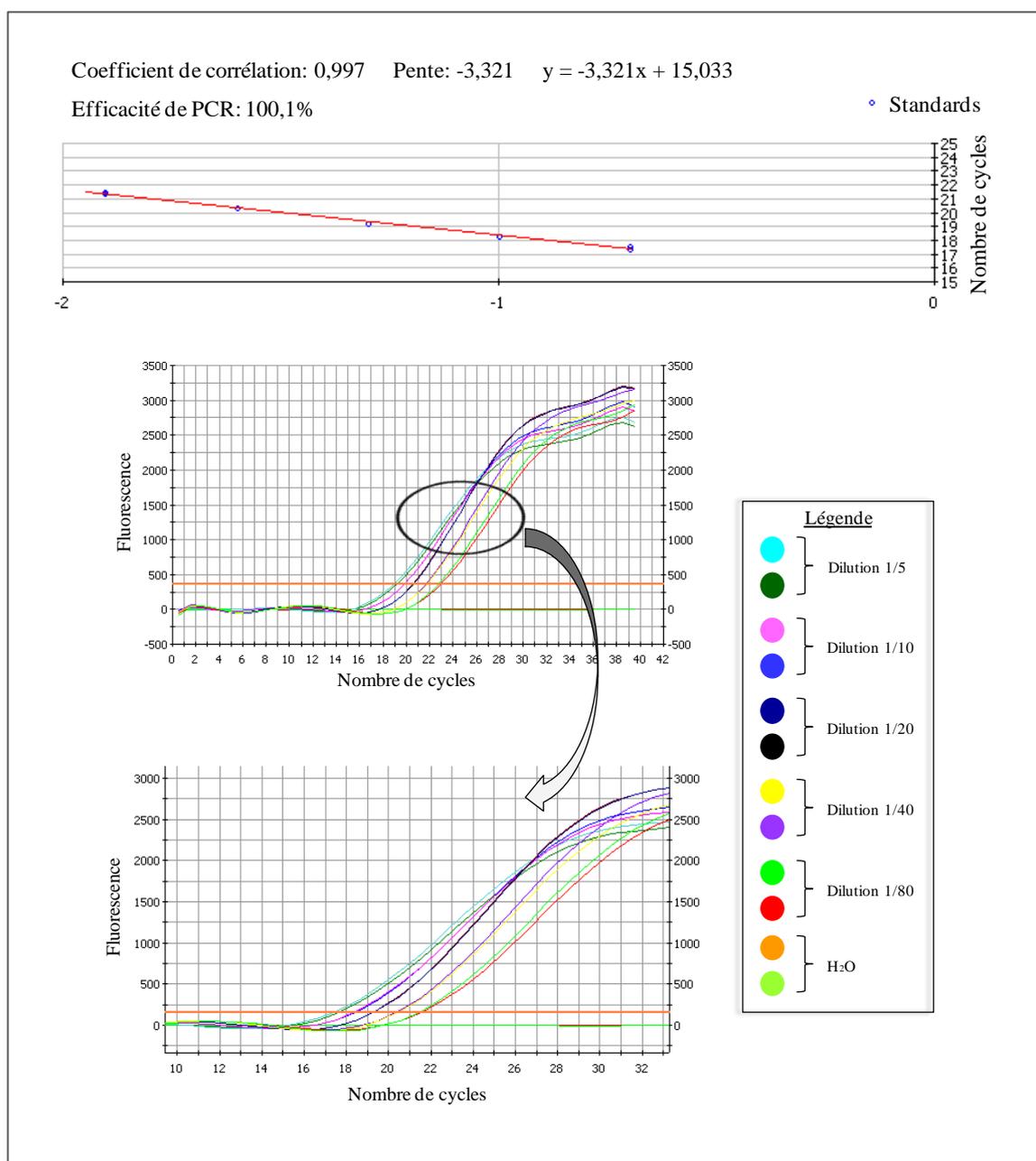


Figure 23. Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.

La spécificité de l'amplification et l'absence de dimères d'amorces ont été confirmées par l'analyse de la courbe de fusion (*melting curve*) obtenue après dénaturation des produits post-PCR

(55°C-95°C). La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température. Cette courbe permet de déterminer la température de fusion du produit amplifié (**Figure 24**).

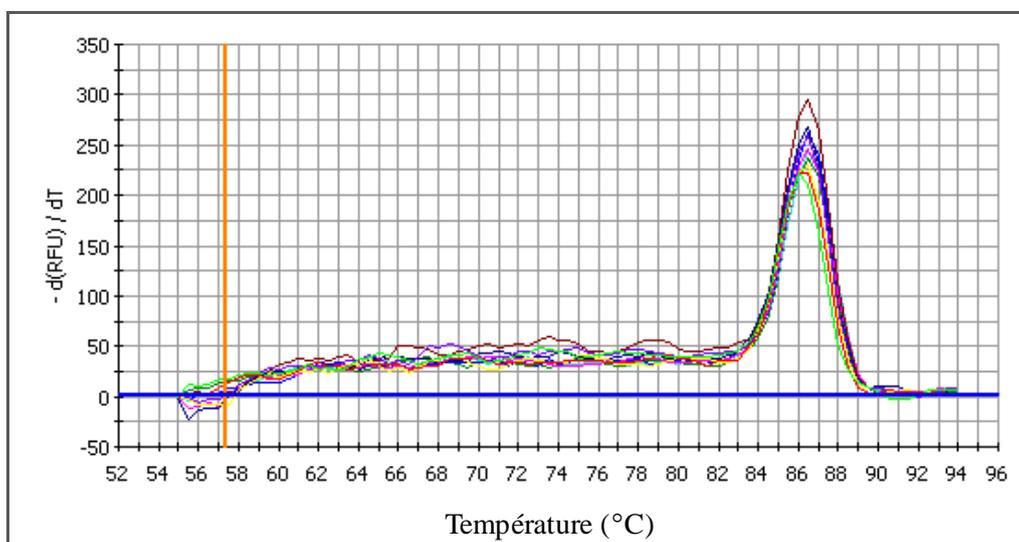


Figure 24. Courbe de fusion des amplicons

Le programme de gestion de l'appareil permet de visualiser les courbes de fusion de l'ensemble des puits de manière à évaluer la spécificité des réactions d'amplification.

e. Analyses statistiques

Les résultats obtenus en RT-PCR en temps réel sont issus d'au moins cinq expériences indépendantes réalisées en duplicate et sont représentés sous forme de médiane \pm interquartiles. Les résultats ont été analysés à l'aide de tests non-paramétriques (test de Mann et Whitney). La significativité des différences entre les valeurs est schématisée de la manière suivante : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

II. Analyse transcriptomique

Les expériences de microarrays ont été réalisées par la Plateforme Biopuces et Séquençage de l'IGBMC (Strasbourg).

1) Principe

L'analyse du transcriptome par microarray permet d'étudier de façon simultanée le niveau d'expression de milliers de gènes à partir d'un même échantillon. Le principe des puces à ADN repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est porté face à un brin complémentaire (réaction d'hybridation). Un mélange complexe d'ADN est marqué, mis en solution et hybridé avec des ADN complémentaires de séquence connue, fixés sur la surface d'un support solide à des positions déterminées. Les ADN fixés sont des oligonucléotides, des ADNc ou des fragments d'ADN génomique amplifiés par PCR. Grâce à la miniaturisation des techniques de dépôt ou de synthèse, des dizaines voire des centaines de milliers d'ADN de séquences différentes sont contenus dans des réseaux de quelques centimètres carrés.

Le but de cette étude est de comparer les transcriptomes des souches ME-49 et ME-49-R^{SDZ}, respectivement sensibles et résistantes à la sulfadiazine.

2) Puces affymétrie

Pour cette étude, les puces *Toxoplasma gondii* arrays (Tgondia520372) de la société AffymetrixTM ont été utilisées. Chaque puce de *T. gondii* contient 8 993 sondes, chaque sonde correspondant à un gène. Les puces AffymetrixTM sont des supports solides sur lesquels, par un procédé de photolithographie, ont été fixées des sondes ADN à très forte densité. Ces sondes sont complémentaires de gènes cibles. Il est donc ainsi possible d'étudier l'expression transcriptionnelle des gènes à partir d'un extrait cellulaire, les puces AffymetrixTM permettant de quantifier de façon relative l'abondance des transcrits (Bahl et al., 2010).

3) Protocole opératoire

L'analyse du transcriptome par puces requiert une excellente qualité d'ARN, l'intégrité des ARN totaux est donc vérifiée par analyse grâce au Bioanalyzer 2100 (Agilent), les échantillons présentant un taux d'intégrité supérieur à 8,5 sont conservés pour la suite de l'étude.

La première étape consiste, à partir de 200 ng d'ARN totaux, à synthétiser de l'ADNc double brin par transcription inverse en utilisant une amorce oligo-dT contenant la séquence de promoteur

de l'ARN polymérase du bactériophage T7. L'enzyme est ensuite utilisée pour transcrire *in vitro* l'ADNc double brin en ARNc en présence de ribonucléotides biotinylés grâce au kit d'amplification MessageAmp™ Premier RNA (Ambion) selon les instructions fournies par le fabricant (Cat # AM1792; Instruction Manual, # 4386269 Revision B, 18 september 2007) (**Figure 25**).

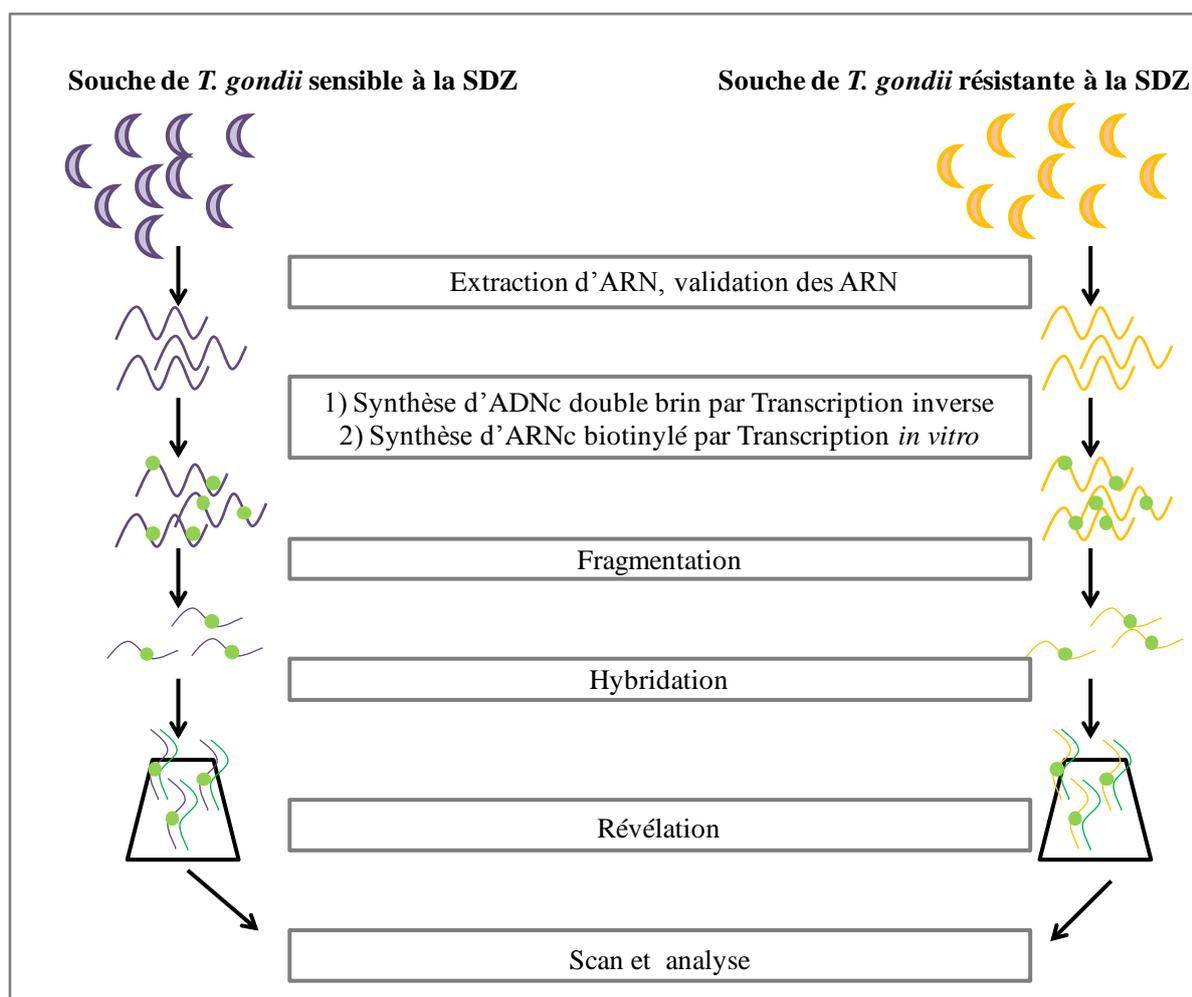


Figure 25. Protocole opératoire de la technique de microarrays

Les ARNc marqués sont ensuite fragmentés puis hybridés pendant 16 h à 45°C à 60 rpm sur les puces Affymetrix™. Les puces sont ensuite lavées et révélées par incubation avec la streptavidine couplée à la phycoérythrine dans la station GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix). Chaque condition expérimentale est réalisée en quadruplicat et chaque échantillon est hybridé individuellement sur une puce différente. Les puces sont ensuite scannées avec une résolution de 1,56 µm à l'aide du scanner GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) et l'intensité

du signal de chaque sonde, qui correspond à la quantité d'ARN présent dans l'échantillon, est mesurée. Les données (*Raw data*, *.CEL Intensity files*) sont extraites des images scannées grâce au logiciel Affymetrix GeneChip® Command Console (AGCC) version 3.2. Les fichiers CEL ont été traités par le logiciel Affy Package sur Bioconductor pour calculer les intensités de signal en utilisant les algorithmes Robust Multi-array Average (RMA). Les gènes dont le ratio Résistant/Sensible est supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 avec $p < 0,05$ (t-test de student) sont considérés comme ayant une expression modifiée.

Partie IV. Protéomique

I. Préparation des échantillons

1) Obtention des parasites

Pour les études de protéomique, les parasites sont cultivés dans des flacons de 175 cm² et 225 cm², comme précédemment décrit, afin d'obtenir des quantités importantes de tachyzoïtes. Les tachyzoïtes sont ensemencés sur cellules Vero selon les rapports appropriés en fonction du génotype de la souche. Le lendemain, les cellules et parasites subissent un lavage au PBS 1X afin d'éliminer tous les tachyzoïtes extracellulaires. Les tachyzoïtes sont récupérés 4 jours après l'infestation. Les parasites sont séparés des cellules et débris cellulaires par filtration au moyen de filtres polycarbonate 3 µm (Whatman). Les tachyzoïtes sont ensuite lavés, à deux reprises, au PBS 1X puis centrifugés à 1 500 g pendant 20 min à 4°C. Les parasites sont ensuite comptés, aliquotés à raison d'au minimum 2.10⁸ parasites par tubes et stockés à -80°C.

2) Extractions des protéines

a. Principe

Le protocole d'extraction des protéines de *T. gondii* a été développé par l'équipe du Pr J.M. Wastling (Université de Glasgow et de Liverpool, Royaume-Uni) et permet d'isoler uniquement les protéines totales de *T. gondii* à partir d'un culot sec de tachyzoïtes (Cohen et al., 2002; Xia et al., 2008).

b. Mode opératoire

Chaque culot sec de tachyzoïtes est repris dans 60 µL de tampon de lyse auquel est ajouté 10 µL de DNase et 5 µL d'inhibiteur de protéases (**Annexe 7**).

Le lysat subit alors 5 cycles de congélation dans l'azote liquide - décongélation au bain-marie à 37°C afin de libérer les protéines. Chaque cycle est suivi d'une étape vigoureuse de vortex pendant 30 s. Après centrifugation de 30 min à 13 000 g à 4°C, le surnageant est transféré dans un tube propre pour l'étape de précipitation des protéines; le culot étant formé de débris cellulaires.

3) Précipitation des protéines

a. Principe

Le kit 2-D Clean-up (GE Healthcare) est utilisé pour précipiter les protéines et éliminer les contaminants tels que les détergents, sels, lipides, acides nucléiques et phénoliques pouvant interférer dans l'électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines sont ensuite resuspendues dans une solution compatible avec l'IEF.

b. Mode opératoire

Les extraits protéiques sont précipités en présence de 180 µL de tampon de précipitation pendant 15 min à 4°C puis 180 µL de tampon de co-précipitation sont ajoutés afin d'améliorer l'agrégation des protéines. L'échantillon est ensuite centrifugé une première fois à 8 000 g à 4°C pendant 10 min, puis après élimination du surnageant, l'échantillon est centrifugé une seconde fois à 8000 g à 4°C pendant 1 min afin d'éliminer toutes traces de tampon de précipitation. Le culot protéique est repris dans 50 µL de tampon de co-précipitation, centrifugé à 8 000 g à 4°C pendant 5 min puis après élimination du surnageant, ce dernier est recouvert de 50 µL d'eau distillée. Le culot est ensuite totalement dispersé en présence de 1 mL de tampon de lavage glacé (-20°C) et 5 µL d'additif de lavage pendant 30 min à -20°C en vortexant 30 s toutes les 10 min. Après centrifugation à 8 000 g à 4°C pendant 10 min, le surnageant est délicatement éliminé afin de laisser le culot protéique sécher à l'air libre pendant 5 min. Le culot est solubilisé dans 50 µL de tampon échantillon (**Annexe 8**), vortexé afin de dissoudre complètement le culot puis centrifugé à 8 000 g à 4°C pendant 10 min pour séparer le matériel insoluble.

Le surnageant est récupéré, les protéines des échantillons sont dosées, puis ces derniers sont conservés à -80°C avant utilisation.

II. Electrophorèse bidimensionnelle

Les expériences d'électrophorèse bidimensionnelle ont été réalisées sur la plateforme de Protéomique de l'IFR53 (Université de Reims Champagne-Ardenne) équipée du matériel Bio-Rad.

1) Principe

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) est une technique permettant la séparation d'un mélange complexe de protéines (O'Farrel, 1975). Le principe de la séparation repose sur la combinaison une première séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique par isoélectrofocalisation (IEF) suivie d'une deuxième séparation en fonction de leurs masses moléculaires apparentes par SDS-PAGE (**Figure 26**).

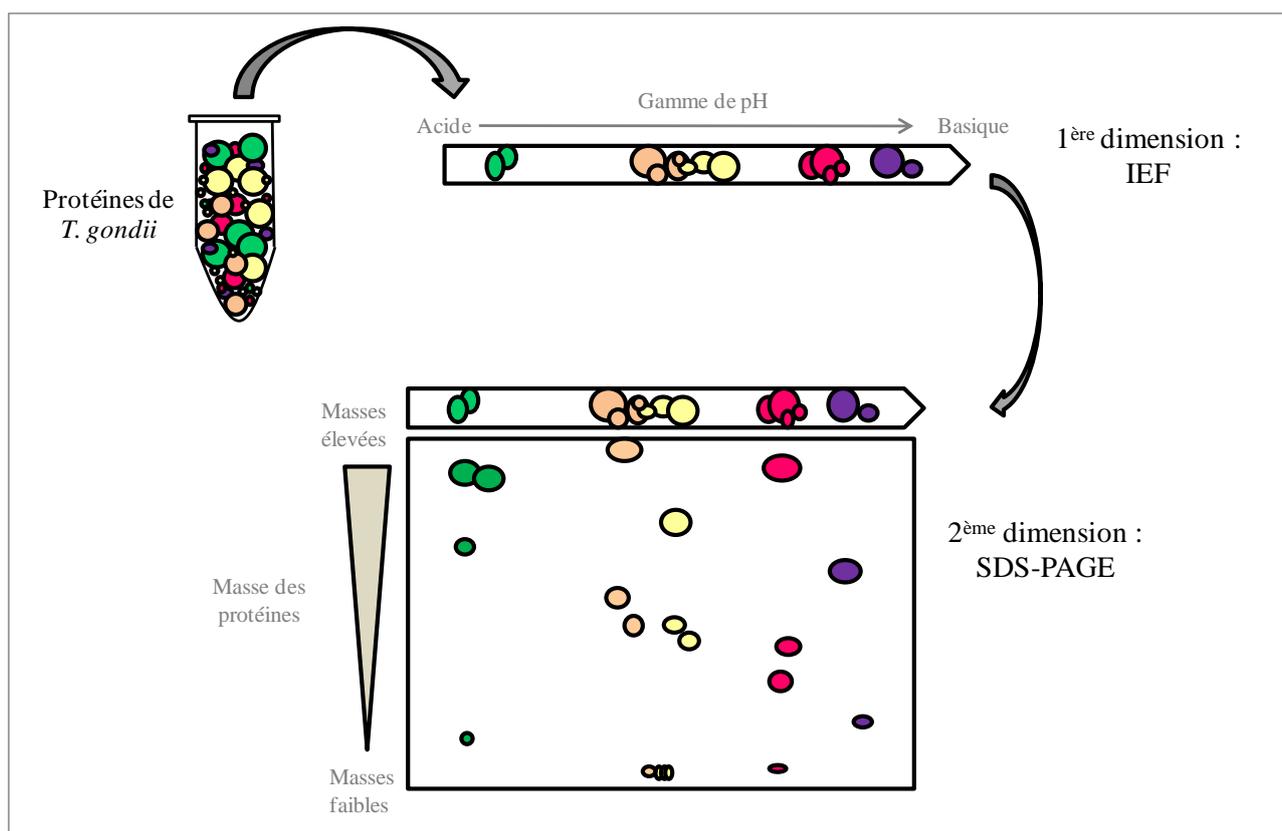


Figure 26. Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle

2) Réhydratation

Les bandelettes de gels de 1^{ère} dimension se présentent sous forme déshydratée, et doivent donc être réhydratées avec un tampon de réhydratation contenant les ampholytes correspondant au gradient de pH utilisé. 250 µg de protéines totales de *T. gondii* sont prélevées et le volume est complété à 400 µL de tampon de réhydratation (**Annexe 9**) pour être déposé dans le plateau de réhydratation.

Une bandelette de gel de polyacrylamide à 4% de pH 3-6, pH 5-8 ou pH 7-10, 17 cm (Ready StripTM IPG Strip, Bio-Rad) est ensuite déposée côté gel contre l'échantillon, l'ensemble est recouvert d'huile minérale pour éviter la déshydratation de la bandelette et incubé à température ambiante toute la nuit sans courant électrique, on parle alors de réhydratation passive.

3) Première dimension IEF

Après une nuit à température ambiante, la bandelette réhydratée contenant l'échantillon est placée dans un sarcophage de 18 cm (possibilité d'utiliser 12 sarcophages, donc 12 échantillons en parallèle), deux buvards hydratés sont placés entre le gel et les électrodes et l'ensemble est recouvert d'huile pour prévenir la déshydratation. Le programme de focalisation correspondant à la gamme de pH choisie sur l'Ettan IPGPhor (GE Healthcare) est ensuite lancé (**Tableau V**). Après l'étape de focalisation, les bandelettes peuvent être congelées à -80°C avant d'effectuer la seconde dimension.

pH 3-6 linéaire	pH 5-8 linéaire	pH 7-10 linéaire
Step 2 h à 500 V	Step 2 h à 500 V	Step 2 h à 500 V
Gradient 8 h à 1 000 V	Gradient 8 h à 1 000 V	Gradient 8 h à 1 000 V
Step 9 h à 8 000 V	Step 5 000 V à 70 000Vh	Step 5 000 V à 80 000 Vh

Tableau V. Programme d'IEF

4) Etape d'équilibration : Réduction et Alkylation

a. Principe

Avant la seconde dimension, deux étapes sont effectuées successivement, visant à réduire puis alkyler les ponts disulfures des protéines tout en équilibrant les protéines dans le SDS. L'étape de réduction favorise la dénaturation des protéines par rupture des ponts disulfures par le DTT. Elle est rendue irréversible par l'alkylation des cystéines avec de l'iodoacétamide qui bloque les thiols libres des résidus cystéines.

b. Mode opératoire

Les bandelettes focalisées sont déposées dans des tubes contenant 30 mL de tampon d'équilibration (**Annexe 10**) additionné de 1 % (p/v) de DTT pour l'étape de réduction, sous agitation pendant 15 min. Puis les bandelettes sont transférées dans des tubes contenant 30 mL de tampon d'équilibration additionné de 2,5 % (p/v) d'iodoacétamide pour l'étape d'alkylation, sous agitation pendant 15 min.

Avant la deuxième dimension, les bandelettes sont conservées dans du tampon d'électrophorèse jusqu'au montage.

5) Deuxième dimension : SDS-PAGE

Douze gels de dimension 250 x 205 x 1,5 mm sont coulés simultanément dans une cassette PROTEAN II xi Multi-Gel Casting Chamber (Bio-Rad). Ces 12 gels migrent simultanément dans une cuve PROTEAN Plus Dodeca Cell (Bio-Rad). Les bandelettes sont déposées en haut de chaque gel à 12,5 % de polyacrylamide (**Annexe 11**), avec un marqueur de poids moléculaire (Dual color, Biorad) déposé sur un papier buvard à côté de la bandelette, et sont scellées au gel par une solution d'agarose chaud à 0,5% (p/v).

La cuve est remplie de tampon de migration 1X (TG-Tampon SDS 10X, Euromedex). La migration se fait ensuite en 2 étapes (**Tableau VI**).

	Temps	Puissance
1 ^{ère} étape	30 min	5W/gel
2 ^{ème} étape	5h30	17W/gel

Tableau VI. Programme de migration de la seconde dimension

6) Coloration des gels au nitrate d'argent

Après démoulage, les gels sont lavés avec de l'eau milliQ pendant 15 min sous agitation. Les protéines sont ensuite fixées toute la nuit dans un mélange méthanol 40% /acide acétique 10 % sous agitation douce. Les gels sont ensuite colorés grâce au kit ProteoSiver (Sigma) conformément aux instructions fournies par le fabricant.

III. Electrophorèse bidimensionnelle différentielle

Les expériences de 2D-DIGE ont été réalisées sur la plateforme de Protéomique du Pr J.M. Wastling (Université de Liverpool, Royaume-Uni) équipée du matériel EttanTM DIGE (GE Healthcare).

1) Principe

L'électrophorèse bidimensionnelle différentielle (2D-DIGE) est une variante de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle. En effet, avant d'être soumis aux deux migrations, les échantillons à étudier sont préalablement marqués par des cyanines fluorescentes spécifiques (Cy3 et Cy5). Un standard interne, contenant un mélange de tous les échantillons de l'expérience est marqué avec une cyanine fluorescente Cy2. Après marquage, les 3 échantillons sont mélangés, résolus sur un seul gel 2D qui est alors scanné suivant les 3 longueurs d'ondes des fluorochromes.

2) Plan de l'étude

Les protéines de quatre échantillons A (A1 à A4) et quatre échantillons B (B1 à B4) ont été extrait comme précédemment décrit. Cinquante microgramme de chacun de ces échantillons protéiques ont été marqués avec les Cy3 ou Cy5 ; un mélange contenant 1/8 de chacun de ces échantillons est marqué avec la Cy2 et l'ensemble est déposé sur quatre gels analytiques DIGE comme suit (**Tableau VII**):

Gels analytiques DIGE	Cy2	Cy3	Cy5
Gel 1	200 µg de standard interne composé de : -1/8 ^{ème} de A1 soit 6,25 µg -1/8 ^{ème} de A2 soit 6,25 µg -1/8 ^{ème} de A3 soit 6,25 µg -1/8 ^{ème} de A4 soit 6,25 µg -1/8 ^{ème} de B1 soit 6,25 µg -1/8 ^{ème} de B2 soit 6,25 µg -1/8 ^{ème} de B3 soit 6,25 µg -1/8 ^{ème} de B4 soit 6,25 µg	50 µg d'A1	50 µg de B1
Gel 2		50 µg d'A2	50 µg de B2
Gel 3		50 µg de B3	50 µg d'A3
Gel 4		50 µg de B4	50 µg d'A4

Tableau VII. Méthode de marquage minimum

Un gel préparatif, contenant un mélange de 300 µg de protéines en quantité égale de tous les échantillons A et B non-marqués, est préparé en parallèle des 4 gels analytiques, et migre dans les mêmes conditions.

3) Marquage minimum

a. Principe

Dans chaque réaction, 50 µg de protéines sont couplés avec les CyDye (Cy2, Cy3 ou Cy5) par une liaison amine entre les CyDye et les résidus lysines. Le ratio utilisé assure que chaque colorant marque approximativement 1 à 2 % de résidus lysine donc que chaque protéine marquée porte seulement un CyDye et est visualisée par un seul spot. Par conséquent, les CyDye DIGE Fluor

minimal dyes marquent seulement une faible quantité de la totalité des protéines de l'échantillon. Pour cette raison, ce type de marquage est appelé marquage minimum.

b. Reconstitution des CyDye

Les CyDye, conservées à -20°C , sont placées à température ambiante pendant 5 min, 5 μL de DMF (Diméthylformamide) sont ajoutés dans chaque tube de colorant afin d'obtenir une solution mère à 1 mM. Les tubes sont vortexés vigoureusement pendant 30 s puis centrifugés 30 s à 12 000 g. Pour chacune des 3 CyDye, la solution de travail (400 μM de CyDye) est obtenue en ajoutant dans un tube propre 1 volume de solution mère de CyDye pour 1,5 volume de DMF. La solution peut être stockée à -20°C et à l'obscurité pendant une semaine.

c. Marquage minimum des échantillons protéiques

La liaison amine entre les résidus lysines et les CyDye étant optimale à un pH compris entre 8 et 9, le pH des échantillons protéiques doit tout d'abord être ajusté à pH 8,5 avec 10 mM de NaOH ou du tampon de lyse. Cinquante microgrammes de protéines sont couplées, avec 1 μL de la solution de travail des CyDye appropriées (Cy2, Cy3 ou Cy5). Le mélange est ensuite vortexé et centrifugé à 12 000 g pendant 30 s, puis incubé dans la glace à l'obscurité pendant 30 min. Afin de stopper la réaction 1 μL d'une solution de lysine à 10 mM est ajoutée dans chaque tube. Le mélange est vortexé et centrifugé à 12 000 g pendant 30 s, puis incubé dans la glace à l'obscurité pendant 10 min. Les échantillons peuvent être stockés à -80°C pendant 3 mois.

4) Réhydratation passive

L'IEF est réalisée en utilisant des bandelettes de gel de polyacrylamide à 4% de pH 3-10 non-linéaire, 24 cm (Immobiline DryStrip, GE Healthcare). Les 5 bandelettes sont réhydratées, dans un plateau de réhydratation, une nuit à l'abri de la lumière avec 450 μL de tampon de réhydratation (**Annexe 12**) contenant 3 x 50 μg de protéines totales (2 échantillons marqués respectivement avec les Cy3 et Cy5, et un standard interne marqué avec la Cy2) pour les 4 bandelettes DIGE et contenant 300 μg de protéines non-marquées pour la 5^{ème} bandelette.

L'ensemble est recouvert d'huile minérale pour éviter la déshydratation des bandelettes.

5) 1^{ère} dimension IEF

Après une nuit à température ambiante, les bandelettes réhydratées sont placées dans une plaque en céramique (IPGphor manifold ceramic tray, GE Healthcare), deux buvards humidifiés sont placés entre le gel et les électrodes et l'ensemble est recouvert d'huile pour prévenir la déshydratation. Le programme de focalisation sur l'Ettan IPGPhor II est ensuite lancé (**Tableau VIII**).

	pH 3-10 non-linéaire
Etape 1	Step 2 h à 500 V
Etape 2	Gradient 8 h à 1 000 V
Etape 3	Gradient 3 h à 10 000 V
Etape 4	Step 4 h à 10 000 V

Tableau VIII. Programme d'IEF

Après l'étape de focalisation, les bandelettes peuvent être congelées à -80°C avant d'effectuer la seconde dimension.

6) Equilibration

L'étape d'équilibration se déroule comme précédemment décrit pour l'électrophorèse bidimensionnelle (section II. 4).

7) Seconde dimension

a. Préparation des gels

Avant utilisation, toutes les plaques en verre (Low Fluorescence Glass plates, GE Healthcare) subissent un lavage minutieux afin d'enlever tous les résidus de gel. Les plaques sont trempées toute la nuit dans une solution de Decon 5 % (v/v), puis rincées à l'eau avant d'être trempées dans une solution de NaOH 10 % pendant 1 h. Les plaques sont ensuite rincées à l'eau, séchées et rincées à l'éthanol juste avant utilisation.

Les plaques sont recouvertes de 2-3 mL d'une solution de bind silane permettant au gel de rester coller à la plaque lors des manipulations (**Annexe 13**).

Deux marqueurs de références (GE Healthcare) sont ensuite déposés sur chaque plaque. Puis les 5 plaques sont disposées dans une cassette Ettan DALT 6 caster (GE Healthcare). Les 5 gels de dimension 260 x 20 x 1 mm contenant 12,5 % de polyacrylamide sont coulés simultanément (**Annexe 14**).

b. Mode opératoire

Les 5 bandelettes sont déposées en haut de chaque gel et sont scellées par de l'agarose chaud à 0,5% (p/v). Les 5 gels sont disposés dans la cuve inférieure de l'Ettan DALT Electrophoresis Unit (GE Healthcare) remplie de tampon de migration 1X et la cuve supérieure est placée et remplie de tampon électrophorèse 2X (**Annexe 15**).

La migration se fait ensuite en 2 étapes (**Tableau IX**).

	Temps	Puissance
1 ^{ère} étape	30 min	5W/gel
2 ^{ème} étape	4 h	17W/gel

Tableau IX. Programme de migration de la seconde dimension pour la 2D-DIGE

8) Coloration au Sypro Ruby

Après démoulage, les gels préparatifs sont lavés avec de l'eau milliQ pendant 15 min sous agitation. Les protéines sont ensuite fixées 1 h dans un mélange méthanol 40% /acide acétique 10 % sous agitation douce. Les gels sont ensuite colorés au Sypro Ruby (Molecular Probes), colorant fluorescent, pendant une nuit sous agitation lente à l'abri de la lumière. Avant d'être scannés, les gels sont lavés pendant 1 h dans un mélange méthanol 10%/ acide acétique 7% sous agitation lente à l'abri de la lumière, puis rincés deux fois 5 min dans de l'eau MilliQ sous agitation à l'abri de la lumière.

IV. Numérisation et analyse des gels

1) Gels de 2-DE

Les gels sont numérisés à l'aide du scanner GS-800TM Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad). Les paramètres utilisés sont les suivants : lumière transmissive, coloration des gels à l'argent et résolution à 63,5 μm . Les gels sont ensuite analysés par le logiciel PDQuestTM (Bio-Rad). Après numérisation, les paramètres de détection (taille minimale et maximale des spots, sensibilité de détection, nature du bruit de fond) sont ajustés pour chaque expérience, puis les spots sont détectés automatiquement par le logiciel. Les différentes classes d'échantillons sont définies (sensibles, résistants induits et résistants naturels). Un *Master gel* (gel fictif) contenant tous les spots détectés dans tous les gels, sert de référence pour établir la correspondance entre les spots dans les différents gels. La correspondance se fait automatiquement sur la base d'une dizaine de spots désignés manuellement (*landmarks*). Les gels sont ensuite normalisés par rapport à l'ensemble des spots détectés dans les gels. Puis les classes sont comparées entre elles. Les spots protéiques montrant une variation d'expression ≥ 2 fois ($p < 0,05$, test t de student) ont été considérés comme exprimés différemment entre les souches. Les spots d'intérêt ont ensuite été excisés par l'EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad) et placés dans une plaque 96 puits dans de l'eau milliQ.

2) Gels de 2D-DIGE

Les gels sont numérisés avec une résolution de 100 μm à l'aide du scanner Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et des filtres d'émission adaptés à chacune des trois cyanines et du SYPRO[®] Ruby (**Tableau X**). Les images des gels ont été analysées dans le logiciel DeCyder v6.5 à l'aide des modules Batch Processor, *Differential In-gel Analysis* (DIA) et *Biological Variation Analysis* (BVA). Le module *Differential in-gel analysis* (DIA), est utilisé pour co-détecter, normaliser et quantifier les spots protéiques exprimés différemment pour chaque gel en utilisant les images cumulées issues des marquages avec les cyanines 2, 3 et 5. Le module *Biological variation analysis* (BVA) permet ensuite d'établir les correspondances inter-gels en disposant une dizaine de repères (*landmarks*) sur chacune des images des références internes et de réaliser les analyses statistiques. Les spots protéiques montrant une variation d'expression $\geq 1,3$ fois ($p < 0,05$, T-test de student) ont été considéré comme exprimés différemment entre les

souches. Les spots d'intérêt ont ensuite été excisés par l'Ettan™ Spot picker v1.2 (Amersham Biosciences) et placés dans une plaque 96 puits dans de l'eau milliQ.

Fluorochromes	Filtre d'excitation	Filtre d'émission
Cy2	480/30 nm	530/40 nm
Cy3	540/25 nm	595/25 nm
Cy5	635/30 nm	680/30 nm
SYPRO® Ruby	480/30 nm	595/25 nm

Tableau X. Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés

V. Digestion enzymatique

1) Gels de 2-DE

Chaque spot d'intérêt, coloré au nitrate d'argent, est soumis à une étape de décoloration selon le kit ProteoSilver (Sigma) conformément aux instructions fournies par le fabricant. Après décoloration, les spots d'intérêt sont conservés dans de l'eau milliQ puis envoyés sur la plateforme de Spectrométrie de Masse Bioorganique de Strasbourg pour l'étape de digestion enzymatique et les analyses par Spectrométrie de Masse.

2) Gels de 2D-DIGE

Chaque spot d'intérêt est tout d'abord soumis à une étape de décoloration. Les spots sont disposés dans des tubes stériles et incubés à deux reprises pendant 10 min à 37°C en présence de 10 µL d'une solution composée de 50 mM d'ammonium bicarbonate et 50% d'acétonitrile (HPLC Grade). Après élimination du surnageant, les spots sont deshydratés pendant 15 min à 37°C en présence de 10 µL d'acétonitrile. Après élimination du surnageant, les tubes sont incubés ouverts à 37°C pendant 10 min jusqu'à ce que la totalité du solvant soit évaporée. Les spots sont ensuite réhydratés avec 10 µL de solution de trypsine à 10 ng/µL dans 25 mM d'ammonium bicarbonate

pendant 1 h à 37°C. Puis 10 µL d'une solution d'ammonium bicarbonate 25 mM est ajoutée dans chaque tube avant incubation à 37°C toute la nuit pour l'étape de digestion enzymatique. Le lendemain, la réaction est stoppée en plaçant les échantillons à -20°C jusqu'à leur utilisation.

VI. Spectrométrie de masse

1) Principe

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Un spectromètre de masse (MS) est composé de quatre parties (**Figure 27**):

- un système d'introduction de l'échantillon, l'échantillon pouvant être introduit sous forme solide, liquide, gazeuse ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, gazeuse,...)
- une source d'ionisation, pouvant être une électronebulisation (électrospray ou ESI) ou un MALDI (désorption-ionisation laser assistée par matrice)
- un analyseur, qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), permettant de mesurer la masse exacte des analytes, comme le temps de vol (TOF) ou la trappe ionique, avec la possibilité de coupler plusieurs analyseurs en tandem (MS/MS)
- un détecteur et un système de traitement, transformant les ions en signal électrique analysable par informatique avec représentation des données avec un spectre de masse.

Afin d'être étudiés en spectrométrie de masse, les spots d'intérêt doivent être piqués sur les gels puis digérés pour en extraire les protéines à identifier.

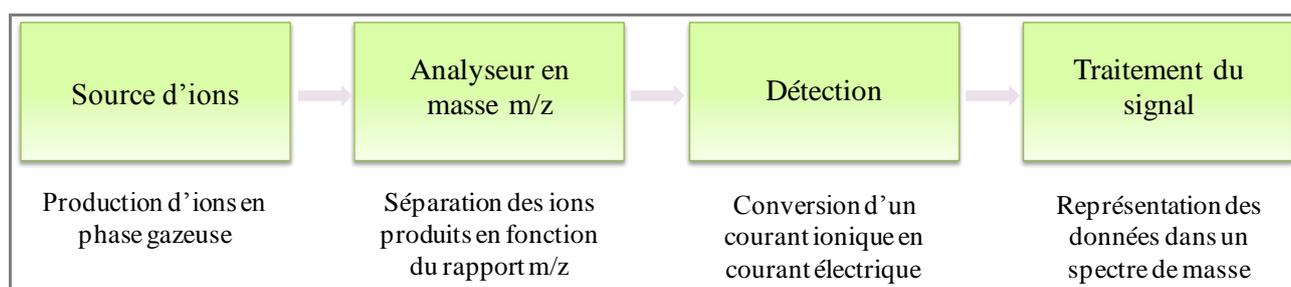


Figure 27. Structure d'un spectromètre de masse

Pour les analyses par spectrométrie de masse, deux types d'analyses ont été réalisées :

- Analyse LC-MS/MS (*Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*)
- Analyse nanoLC-MS/MS (*Nano Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*)

2) LC-MS/MS

Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées sur la plateforme de Protéomique de l'Université de Liverpool (Royaume-Uni) par l'équipe du Pr Jonathan Wastling.

Brièvement, les peptides générés par la digestion trypsique sont extraits et analysés par LC-MS/MS sur un système chromatographique Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Dionex) équipé d'une nano colonne pepMap100 C18 à phase inverse couplé à un spectromètre de masse LTQ ion TRAP (Thermo Electron).

Les données MS/MS obtenues ont été interprétées à l'aide du moteur de recherche Mascot (Matrix Science) (**Tableau XI**).

Mascot MS /MS Ion Search	
Database	ToxoDB
Taxonomie	<i>Toxoplasma gondii</i>
Enzyme	Trypsine
Erreurs de clivage autorisées	1
Modifications fixes	Carbamidomethyl C
Modifications variables	Oxydation M
Tolérance en peptide	± 1.5 Da
Tolérance en MS/MS	± 0.8 Da
Valeurs de masse	MH ⁺
Charge	1+, 2+, 3+ Monoisotopique
Decoy	Taux de faux positifs

Tableau XI. Données fixées pour Mascot MS/MS Ion Search

3) [NanoLC-MS/MS](#)

Les analyses nanoLC-MS/MS ont été réalisées par Tchilabalo Dilezitoko Alayi et le Dr Christine Schaeffer-Reiss du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bioorganique, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de l'Université de Strasbourg.

Brièvement, après réduction, alkylation et digestion à la trypsine (0,05 µg / spot de gel) des protéines présentes dans les spots d'intérêt, les peptides générés par la digestion trypsique sont extraits et analysés par nanoLC-MS/MS sur un système chromatographique Agilent 1200 Series HPLC-Chip/MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) couplé à un spectromètre de masse amaZon ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Les données de MS/MS (**Tableau XII**) obtenues ont été interprétées, à l'aide de deux moteurs de recherche Mascot (Matrix Science) et OMSSA (Open Mass Spectrometry Search Algorithm), ceci dans le but d'augmenter la fiabilité des indentifications, par recherche dans une banque de données restreinte à la taxonomie *Toxoplasma gondii*, extraite de ToxoDB.org. Seules les protéines validées par les deux algorithmes de recherche ont été retenues.

Mascot MS /MS Ion Search et OMSSA	
Database	ToxoDB
Taxonomie	<i>Toxoplasma gondii</i>
Enzyme	Trypsine
Erreurs de clivage autorisées	2
Modifications variables	Carbamidomethyl C Oxydation M Acétylation N-terminal
Tolérance en MS/MS	± 0.25 Da
Charge	Les 6 ions les plus intenses avec une préférence pour 2+ et 3+ Monoisotopique
Decoy	Taux de faux positifs

Tableau XII. Données fixées pour Mascot MS/MS Ion Search et OMSSA

Résultats et Discussion

Partie I. Implication de la surexpression et/ou des polymorphismes des gènes cibles et des ABC transporteurs dans la résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii*

Depuis ces vingt dernières années, le nombre de protozoaires, responsables d'infections graves chez l'Homme, devenus résistants aux antiparasitaires n'a cessé d'augmenter. Par conséquent, de nombreuses études ont été menées dans le but d'identifier l'origine de ces résistances.

Les mécanismes de résistance aux antifolates (pyriméthamine et/ou sulfadiazine) chez *T. gondii* sont encore peu décrits dans la littérature. En revanche, ces mêmes phénomènes de résistance, sont plus largement décrits chez d'autres parasites de même phylum tel que *P. falciparum* et s'expliquent principalement par la présence soit de mutations naturelles ou induites sur les gènes cibles de la voie de synthèse des folates (*dhps* et *dhfr*), soit par celle d'un phénomène d'efflux des drogues (Klokouzas et al., 2004). En effet, chez *P. falciparum*, il a été montré que la résistance à la pyriméthamine serait due à la mutation S108N sur le gène de la DHFR et que cette résistance serait augmentée par l'existence de mutations additionnelles (N51I, C59R, I64L et A16V) ; la résistance aux sulfonamides et aux sulfones résulterait quant à elle de cinq mutations sur le gène de la DHPS (S436A/F, A437G, K540E, A581G, A613S).

Chez *T. gondii*, Aspinall et al. ont démontré la présence de six mutations sur le gène de la DHPS dont la mutation affectant le résidu 407 correspondant à la mutation 437 chez *Plasmodium* (Aspinall et al., 2002). Cette mutation a également été mise en évidence sur une souche (R-Sul^R-5) rendue résistante *in vitro* au sulfaméthoxazole (Pfefferkorn et al., 1992), soulignant l'implication possible de cette mutation dans la résistance aux sulfamides.

Le rôle des P-glycoprotéines (Pgp) et des *Multi Drug Resistance associated protein* (MRP) dans la résistance médicamenteuse a été largement décrit chez les protozoaires. En effet, chez *P. falciparum*, la résistance aux antipaludiques résulterait de l'implication de protéines de transport, telles que les Pgp et /ou les MRP, notamment PfABCB1 (PfMDR1) et PfABCC1 (PfMRP).

Chez *T. gondii*, les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont permis de montrer que l'accumulation et l'efflux des xénobiotiques étaient modulés par les protéines de transport Pgp et MRP (Sauvage et al., 2004) ce qui a conduit à l'identification de la famille des ABC transporteurs toxoplasmiques contenant 24 membres chez *T. gondii* (Sauvage et al., 2006). Par la suite, nous avons étudié les mutations et les variations d'expression des gènes cibles, *dhps* et *dhfr*, ainsi que des ABC transporteurs *TgABC.B1*, *TgABC.B2* et *TgABC.C1* entre les souches sensibles et résistantes à la sulfadiazine afin de caractériser les mécanismes de résistance chez *T. gondii*. Cette analyse a été débutée lors d'une précédente Thèse d'Université (Schmid, 2008). L'analyse statistique nécessitait un échantillonnage plus grand des manipulations en RT-PCRq. Le changement de modèle cellulaire (remplacement des cellules THP-1 par les cellules Vero) nous a conduit à refaire l'intégralité des expériences de RT-PCRq. Les résultats obtenus sur cellules Vero sont concordants avec ceux obtenus sur cellules THP-1. Ces résultats sont présentés sous forme d'une courte communication en cours de soumission.

Article 1

**Sulfadiazine resistance in *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression
nor polymorphisms in therapeutic targets and ABC transporters genes**

Christelle Doliwa, Sandie Escotte-Binet, Dominique Aubert, Virginie Sauvage,
Frédéric Velard, Aline Schmid, Isabelle Villena

En préparation pour soumission.

**Sulfadiazine resistance in *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression
nor polymorphisms in therapeutic targets and ABC transporters genes**

Short Communication

**Christelle Doliwa^{a#}, Sandie Escotte-Binet^{a#}, Dominique Aubert^a, Virginie
Sauvage^a, Frédéric Velard^{b,c}, Aline Schmid^a, Isabelle Villena^{a*}**

^aLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, UFR Médecine, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims cedex, France.

^bPlateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, 51 Rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France.

^cEA 4691 BIOS : Biomatériaux et inflammation en site osseux, SFR CAP-Santé FED 4231, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims cedex, France.

* Corresponding author: Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims cedex, France. Tel: +333-2678-4220; fax: +333-2678-7328.

E-mail address: ivillena@chu-reims.fr (I. Villena)

These authors contribute equally to this work

Abbreviations: Pgp, P-glycoprotein; MRP, multidrug resistance-associated protein; ABC, ATP-binding cassette.

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDJB databases under the accession numbers: **EU213065, EF418617, FJ201251, EU213066, EF418618, EJ201252, EU213067, EF418619, FJ201253, GQ415579, GQ397454, FJ201257, FJ215662, GQ865628, GQ415585, GQ397458, FJ201258, GQ865630, GQ865629, GQ415580, GQ397459, FJ201255, FJ201256, FJ201254, GQ415574, GQ395774.**

Abstract

Several treatment failures have been reported for treatment of toxoplasmic encephalitis, chorioretinitis and congenital toxoplasmosis. Recently we found three *Toxoplasma gondii* strains resistant to sulfadiazine. Common mechanisms of antifolate resistance involve mutations within genes encoding therapeutic targets, *dhps* and *dhfr*. We have also performed the same analysis on three toxoplasmic ABC genes; two Pgp, *TgABC.B1* and *TgABC.B2*, and one MRP, *TgABC.C1* because of the putative involvement of ABC transporters in resistance in *Plasmodium*. To identify genotypic and/or phenotypic markers of resistance, we have sequenced and analyzed the expression levels of *dhps*, *dhfr*, *TgABC.B1*, *TgABC.B2* and *TgABC.C1* on sensitive strains compared to the three resistant strains. Neither polymorphism nor overexpression were identified. Contrary to *Plasmodium*, in which mutations and/or overexpression within Pgp and MRP are involved in antimalarial resistance, *T. gondii* sulfadiazine resistance is not related to these toxoplasmic ABC genes studied.

Keywords

Toxoplasma gondii, sulfadiazine resistance, *dhps*, *dhfr*, ABC transporters, gene expression, polymorphisms.

Introduction, results and discussion

The apicomplexan *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular parasite, can infect humans and a wide range of vertebrates leading to toxoplasmosis. This generally benign affection can cause severe life-threatening disease, particularly in immunocompromised patients and in children with congenital toxoplasmosis [1]. *T. gondii* has a unique population genetic pattern consisting in three predominant clonal lineages, i.e., type I (including RH, a highly virulent strain), type II (including avirulent strains like ME-49 and PRU), and type III (including avirulent strains like NED) [2]. Treatment of toxoplasmosis usually uses a combination of a sulfamide with pyrimethamine which has a remarkable synergistic activity against the replicating form of *T. gondii*, through the sequential inhibition of parasite dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR). These two major enzymes are responsible for the synthesis of the folate compounds that are essential for parasite survival and replication. However, several treatment failures have been reported for treatment of toxoplasmic encephalitis, chorioretinitis and congenital toxoplasmosis [3]. Whether these failures are related to host factors (drug intolerance, malabsorption, compliance) and/or to the development of drug-resistance parasites or a lower susceptibility of the parasite strain is debated. Recently, *in vitro* susceptibilities of 17 *T. gondii* strains belonging to various genotypes were evaluated in the widely used anti-toxoplasmic drugs including sulfadiazine, pyrimethamine and atovaquone. Some variability in the susceptibilities of *T. gondii* strains to pyrimethamine and atovaquone were found but with no clear evidence of drug resistance. On the other hand, a higher variability was found for sulfadiazine with *in vitro* resistance for three strains, TgH 32006 previously described as RMS-1995-ABE, TgH 32045 previously described as RMS-2001-MAU and TgA 103001 previously described as B1, not correlated to strain genotypes or growth kinetics [4].

The molecular basis of resistance to antifolates is well documented in *P. falciparum* and consists of point mutations in genes encoding for both *dhps* and *dhfr*. Resistance to pyrimethamine has been shown to result from a mutation in the DHFR enzyme, changing Ser108 to Asn108, and subsequent mutations (N51I, C59R, I164L and A16V) can greatly increase the level of resistance to this drug. Resistance to sulfonamides and sulfones has been demonstrated to result from mutations within DHPS, like the amino acid changes at five positions (S436A/F, A437G, K540E, A581G, A613/T) [5]. In *T. gondii*, Aspinall et al. (2002) [5], demonstrated by direct sequencing of PCR products, the presence of six mutations at positions 407, 474, 560, 580, 597 and 627 within DHPS. Only the mutation at position 407, which is equivalent to 437 position in *Plasmodium*, was reported as associated to sulfonamides resistance. This mutation was also retrieved in laboratory-induced, sulfamethoxazole-resistant strain (R-Sul^R-5) [6].

We previously demonstrated that accumulation and efflux of xenobiotics from parasites were modulated by P-glycoprotein (Pgp) and Multidrug resistance-associated protein (MRP) inhibitors, indicating their presence and activity in *T. gondii* [7]. Pgp and MRP proteins belong to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily of transporters. So far, we have identified in *T. gondii* genome 24 genes related to the ABC whose expression was detected both in tachyzoite and bradyzoite infectious stages for the three genotypes (I, II and III) [8]. Among these 24 genes, two encode for whole Pgps: *TgABC.B1* (1345 amino acids) [9] and *TgABC.B2* (1407 amino acids) and one encodes for a MRP, *TgABC.C1* (1883 amino acids). Pgp and MRP are widely reported to export xenobiotics and cause drug resistance on tumor cells [10] and protozoan parasites [11] and lead to drug resistance by increasing drug efflux from the cell, thus lowering the effective intracellular drug concentration. The increased activities of the ABC transporters could be due to an increased amount of proteins due to gene amplification or overexpression associated or not to point mutations in the

genomic sequence. In *P. falciparum*, antimalarial resistance involves mutations and/or amplification of one Pgp and MRP genes, *PfABCB1* (alias Pgh1 and *PfMDR1*) and *PfABCC1* (alias *PfMRP*), respectively. Mutations in *PfABCB1* are identified on clinical isolates from different geographical areas. Polymorphisms are observed at five positions-codons 86, 184, 1034, 1042 and 1246. *PfABCB1* overexpression is the only mechanism suggested to date involved in mefloquine resistant parasites [12]. Concerning *PfABCC1*, mutations at position 191His and 437Ser are found to be linked 100% to a decreased quinoline response in south eastern Iranian isolates [13].

To identify genotypic and/or phenotypic markers of resistance, we have sequenced and analyzed the expression levels of the therapeutic targets, *dhps* and *dhfr*, on sensitive strains representative of the three major genotypes [type I (RH), type II (ME-49 or PRU) and type III (NED)] compared to the three described resistant strains among their genotype [TgA 103001 (type I), TgH 32006 (type II) and TgH 32045 (type II variant)]. For the polymorphisms analysis, the type II strain ME-49 was considered as reference, indeed genotype II strains were found in 95% of toxoplasmosis in France. The complete sequence of the 6 exons of the *dhps* gene showed three identical mutations in the exons 2 (E474D), 4 (R560K), and 5 (A597E, two silent mutations) of the sensitive strain RH as well as in the resistant strain TGA 00001; one of the three *in vitro* resistant strains to sulfadiazine (Table 1). This mutation was also found in one recombinant type I/III strain (TgH 32005A previously described as RMS-1994-LEF) and in one atypical strain isolated in French Guyana (TgH 18007A previously described as GUY-2003-MEL), both of them tested as sensitive to sulfadiazine [4]. In the resistant strain TgH 32006, one mutation converting Alanine en Valine at position 587 was found in the exon 5 [4]. The significance of this new mutation on the *dhps* gene demonstrated in one of the three resistant strains remains to be determined. In addition, no mutation was retrieved at the position 407 in the three resistant strains analyzed. As previously

described [4], one silent mutation in the exon 3 (156L) of the *dhfr* gene was found in the two type I strains, the sensitive strain RH and the resistant strain TgA 103001.

The role of ABC transporters have been formally reported to be involved in drug resistance in protozoan [11]. We have sequenced and analyzed the expression levels of *TgABC.B1*, *TgABC.B2* and *TgABC.C1* on three sensitive and the three described resistant strains. The sequencing of *TgABC.B1* (35 exons), *TgABC.B2* (33 exons) and *TgABC.C1* (9 exons) coding regions on the three major genotypes - type I (RH), type II (PRU) and type III (NED) - shows 26, 29 and 27 single nucleotide polymorphisms, respectively. *TgABC.B1* shows 24 sites silent mutations, discriminating the RH, PRU and NED strains. Two mutations, in the exons 1 (A9T) and 35 (K1324Q), lead to changes in amino acids which helped distinguish between type II and non type II *T. gondii* strains (Table 1). Several silent mutations were found on *TgABC.B1* gene according different genotype of strains. Concerning *TgABC.B2*, 22 silent mutations sites, of which 7 single nucleotide polymorphisms helped distinguish between type I and non type I *T. gondii* strains, were identified. TgH 32045 presented one mutation in the exon 18 (L729M) found in the type I strains. *TgABC.C1* gene shows 17 silent mutations in the coding region, of which 10 mutation sites lead to changes in amino acids, discriminating the type I and non type I strains (Table 1). TgH 32045 presented one mutation in the exon 9 (H1659Q) found in the type I sulfadiazine-resistant strain (TgA 103001). This mutation was retrieved on all type I strains studied subsequently (except RH), as well as on atypical strains from special geographical regions, like French Guyana and Brazil (data not shown). The low polymorphism percentage observed for the different genes studied is in concordance with the genetic variation level estimated to be less than 2% among the predominant clonal lineages [14].

	TgABC.B1	TgABC.B2	TgABC.C1	DHPS	DHFR
RH	*(20) T9A,K1285Q Genbank accession no ^a EU213065.1	*(22) S2N, S267N, G368D, I509T, L729M M848L, L883I Genbank accession no ^a EF418617.1	*(19) K7E, D491E, T66SS G672E, H954P, G968A E1125A, S1718R, V1722A, P178SS Genbank accession no ^a FJ201251.1	*(2) E474K, R560K A597E Genbank accession no ^a GQ415579.1	*(1) Genbank accession no ^a GQ397454.1
PRU	0 Genbank accession no ^a EU213066.1	0 Genbank accession no ^a EF418618.1	0 Genbank accession no ^a FJ201252.1	0 Genbank accession no ^a GQ415579.1	0 Genbank accession no ^a GQ397454.1
NED	*(13) T9A,K1285Q Genbank accession no ^a EU213067.1	0 Genbank accession no ^a EF418619.1	0 Genbank accession no ^a FJ201253.1	0 Genbank accession no ^a GQ415579.1	0 Genbank accession no ^a GQ397454.1
TgH 32006	0 Genbank accession no ^a FJ201257.1	0 Genbank accession no ^a FJ215662.1	0 Genbank accession no ^a GQ865628.1	A587V Genbank accession no ^a GQ865628.1	0 Genbank accession no ^a GQ397458.1
TgH 32045	*(1) Genbank accession no ^a FJ201258.1	*(1) L729M Genbank accession no ^a GQ865630.1	K642E, H1659Q Genbank accession no ^a GQ865629.1	0 Genbank accession no ^a GQ415580.1	0 Genbank accession no ^a GQ397459.1
TgA 103001	*(19) T9A, K1285Q Genbank accession no ^a FJ201255.1	*(23) S2N, S267N, G368D, I509T, G816E, M848L, L883I Genbank accession no ^a FJ201256.1	*(23) K7E, D491E, G782A H954P, G968A E1125A, G1440A, H1659Q, S1718R, V1722A, P178SS Genbank accession no ^a FJ201254.1	*(2) E474K, R560K A597E Genbank accession no ^a GQ415574.1	*(1) Genbank accession no ^a GQ415574.1

Table I: Polymorphisms on the therapeutic targets, DHPS and DHFR, and the three ABC proteins, TgABC.B1, TgABC.B2 and TgABC.C1, for three sensitive and resistant strains representative of the three major genotypes (I, II and III) in *T. gondii*. Only the polyphormisms leading to amino acid changes are represented. (*) corresponds to silent mutations. Identification of polymorphic sites of *dhps*, *dhfr*, *TgABC.B1*, *TgABC.B2* and *TgABC.C1* genes were carried out by using PCR amplification and direct sequencing [9]. Strain polymorphisms were analyzed by alignment of the nucleotide sequences according to the ClustalW multiple sequence alignment program at the website of EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

Expression level of each therapeutic target were performed by using standard semi-quantitative real time RT-PCR for the all strains studied. After normalizing transcript levels of *dhps* and *dhfr* to β -tubulin, no significant variation of *dhfr* gene expression was observed between resistant and sensitive strains (Fig 1). However we observed a significant decrease ($p < 0.05$) of *dhps* gene expression in the resistant strain TgH 32006 in comparison to the sensitive ME-49 strain. These results were not consistent with overexpression of therapeutic targets found in *Plasmodium*. Hence, no polymorphism or overexpression of therapeutic targets is involved in *T. gondii* sulfadiazine resistance.

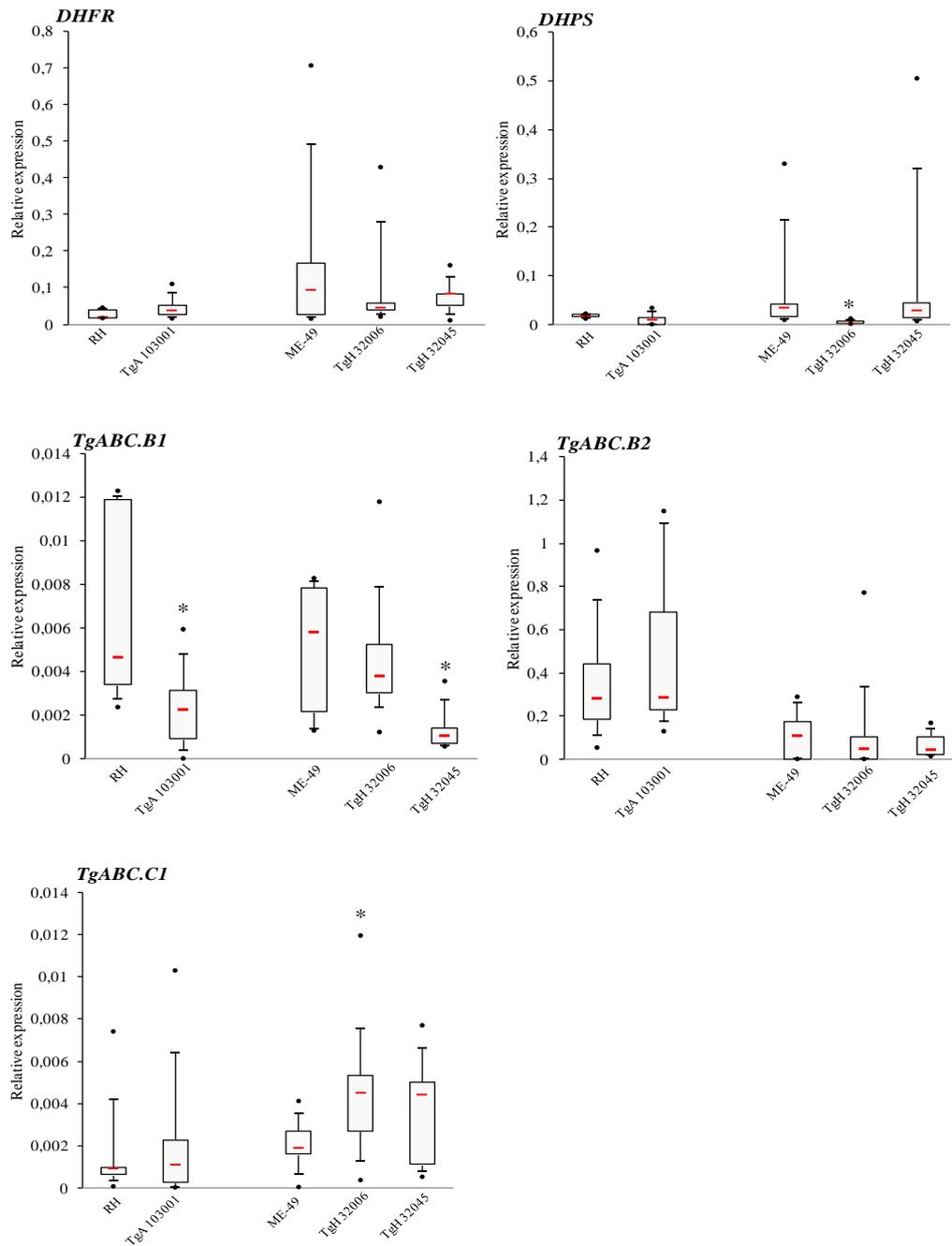


Figure 1: Relative expression of *dhps*, *dhfr*, *TgABC.B1*, *TgABC.B2* and *TgABC.C1* genes on two sensitive strains RH (I) ME-49 (II), and the three resistant strains, TgH 32006, TgH 32045 and TgA 103001 by real-time RT-PCR analysis. The protocol used was previously described [9]. PCR primers (Invitrogen™ life technologies, France) were designed using Primer express 2.0 (Applied Biosystems, USA) to specifically amplify sequences of *dhps*: 5'-TCA TTT CCG TTG ACA CCA TGA-3' (forward) and 5'-TCT CCG GTC TGG TCG TTC AC-3'(reverse), *dhfr*: 5'-CTG GAG GAA GAG TAC AAG GAT TCT GA-3'(forward) and 5'-AAG CAA CGC CCA GAG ACA-3' (reverse), *TgABC.B1*: 5'-GCG TGT GTT TGC ACT GAT TGA-3' (forward) and 5'-TTG CGT TGT CGC TGA ACT TC-3' (reverse), *TgABC.B2* : 5'-CGA TCG TGC AGA TGC TTC AA-3'(forward) and 5'-GCT GTG CAC GCA GAT ACT GAA T-3' (reverse), *TgABC.C1*: 5'-ACA CTC TCC CTT CAT TCA CAA G-3' (forward) and 5'-CAG AAG GTG AAT CAC TGG AAT GG-3' (reverse), and the toxoplasma β -tubulin: 5'-TCT TCC GCC CTG ACA ACT TC-3'

(forward) and 5'-CCG CAC CCT CAG TGT AGT GA-3' (reverse). Results are representative at least five independent experiments at least and presented as a median \pm interquartile spaces (IQs). * $P < 0.05$ represent significant difference between strains (Non parametric exact Wilcoxon-Mann-Whitney test).

The RNA expression levels from the two Pgp and the MRP demonstrate that gene expression seems correlated with the strain genotype, as observed with type I strains which present the highest level of expression for *TgABC.B2* gene. The virulent strains are characterized by a high growth rate compared to avirulent strains, which could involve a greater metabolism and therefore an efficient detoxification mechanism. This could explain the higher expression of *TgABC.B2* in the sensitive RH strain and the resistant TgA 103001 strain (Fig. 1); genes overexpression, including some ABC genes (ABC.G5, ABC1, ABC2), specially for RH versus others type I isolates, have been previously described [15] so we analyzed *TgABC.B2* gene on ENT strain (type I). No variation of *TgABC.B2* gene expression was observed; RH and ENT strains have the same *TgABC.B2* gene expression variability (data not shown).

Moreover we observed statically ($p < 0.05$) no increase of *TgABC.B1* gene expression for the two resistant strains TgA 103001 (type I) and TgH 32045 (type II variant) compared to the sensitive strains RH (type I) and ME-49 (type II). Interestingly, we observed an significant overexpression of *TgABC.C1* ($p < 0.05$) in the resistant strain TgA 32006 compared to the sensitive strain ME-49, but no significant variation of this gene was observed in the two others resistant strains (Fig 1).

In conclusion, we demonstrated that, in the case of *T. gondii*, sulfadiazine resistance do not involved polymorphisms and/or overexpression in DHFR, DHPS, *TgABC.B1* and *TgABC.B2* genes contrary to other parasites like *P. falciparum*. These results imply that resistant mechanisms in *T. gondii* are different. Interestingly, an overexpression of *TgABC.C1* was observed in the type II resistant strains TgH 32006, further studies could be realize to study its involvement in resisatnce

mechanisms. Further studies are in process to investigate the drug resistance mechanisms in *T. gondii* at the protein level, using proteomics approach (difference gel electrophoresis (DIGE)) by comparison between sensitive and sulfadiazine resistant strains. The proteins identification associated with sulfadiazine resistance will allow us to understand the resistance mechanisms implied.

Acknowledgements

This research was funded by a grant from Region Champagne-Ardenne, France, which was awarded to C. Doliwa for completion of her doctorate degree. This work was supported by the “Centre de Ressources Biologiques (CRB) *Toxoplasma*” and the “Centre National de Référence (CNR) de la Toxoplasmose”. We would like to acknowledge R. Geers, N.Ortis E. Dupuis and E. Pisano for kindly providing *T. gondii* parasites.

References

- [1] Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol* 2009; 39:895-901.
- [2] Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995; 172:1561-66.
- [3] Villena I, Aubert D, Leroux B, Dupouy D, Talmud M, Chemla C, Trenque T, Schmit G, Quereux C, Guenounou M, Pluot M, Bonhomme A, Pinon JM. Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group. *Scand J Infect Dis* 1998; 30:295-300.
- [4] Meneceur P, Bouldouyre MA, Aubert D, Villena I, Menotti J, Sauvage V, Garin JF, Derouin F. *Toxoplasma gondii*: *In Vitro* Susceptibility of Various Genotypic Strains to Pyrimethamine, Sulfadiazine and Atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1269-77.
- [5] Aspinall TV, Joynson DH, Guy E, Hyde JE, Sims PF. The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002; 185:1637-43.
- [6] Pfefferkorn ER, Borotz SE, Nothnagel RF. *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to sulfonamides. *Exp Parasitol* 1992; 74:261-70.
- [7] Sauvage V, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM, Millot JM. P-glycoprotein inhibitors modulate accumulation and efflux of xenobiotics in extra and intracellular *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 134:89-95.
- [8] Sauvage V, Millot JM, Aubert D, Visneux V, Marle-Plistat M, Pinon JM, Villena I. Identification and expression analysis of ABC protein-encoding genes family in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 2006; 147:177-92.

- [9] Schmid A, Sauvage V, Escotte-Binet S, Aubert D, Terryn C, Garnotel R, Villena I. Molecular characterization and expression analysis of a P-glycoprotein homologue in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 163:54-60.
- [10] Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:361-98.
- [11] Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. Review. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 167: 81-94.
- [13] Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F, Krishna S. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet* 2004; 364:438-47.
- [13] Ursing J, Zakeri S, Gil JP, Björkman A. Quinoline resistance associated polymorphisms in the pfcrt, pfmdr1 and pfmrp genes of *Plasmodium falciparum* in Iran. *Acta Trop* 2006; 97:352-6.
- [14] Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 2001; 294:161-5.
- [15] Khan A, Behnke MS, Dunay IR, White MW, Sibley LD. Phenotypic and gene expression changes among clonal type I strains of *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* 2009; 8:1828-36.

Résultats complémentaires

Dans la précédente étude, nous avons focalisé notre recherche sur les modulations d'expression des gènes des ABC transporteurs entiers appartenant à la famille des ABC.B, *TgABC.B1* et *TgABC.B2*, et à la famille des ABC.C, *TgABC.C1*. Cependant, les ABC transporteurs de moitié, tel que *TgABC.C2*, ont également la possibilité d'exercer leur activité de transport par dimérisation. Nous avons donc étudié les modulations d'expression du gène *TgABC.C2* dans les souches sensibles et résistantes à la sulfadiazine précédemment étudiées.

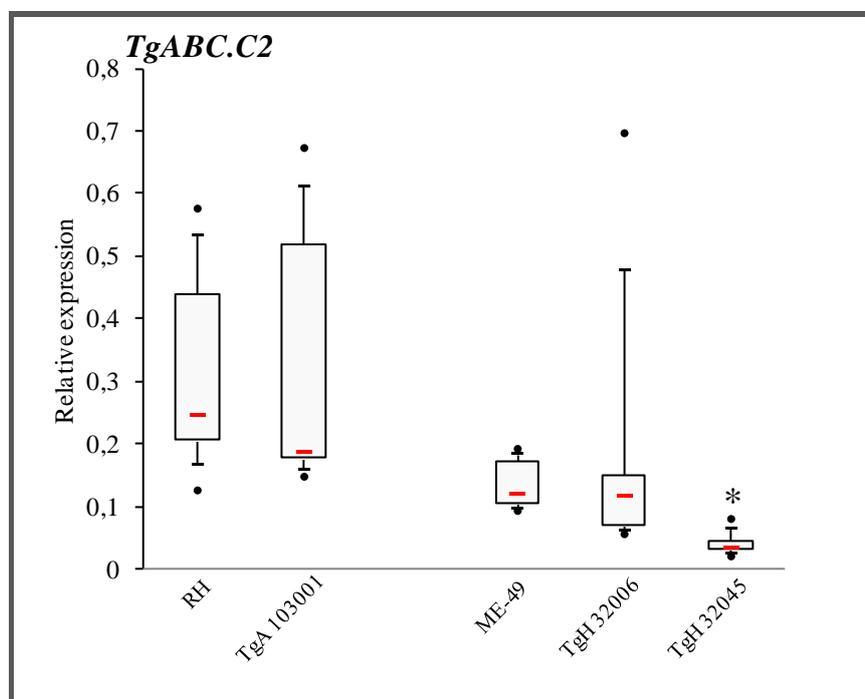


Figure 28. Expression relative du gène *TgABC.C2* sur les deux souches sensibles RH (type I) et ME-49 (type II), et les trois souches résistantes TgA 103001 (type I), TgH 32006 (type II) et TgH 32045 (type II variant) normalisée par rapport au gène de la β -tubuline chez *T. gondii*.

Les résultats sont issus d'au moins cinq expériences indépendantes réalisées en duplicate et présentés comme une médiane \pm interquartiles. * $p < 0,05$ (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

Aucune modulation d'expression de *TgABC.C2* n'est observée entre les souches sensibles et résistantes de type I, RH et TgA 103001, et les souches de type II, ME-49 et TgH 32006. Nous

pouvons observer une sous-expression significative de *TgABC.C2* dans la souche résistante TgH 32045 en comparaison à la souche sensible ME-49 (**Figure 28**).

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

- Les polymorphismes observés sur les gènes cibles *dhps* et *dhfr*, et sur les ABC transporteurs *TgABC.B1*, *TgABC.B2* et *TgABC.C1* ne sont pas liés à la résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii*
- Aucune surexpression des gènes cibles *dhps* et *dhfr* ainsi que des gènes *TgABC.B1*, *TgABC.B2* et *TgABC.C2* n'a pu être observée au niveau des trois souches résistantes TgA 103001, TgH 32006 et TgH 32045.
- Une surexpression significative du gène *TgABC.C1* a par contre été observée dans la souche résistante TgA 32006, surexpression non retrouvée dans les deux autres souches résistantes TgA 103001 et TgH 32045.

Dans cette étude, nous avons montré que les polymorphismes et/ou la surexpression des gènes *dhfr*, *dhps*, *TgABC.B1*, *TgABC.B2* et *TgABC.C2* ne sont pas impliqués dans la résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii* contrairement à d'autres parasites tels que *Plasmodium falciparum*. Cependant, de façon intéressante, une surexpression du gène *TgABC.C1* a été observée chez la souche résistante de type II TgH 32006. Des analyses complémentaires seraient nécessaires afin d'évaluer le rôle de *TgABC.C1* dans les mécanismes de résistance chez *T. gondii*.

Pour la suite de l'étude, nous avons choisi d'étudier les mécanismes de résistance par une approche protéomique en comparant les protéomes des trois souches de *T. gondii* naturellement résistantes à la sulfadiazine aux protéomes de souches sensibles.

Partie II. Identification par DIGE de protéines différemment exprimées entre souches sensibles et résistantes à la sulfadiazine chez *T. gondii*

Récemment, en collaboration avec l'équipe du Pr Derouin, nous avons évalué, *in vitro*, les niveaux de sensibilité vis-à-vis des principaux antitoxoplasmiques utilisés (sulfadiazine, pyriméthamine et atovaquone) sur 17 souches de *T. gondii* par mesure de la concentration minimale inhibitrice dite CI_{50} (Meneceur et al., 2008). Ces travaux ont permis d'identifier trois souches résistantes *in vitro* à la SDZ : TgA 103001 (précédemment décrite comme B1), TgH 32006 (précédemment décrite comme RMS-1995-ABE) et TgH 32045 (précédemment décrite comme RMS-2001-MAU). Ces souches ont montré des $CI_{50} > 50$ mg/mL de SDZ sur cellules MRC-5 en comparaison aux autres souches étudiées dont les CI_{50} étaient comprises entre 3 et 18,8 mg/mL de SDZ. Les différences de niveaux de sensibilité autorisent à parler de résistance *in vitro* pour ces trois souches.

Les mécanismes déjà décrits pour *P. falciparum* comme étant responsables de la résistance aux antifolates (surexpression et/ou polymorphisme des gènes cibles et/ou des ABC Transporteurs) n'étant pas impliqués dans la résistance de nos souches naturellement résistantes à la sulfadiazine, nous avons décidé d'entreprendre une étude portant sur l'identification de protéines impliquées dans la résistance chez *T. gondii* en utilisant une approche protéomique. Les protéomes des trois souches résistantes à la SDZ ont ainsi été comparés, par DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*), aux protéomes de souches sensibles à la SDZ de même génotype.

Dans notre étude nous avons choisi de comparer le protéome de la souche résistante TgA 103001 (Type I) à celui de la souche de référence de génotype I RH, précédemment décrite comme souche sensible à la SDZ. Les protéomes des souches résistantes TgH 32006 (Type II) et TgH 32045 (Type II variant) ont été comparés au protéome de la souche de référence de génotype II ME-49, précédemment décrite comme souche sensible à la SDZ. La souche TgH 32045 a précédemment été décrite comme souche atypique, son étude

phylogénétique l'inclut cependant dans le groupe des souches de génotype II à cause de son fond génétique.

L'étude des modulations d'expressions protéiques entre souches sensibles et résistantes, nous a permis de sélectionner 68 spots protéiques présentant une différence d'expression de 1,3 fois ($p \leq 0,05$, test t de Student). L'analyse par LC-MS/MS de ces spots a permis d'identifier 31 protéines exprimées différemment entre toutes ces souches.

Parmi ces 31 protéines, quatre nous semblent être intéressantes en raison de leur présence dans deux expériences de DIGE : ENO2 et IMC1 ont montré des variations d'expressions dans la comparaison des protéomes TgA 103001/RH et TgH32045/ME-49, ROP2A et MIC2 ont été retrouvés dans la comparaison des protéomes des souches de type II TgH 32045/ME-49 et TgH 32006/ME-49. Ces résultats ont été complétés par une étude quantitative de l'expression de ces quatre gènes d'intérêts.

Article 2

**Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant
and sensitive strains of *Toxoplasma gondii* using difference-gel
electrophoresis (DIGE)**

Christelle Doliwa, Dong Xia, Sandie Escotte-Binet, Emma L. Newsham, Sanya
J. Sanderson, Dominique Aubert, Nadine Randle, Jonathan M. Wastling,
Isabelle Villena

Re-soumis après révisions dans *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug
resistance* en Octobre 2012.

Title: Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant and sensitive strains of *Toxoplasma gondii* using difference-gel electrophoresis (DIGE)

Authors: Doliwa Christelle¹, Xia Dong², Escotte-Binet Sandie^{1,3}, Newsham Emma L.², Sanderson Sanya J.², Aubert Dominique^{1,3}, Randle Nadine², Wastling Jonathan M.² and Villena Isabelle^{1,3*}

Name of institutions:

¹Protozooses, transmises par l'alimentation : circulation et pathogénie, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex, France

²Institute of Infection & Global Health, Faculty of Health and Life Sciences, University of Liverpool, Brownlow Hill, Liverpool L69 7ZJ, United Kingdom

³BRC *Toxoplasma* and NRC on Toxoplasmosis, Hôpital Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France

***Corresponding author:**

Mailing address: Pr Isabelle Villena
45 rue Cognacq-Jay
51092 Reims Cedex, France.
Tel: +33 3 2678 4220
Fax: +33 3 2678 7328
E-mail: ivillena@chu-reims.fr

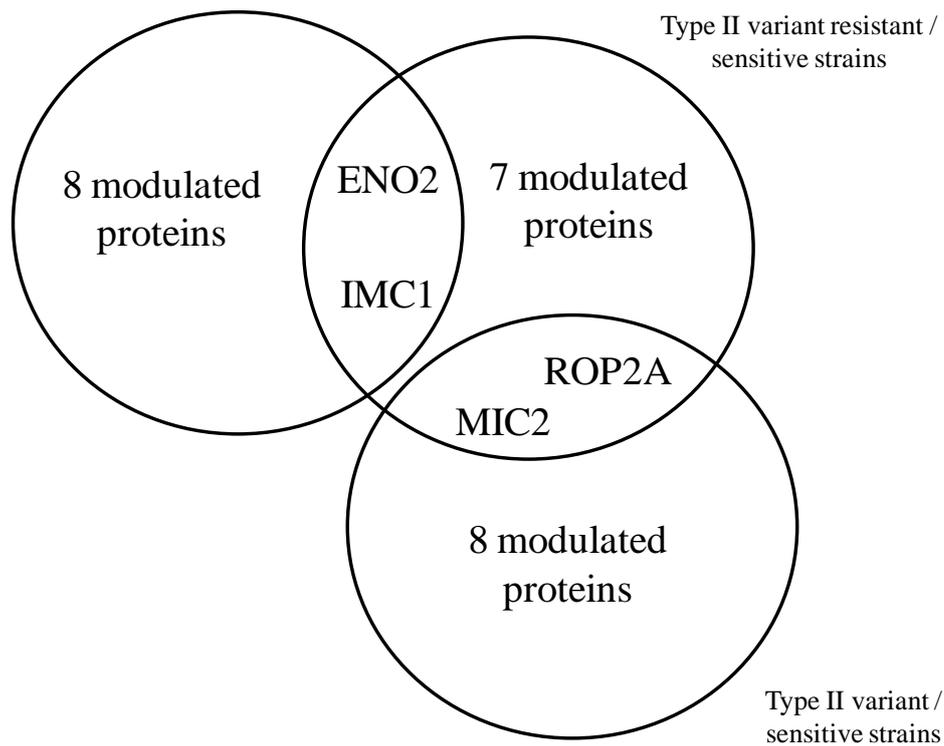
Note: Supplementary data associated with this article

Abstract

Treatment options for toxoplasmosis in humans are generally limited to the use of sulfonamide and/or pyrimethamine-based compounds. However, there is increasing evidence for clinical therapy failures in patients suggesting the existence of drug resistance in these classes of drug. *In vitro* resistance to sulfadiazine has been detected in three strains of *Toxoplasma gondii* isolated from clinical cases. In order to begin to understand the mechanisms of resistance, we undertook a difference-gel electrophoresis (DIGE) approach combined with mass spectrometry to identify proteins that are differentially expressed in sulfadiazine-resistance strains of the parasite. Naturally resistant strains TgA 103001 (Type I), TgH 32006 (Type II) and TgH 32045 (Type II variant) were compared to sensitive strains RH (Type I) and ME-49 (Type II) using DIGE and the modulated proteins analyzed using LC-MS/MS. In total, 68 differentially expressed protein spots were analyzed by mass spectrometer and 31 unique proteins, including four hypothetical proteins, were identified. Among the differentially expressed proteins, 44% were over-expressed in resistant strains and 56% were over-expressed in sensitive strains. The virulence-associated rhostry protein, ROP2A, was found in greater abundance in both naturally resistant Type II strains TgH 32006 and TgH 32045 compared to the sensitive strain ME-49. Enolase 2 and IMC1 were found to be in greater abundance in sensitive strains RH and ME-49, and MIC2 was found to be more abundant in the sensitive strain ME-49. In addition, gene expression patterns of ROP2, MIC2, ENO2 and IMC1 were analyzed with qRT-PCR. This study provides the first proteomics insights into sulfadiazine resistance in *T. gondii* resistant strains isolated from clinical cases.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, drug resistance, sulfadiazine, DIGE, mass spectrometry

Abbreviations: EF1- α , Elongation factor 1 alpha; eIF-5A, Translation initiation factor 5A; ENO2, Enolase 2; GRA2, Dense granule protein 2; GRA7, Dense granule protein 7; G3PDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Hsp70, Heat shock protein 70; Hsp90, Heat shock protein 90; MIC1, Microneme protein 1; MIC2, microneme protein 2; PP2C, Protein Phosphatase 2C ; ROP2, Rhoptry protein 2; ROP9, Rhoptry protein 9; small Hsp20, small heat shock protein 20; TgCDPK1, *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 1.

Graphical abstract**Highlights**

- Treatment failure in toxoplasmosis implies the possibility of drug resistance in *Toxoplasma*.
- *In vitro* resistance to sulfadiazine detected in three strains of *T. gondii*.
- Comparison of sensitive and sulfadiazine resistant strains by 2D-DIGE.
- Identification of 31 proteins differentially expressed in sensitive and resistant strains.

1. Introduction

Toxoplasma gondii, the causative agent of toxoplasmosis, is an obligate intracellular protozoan parasite that infects more than one-third of the world's human population. The population structure of *T. gondii* consists of three main clonal lineages (Type I, II and III) correlated with virulence expression in mice. Recently, a study reveal a biphasic pattern consisting of regions in the Northern Hemisphere where a few, highly clonal and abundant lineages predominate; elsewhere, and especially in portions of South America are characterized by a diverse assemblage of less common genotypes that show greater evidence of recombination (Su et al., 2012).

Most infections are asymptomatic in humans, but *T. gondii* can cause severe clinical diseases such as encephalitis or systemic infection in immuno-compromised patients, particularly individuals with HIV infection and in cases of congenital toxoplasmosis (Weiss and Dubey, 2009). This disease can be fatal if untreated in immuno-compromised patients and current therapeutic options for the treatment of toxoplasmosis are limited to combinations of sulfonamides and pyrimethamine. In congenital infection, treatment with this combination could improve prognosis of illness (McLeod et al., 2006). These drugs have a synergistic action on *T. gondii* folate synthesis by inhibiting two major enzymes: dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR) which are essential for parasite survival and replication. Nevertheless several treatment failures have been reported for the treatment of toxoplasmic encephalitis, chorioretinitis, and congenital toxoplasmosis (Danneman et al., 1992; Katlama et al., 1996; Torres et al., 1997; Baatz et al., 2006; Petersen et al., 2007). Several pharmacological parameters may contribute to these failures: malabsorption, drug intolerance, compliance or tissue diffusion. However, given the target of

drugs used in the treatment of toxoplasmosis, the existence of factors of resistance or lower susceptibility depending on the parasite strain may be suspected.

Recently, Meneceur et al. (2008) evaluated the sulfadiazine susceptibilities of 17 *T. gondii* strains *in vitro* by calculating IC_{50} according to a method developed by Derouin and Chastang (1988). At the present time only three strains (TgA 103001 previously described as B1 (type I strain), TgH 32006 previously described as RMS-1995-ABE (type II strain) and TgH 32045 previously described as RMS-2001-MAU (Type II variant strain)) are resistant to sulfadiazine, as defined by an IC_{50} value for sulfadiazine > 50 mg/liter on MRC5 cells in comparison with the other strains studied which had IC_{50} ranging from 3 to 18.8 mg/liter. No apparent correlation with strain genotype or to mutations in known drug target genes were found for these three strains (Meneceur et al., 2008). Thus, the mechanism of resistance to sulfadiazine in *T. gondii* remains unclear.

The use of proteomic techniques offers an excellent platform to investigate aspects of numerous biological processes, like acquired drug resistance. Thus, proteomics approaches have been demonstrated as a very powerful tool in investigating drug resistance mechanisms in several parasites, such as *Trypanosoma cruzi* (Andrade et al., 2008) and *Leishmania spp* (Kumar et al., 2010). In the *T. cruzi* study, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was used to analyze the differentially expressed proteins of *T. cruzi* with selected *in vivo* and *in vitro* resistance to benznidazole and their susceptible clones: the identification of 56 proteins among which 27 novel proteins were identified as over-expressed in the resistant phenotype, have provided valuable information for the investigation of the resistance mechanisms in *T. cruzi* (Andrade et al., 2008). By using 2-DE, Kumar et al. (2010) compared the proteome

profile of membrane-enriched, as well as cytosolic proteins of resistant and sensitive Indian *Leishmania donovani*: twenty differentially expressed proteins were identified, including ABC transporters and Hsp83 already known to be implicated in the resistance mechanisms of *L. donovani* (Vergnes et al., 2007; Castanys-Munoz et al., 2008). Moreover, several proteomics studies have been performed on *T. gondii*, for example Xia et al. (2008) characterized the proteome of *T. gondii* tachyzoites and identified nearly one-third of the entire proteome. Nelson et al. (2008) employed a quantitative proteomic approach to investigate the modulation of host cells by *T. gondii* invasion; they provided evidence for global reprogramming of cell metabolism and demonstrated the intimate relationship between pathogen and host. However, none of the proteomic studies have investigated the resistance mechanisms of *T. gondii* to sulfadiazine.

The present study aimed to investigate differentially expressed proteins in natural sulfadiazine resistant and sensitive strains of *T. gondii* by using difference gel electrophoresis (DIGE). In addition, qRT-PCR was performed on some proteins identified as differentially regulated to complement results obtained from the proteomic analyses. The identification of proteins that are associated with sulfadiazine resistance will improve our understanding of the resistance mechanisms and enhance the development of new treatments of toxoplasmosis.

2. Materials and methods

2.1. *Toxoplasma gondii* strains

Five strains of *T. gondii* tachyzoites were used in this study: RH (type I, sensitive strain), TgA 103001 (type I, resistant strain), ME-49 (type II, sensitive strain), TgH 32006 (type II, resistant strain) and TgH 32045 (defined as Type II variant, resistant strain). Indeed this strain was phylogenetically included in the type II cluster because of its type II genetic background, as described by Ajzenberg et al., (2004). All strains studied were provided by the French Biological Resource Center *Toxoplasma* (BRC *Toxoplasma*, France) and are previously described (Meneceur et al., 2008). All BRC *Toxoplasma* strains were genotyped by using a multiplex PCR designed for multiloci strains typing with 15 microsatellites markers (Ajzenberg et al., 2010).

2.2. Cell culture

T. gondii tachyzoites were maintained on African green monkey kidney (Vero) cell monolayers (ATCC, CCL-81) at 37°C in a 5 % CO₂ humidified incubator. Cells and parasites were grown in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen) supplemented with 2 % (v/v) fetal calf serum (Biowest), 1 % (v/v) L-glutamine (GIBCO), and antibiotics (100 IU/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin) (GIBCO). The parasites were routinely checked for *Mycoplasma spp.* contamination and found to be negative using a *Mycoplasma spp.* real-time PCR (Ishikawa et al., 2006). Parasite growth rates varied depending on strain genotypes (Meneceur et al., 2008); host cells were infected at different parasite to cell ratio to synchronize parasite culture and to obtain extracellular parasites in 4 days for all strains studied [multiplicity of infection used in the study was (parasite:cell): 1:1 for the type I

strains, 4:1 for the type II strains and 6:1 for the type II variant strain]. After 24 h, cells and parasites were washed once in PBS 1X (pH 7.4) to eliminate extracellular parasites. Then the intracellular multiplication of tachyzoites was observed (8 to 32 tachyzoites per rosace) until the fourth day post-infection when tachyzoites were harvested from culture and the *Toxoplasma* stage preparation was verified by qRT-PCR by using tachyzoites markers and bradyzoites markers (**supplemental data 1**). Parasites used in this study were cultivated from passages 3 to 9 on Vero cells. For 2D-DIGE analysis, four samples of parasites came from the same cell culture passage. For qRT-PCR analysis, we used six samples: one sample came from the same passage than in 2D-DIGE and the five others samples came from additional passages. Then, parasites were separated from host cells by filtration through 3 μ m polycarbonate filters (Whatman International). Tachyzoites were washed twice with PBS (pH 7.4) with centrifugation at 1500 \times g for 20 min at 4°C. For protein analysis, parasites were then counted, pelleted and stored at -80°C in batches at least of 2×10^8 parasites. For each strain studied, four replicates of the same culture were used. For gene expression analysis, parasites were counted and total RNA was extracted as described in 2.10 section.

2.3. Preparation of tachyzoites

Frozen tachyzoite pellets were solubilized in lysis buffer (8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 40 mM Tris base) containing DNase/RNase and protease inhibitors (Roche); and subjected to three rapid (2 min) cycles of freezing in liquid nitrogen / defrosting at 30°C with vigorous vortexing. Samples were centrifuged at 13,000 \times g for 30 min at 4°C. Samples were then precipitated with the 2D-Clean up Kit (GE Healthcare), resuspended in 50 μ L of sample buffer (8 M urea, 2 % (w/v) CHAPS) and the concentration was determinate using Protein assay kit (BioRad). Protein samples were minimally labeled with CyDye according the

manufacturer's protocols (GE Healthcare). Briefly, 50 µg of sample was labeled with 400 pmol of Cy3 or Cy5 fluorochromes dissolved in DMF for 30 min at 4°C in the dark. Labelling reactions were quenched by the addition of 10 mM lysine for 10 min at 4°C in the dark. Four different aliquots of sensitive strains and four different aliquots of resistant strains were compared for each experiment. An internal standard was prepared by pooling equal amounts of protein from each biological sample in the experiment. This was labeled with Cy2 dye and then was included in all the gels run.

2.4. DIGE

The DIGE workflow consisted in four analyzed gels, each containing one aliquot of sensitive and one aliquot of resistant strains, and one preparative gel used to pick the interest spots. A total of 150 µg of protein per gel containing the internal standard (Cy2-labeled), sensitive strain tachyzoites (Cy3-labeled for gels 1 and 2, Cy5-labeled for gels 3 and 4) and resistant strain tachyzoites (Cy5- labeled for gels 1 and 2, Cy3-labelled for gels 3 and 4) were mixed together and separated on the four 2D-gels. One gel including 300 µg of standard protein sample was used as preparative gel. The 24 cm non-linear, pH 3–10, IPG strips (GE Healthcare) were rehydrated with 0.45 mL rehydration buffer (8 M urea, 2 % (w/v) CHAPS w/v, 18 mM DTT and 2 % (v/v) IPG buffer, pH 3–10) containing the 150 µg of protein. IEF was performed with an IPGphor II unit (GE Healthcare) up to a total of 65 kVh according to manufacturer's instructions. Before the second dimension, strips were equilibrated twice in 10 mL equilibration buffer (6 M urea, 30 % (v/v) glycerol, 2 % (v/v) SDS, 75 mM Tris-HCl, pH 8.8), first for 15 min adding 1 % (w/v) DTT and secondly for 15 min by adding 2.5 % (w/v) iodoacetamide. Strips were sealed with 0.5 % (w/v) agarose to 12.5 % (v/v) polyacrylamide gels and proteins were separated in 1× running buffer (25 mM Tris-base, 192 mM Glycine,

0.2 % (w/v) SDS) in the bottom chamber and 2× running buffer in the top chamber at 5 W/gel for 0.5 h and 17 W/gel thereafter in an Ettan Dalt Six unit (GE Healthcare).

2.5. Sypro Ruby staining

Total proteins on the preparative gel were visualized by staining with Sypro Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes). The gel was fixed in 40 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) acetic acid overnight and then stained in Sypro Ruby. Before scanning, the gel was washed for 1 hour in 10 % (v/v) methanol and 7 % (v/v) acetic acid and rinsed twice in distilled water for 5 min.

2.6. Image analysis and statistics

Proteins were visualized using Ettan DIGE Imager 1.0 (GE Healthcare) with CyDye filters. For the Cy2, Cy3 and Cy5 fluorochromes, the excitation wavelengths were respectively 480/30 nm, 540/25 nm and 633/30 nm and emission wavelengths were 530/40 nm, 595/25 nm and 680/30 nm. All gels were scanned at 100 µm resolution. Image analysis was carried out with DeCyder 2D software version 6.5 (GE Healthcare). The DIA (Differential In-Gel Analysis Module) was used to co-detect, normalize with the internal standard from each 2D-gels and differentially quantify the protein spots in the image. The matching of the different maps from each gel and the statistical analysis of protein variation between samples (resistant/sensitive) was performed by the BVA (Biological Variation Analysis Module) (Alban et al., 2003; Marouga et al., 2005). Protein spots which appeared in at least 9 out of 12 images with greater than 1.3-fold changes ($p \leq 0.05$, Student t-test) were considered as differentially expressed between strains.

2.7. In-gel tryptic digestion

Protein spots of interest were excised from the gel and gels plugs were incubated twice at for 37°C for 10 min in 50 mM ammonium bicarbonate/50 % acetonitrile. Gels plugs were then dehydrated with 100 % (v/v) acetonitrile at 37°C for 15 min and rehydrated with 10 µL of 10 ng/µL sequencing grade trypsin in 25 mM ammonium bicarbonate at 37°C for 1 h. Then, 25 mM ammonium bicarbonate was added to cover the gel pieces, which were left at 37°C overnight. The reaction was stopped with 2 µL of 2.6 M formic acid and the samples were stored at -20°C (Xia et al., 2008).

2.8. MS analysis (LC-MS/MS)

Mass spectrometry analyses were performed using an LTQ ion-trap mass spectrometer (Thermo Electron) coupled on-line to a Dionex Ultimate 3000 (Dionex) HPLC system equipped with a nano pepMap100 C18 reversed phase column (75 µm; 3 µm, 100 Angstroms). Water and solvents were all HPLC grade. The column was equilibrated in 97.9 % (v/v) water / 2 % (v/v) acetonitrile / 0.1 % (v/v) formic acid (FA) at a flow rate of 300 nL/min. Sample injections of 15 µL of tryptic peptides were loaded onto a C18 TRAP, desalted and washed for 3 min at a flow rate of 25 µL/min prior to being loaded onto a nano pepMap100 C18 column at 300 nL/min. The peptides were eluted at a flow rate of 300 nL/min with a linear gradient of 0-50 % (v/v) acetonitrile / 0.1 % (v/v) FA over 30 min, followed by 80 % (v/v) acetonitrile/ 0.1 % (v/v) FA for 5 min. The column was then equilibrated in 97.9 % water / 2 % acetonitrile / 0.1 % (v/v) FA for 5 min (total run time per sample was 50 min). Ionised peptides were analysed in the mass spectrometer (0-106 m/z, global and Msx) using the “triple play” mode, consisting initially of a survey (MS) spectrum

from which the three most abundant ions were determined (threshold = 200-500 TIC). Collision energy was set at 35 % for 30 min. The charge state of each ion was then assigned from the C13 isotope envelope “zoom scan” and finally subjected to a third MS/MS scan. The LTQ was tuned using a 500 fmol/ μ L solution of glufibrinopeptide (m/z 785.5, $[M=2H]^{2+}$) and calibrated according to the manufacturer’s instructions. The resulting MS/MS spectra (data files) were merged into an mgf file, which was submitted to Mascot searching. Mascot searching was carried out on a local Mascot server against gene annotations from ToxoDB version 7.2 (<http://toxodb.org/toxo/>). MS/MS Ion Search was used to search the data output from the LTQ. Database search parameters included: fixed carbamidomethyl modification of cysteine residues; variable oxidation of methionine; a peptide tolerance of \pm 1.5 Da; MS/MS tolerance \pm 0.8 Da; +1, +2, +3 peptide charge state; and a single missed trypsin cleavage. Instrument was set as ESI-TRAP.

2.9. GO analysis

GO descriptions of the proteins identified were retrieved from ToxoDB 7.2. The remaining proteins were mapped onto UniProt DB using GI numbers to obtain GO descriptions.

2.10. RNA extraction and qRT-PCR analysis

The *Toxoplasma* stage preparation was controlled through the stage-specific markers *sag1*, *bag1* and *eno1* by qRT-PCR (**supplemental data 1**). These genes were chosen as bradyzoite markers [*bag1* (Bohne et al., 1995) and *eno1* (Holmes et al., 2010)] and tachyzoite markers [*sag1* (Burg et al., 1988)]. Total RNAs of each strain were extracted using the RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer’s instructions. One microgram of total RNA was reverse transcribed to cDNA using the iScript Transcription Supermix (Bio-Rad, USA)

according to the manufacturer's instructions. The qRT-PCR was performed using the IQTM SYBER[®] Supermix kit (Bio-Rad) with an iCyclerTM iQ real-time PCR Detection system (Bio-Rad). PCR primers (InvitrogenTM life technologies, France) were designed using ProbeFinder Version: 2.45 (Roche Applied Science) to specifically amplify sequences of *rop2*: 5'-TCA CGC TTC AGC TCA TAA GG-3' (forward) and 5'-GAA AAT CGG CAT GCA CAA G-3'(reverse); *mic2*: 5'-GGG GTA TGT GCT GTT GAC G-3' (forward) and 5'-GTG GCA TTT CCG CAA GAC-3' (reverse); *eno2*: 5'-GCG ACC AGA AGG GTA TTG AC-3' (forward) and 5'-AGC CCC ACT CGT TCT TAG TTC-3' (reverse); *imc1*: 5'-GAA CGC TTG CTC AAG GAG A-3' (forward) 5'-TTG AAG ACC TGC TCC ACC TT-3' (reverse); and *toxoplasma β-tubulin*: 5'-TCT TCC GCC CTG ACA ACT TC-3' (forward) and 5'- CCG CAC CCT CAG TGT AGT GA-3' (reverse). The PCR profile was 3.5 min at 95°C, 40x (15s at 95°C, 1 min at 60°C) and 1 min at 80°C.

2.11. Statistical analysis

The mRNA levels of *rop2*, *mic2*, *eno2* and *imc1* genes were normalized to housekeeping *toxoplasma β-tubulin* gene using the $2^{-\Delta Ct}$ method. All real time qRT-PCR experiments were performed in duplicate; values are expressed as a median \pm interquartile spaces (IQs) of Ct values, and analyzed using a non-parametric exact Wilcoxon-Mann-Whitney test (StatXact software, CytelStudio7). The statistically significant differences level was defined as * p<0.05 and ** p<0.01.

3. Results

3.1. Identification of differentially expressed proteins

For this study, we used a 2D-DIGE approach to identify proteins associated in natural resistance mechanisms to sulfadiazine (**supplemental data 2**). Protein abundance was compared between sulfadiazine sensitive and resistant strains from *T. gondii* with same genotype: RH *versus* TgA 103001 (type I), ME-49 *versus* TgH 32006 (type II) and ME-49 *versus* TgH 32045 (Type II variant). Proteins spots which appeared with at least a 1.3-fold change ($p \leq 0.05$) between resistant and sensitive strains were used for analysis.

Fourteen protein spots were identified in the type I strain: only one, identified as an hypothetical protein, of them increased in the resistant strain TgA 103001 and 13 increased in the sensitive RH strain (**Table 1**).

Eighteen protein spots were in different abundance in type II strains: 17 of them were over-expressed in the resistant strain TgH 32006 and one in the sensitive strain ME-49 (**Table 2**).

Fifteen protein spots were identified in the type II variant strain: five of them over-expressed in TgH 32045 and 10 were over-expressed in the sensitive ME-49 strain (**Table 3**)

Table 1

Spot number	Accession no ^a	Protein name	MW/pI ^b	Score ^c	Sequence coverage	Identified peptides ^d	Average ratios
Carbohydrate metabolism							
1921	TGME49_056760	Pyruvate kinase	58120/6.36	632	16	17	-1,74
2859	TGME49_032350	Lactate dehydrogenase	36095/6.29	99	3	2	-1,91
2060	TGME49_068850	Enolase 2	52765/6.84	266	10	6	-1,68
2051	TGME49_068850	Enolase 2	52765/6.84	293	7	5	-2,27
Protein folding							
1484	TGME49_073760	Heat shock protein 70, putative	73291/4.82	366	10	11	-1,41
Host cell interaction							
3076	TGME49_043730	p36 protein, ROP9	37986/8.37	380	13	11	-1,31
Others/Unknown functions							
1967	TGME49_061950	ATP synthase beta chain, putative	60107/6.86	382	6	6	-1,74
1860	TGME49_101440	CAM kinase, CDPK family, TgCDPK1	65893/6.39	253	4	4	-2,55
1244	TGME49_043960	Ras-GTPase-activating protein binding protein, putative	84372/9.43	122	2	4	-1,78
1781	TGME49_033110	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative	59409/7.07	323	15	12	-1,51
1614	TGME49_031630	Membrane skeletal protein IMC1, putative	50596/5.85	87	1	2	-1,81
1494	TGME49_016970	Hypothetical protein, conserved	69027/5.39	434	13	13	-1,3
2240	TGME49_009600	Hypothetical protein	50398/4.92	155	6	4	-1,77
2214	TGME49_013030	Hypothetical protein	35249/4.31	161	8	4	1,37

Table 1: Identification by LC-MS/MS of *T. gondii* differentially expressed proteins from Type I strains: resistant strain (TgA 103001) versus sensitive strain (RH).

^a Gene Identification in ToxoDB.

^b Theoretical molecular weight and pI.

^c MASCOT score.

^d Number of identified peptides.

^e Average volume ratio of the spots (resistant versus sensitive) with $p < 0.05$, Student's *t*-test.

Table 2

Spot number	Accession no ^a	Protein name	MW/pI ^b	Score ^c	Sequence coverage (%)	Identified peptides ^d	Average ratios
Carbohydrate metabolism							
1630	TGME49_089690	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36629/7.25	87	13	3	3,86
1523	TGME49_089690	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36629/7.25	181	13	3	1,59
Host cell interaction							
1609	TGME49_015780	Rhoptry kinase family protein ROP2A	66748/6.91	75	4	3	2,12
698	TGME49_001780	Microneme protein 2	77584/4.41	74	4	4	-1,62
2148	TGME49_027620	28 kDa antigen (GRA2)	19805/10	64	18	11	1,82
2056	TGME49_014080	Toxofilin	26789/10.13	481	23	16	1,43
2077	TGME49_014080	Toxofilin	26789/10.13	167	12	4	1,37
1645	TGME49_070320	Protein Phosphatase 2C, putative	58675/4.72	122	2	2	1,46
Translation							
2533	TGME49_051810	Translation initiation factor eIF-5A, putative	17468/5.03	113	13	3	1,49
1043	TGME49_086420	Elongation factor 1 alpha, putative	49006/9.39	628	26	12	1,75
1354	TGME49_086420	Elongation factor 1 alpha, putative	49006/9.39	249	12	6	2,59
1069	TGME49_086420	Elongation factor 1 alpha, putative	49006/9.39	191	7	3	1,63
1362	TGME49_086420	Elongation factor 1 alpha, putative	49006/9.39	67	7	3	2,29
1448	TGME49_086420	Elongation factor 1 alpha, putative	49006/9.39	311	13	3	1,47
1272	TGME49_086420	Elongation factor 1 alpha, putative	49006/9.39	107	10	5	1,98
1593	TGME49_086420	Elongation factor 1 alpha, putative	49006/9.39	111	13	7	1,55
1848	TGME49_062620	Gbp1p protein, putative	31761/9.29	202	9	6	1,45
1505	TGME49_110640	Uridine phosphorylase, putative	33043/7.12	83	6	2	1,58

Table 2: Identification by LC-MS/MS of *T. gondii* differentially expressed proteins from Type II strains: resistant strain (TgH 32006) versus sensitive strain (ME-49).

^a Gene Identification in ToxoDB.

^b Theoretical molecular weight and pI.

^c MASCOT score.

^d Number of identified peptides.

^e Average volume ratio of the spots (resistant versus sensitive) with $p < 0.05$, Student's *t*-test.

Table 3

Spot number	Accession no ^a	Protein name	MW/pI ^b	Score ^c	Sequence coverage (%)	Identified peptides ^d	Average ratios
Carbohydrate metabolism							
793	TGME49_068850	Enolase 2	52765/6.84	95	4	3	-1,44
Host cell interaction							
1684	TGME49_003310	Dense granule protein 7	25919/5.06	88	4	2	-1,42
2138	TGME49_003310	Dense granule protein 7	25919/5.06	78	11	4	1,59
634	TGME49_091890	Microneme protein 1	48629/4.94	53	7	2	-2,22
721	TGME49_091890	Microneme protein 1	48629/4.94	69	9	5	-1,42
622	TGME49_091890	Microneme protein 1	48629/4.94	159	9	7	-1,49
560	TGME49_001780	Microneme protein 2	77584/4.41	81	2	2	-2,03
1760	TGVEG_030040	Rhoptry kinase family protein ROP2A	66748/6.91	68	2	2	1,51
832	TGME49_033480	SRS29C (=SRS2, p35)	39120/7.3	72	3	6	-2,36
Protein folding							
2200	TGME49_032940	Small heat shock protein 20, putative	21035/5.36	88	14	5	1,31
839	TGME49_044560	Heat shock protein 90, putative	96824/4.7	65	6	4	-2,96
Others/Unknown functions							
1318	TGME49_031630	Membrane skeletal protein IMC1, putative	50172/5.85	302	5	6	-2,04
2330	TGME49_014790	Mitochondrial glycoprotein domain containing protein	31444/4.39	52	3	2	1,42
2366	TGME49_077240	Nucleoside triphosphatase I	69157/6.21	151	10	9	2,23
2317	TGME49_058870	Hypothetical protein	61948/4.65	125	3	2	-1,32

Table 3: Identification by LC-MS/MS of *T. gondii* differentially expressed proteins from Type II strains: resistant strain (TgH 32045) versus sensitive strain (ME-49).

^a Gene Identification in ToxoDB.

^b Theoretical molecular weight and pI.

^c MASCOT score.

^d Number of identified peptides.

^e Average volume ratio of the spots (resistant versus sensitive) with $p < 0.05$, Student's *t*-test.

However, some proteins were detected in more than one gel spot, most likely representing isoenzymes, proteins with post-translational modification or protein degradation. When the redundancy was removed, 13 unique protein identifications were acquired from the 14 spots identified from the genotype I strains (RH and TgA 103001); 10 unique protein identifications acquired from the 18 spots identified from the type II strains (ME-49 and TgH 32006); and 12 unique protein identifications acquired from the 15 spots identified from the type II variant strain (ME-49 and TgH 32045). In total, 31 proteins, including four hypothetical proteins, were identified from the three experiments, 44% were over-expressed in resistant strains and 56% were over-expressed in sensitive strains. Interestingly, GRA7 was identified in two gel spots and showed contradictory expression changes in these gel spots: one appearing more abundant in TgH 32045 and the other one in ME-49.

3.2. Gene ontology analysis of the identified proteins

The 27 identified proteins (excluding hypothetical proteins) were annotated by GO analysis. Modulated proteins were classified into five functional groups (**Fig. 1**) such as carbohydrate metabolism (four proteins: pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, ENO2 and G3PDH), host cell interaction (nine proteins: ROP9, ROP2A, MIC1, MIC2, GRA2, GRA7, Toxofilin, PP2C and SRS29C), translation (two proteins: eIF-5A and EF1- α), protein folding (three proteins: small Hsp20, Hsp70 and Hsp90) and nine proteins as the group others/unknown functions. None of the proteins identified were found in all three of the experiments but four proteins were common to two of the strain comparisons. For example, ENO2 and IMC1 are under-expressed in the resistant strains TgA 103001 (Type I) and TgH 32045 (Type II variant) in comparison to the sensitive strains RH and ME-49. MIC2 is under-expressed in the Type II resistant strains, TgH 32006 and TgH 32045, in comparison to the sensitive strain ME-49 while ROP2A is over-expressed in TgH 32006 and TgH 32045 than in ME-49. Nevertheless, we confirmed by Western Blotting proteins regulation of several interesting proteins identified in DIGE (ENO2, IMC1, ROP2, MIC2 and GRA7) in the different strains studied (**supplemental data 3**).

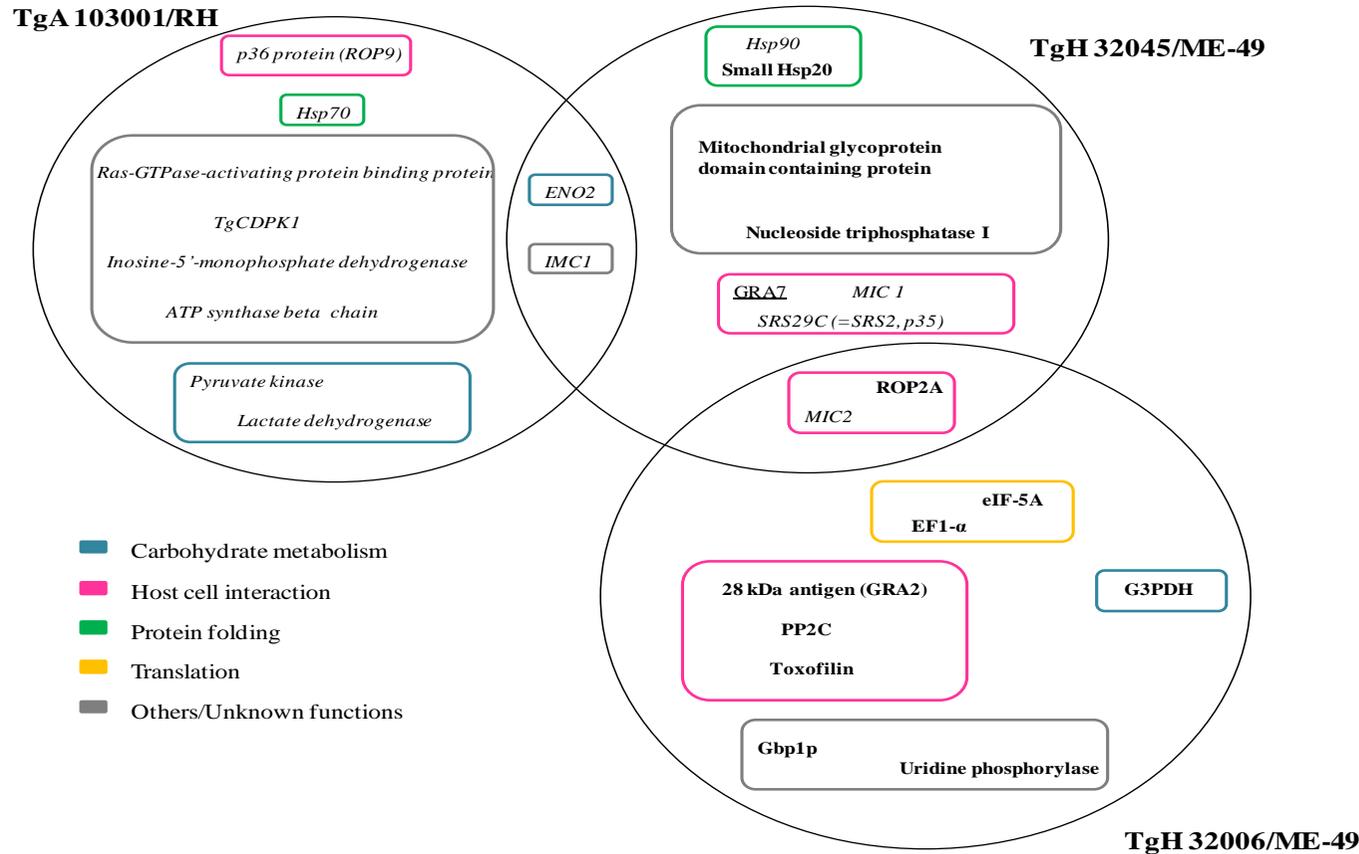
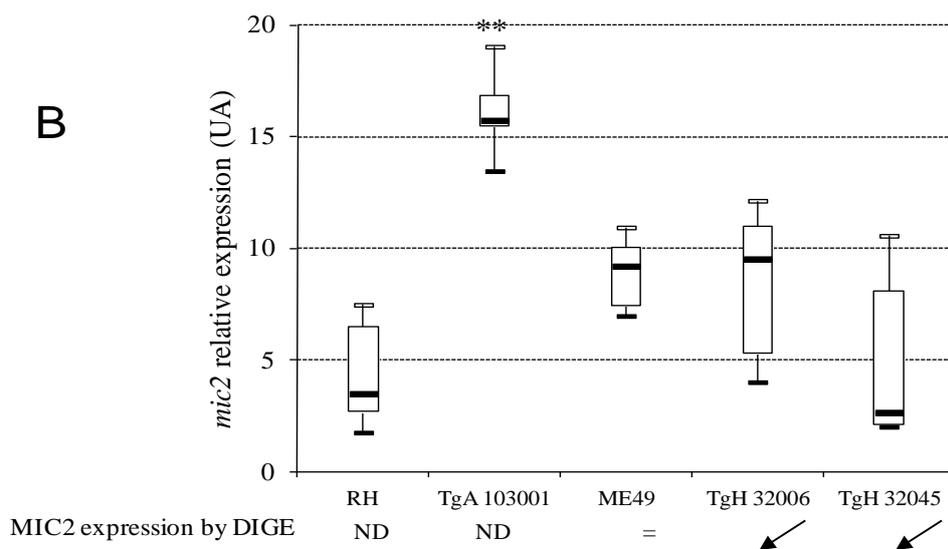
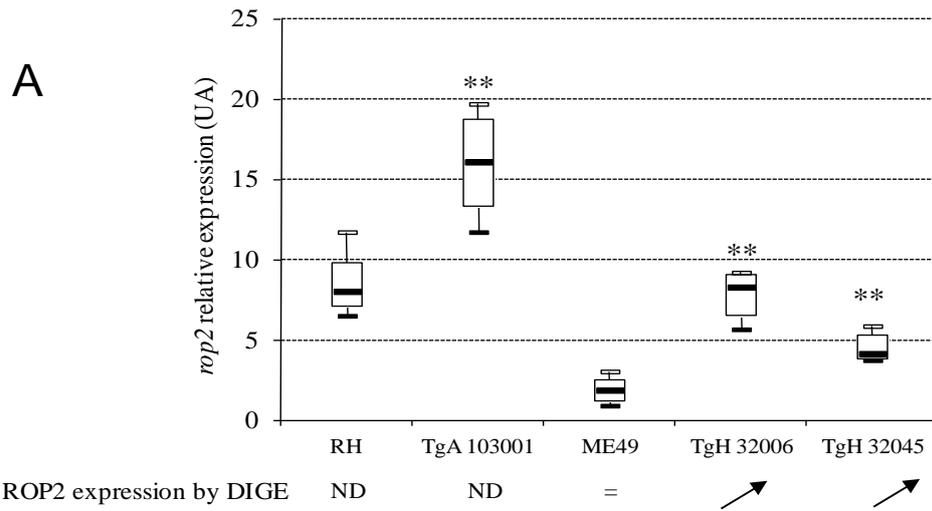


Figure 1: View of protein expression sets identified as differentially regulated in three comparative strains comparison (without hypothetical proteins). Modulated proteins are shown for each resistant isolate compared to either RH or ME-49 sensitive parasites. Protein function is indicated by colored boxes. Intersections show protein changes identified which were common to each resistant isolate. Proteins over-expressed in resistant strains (TgA 103001, TgH 32045 and TgH 32006) are written in bold. Proteins under-expressed in resistant strains are written in italics. Proteins identified in multiple gel spots and showing contradictory expression changes in different gel spots are underlined.

3.3. Confirmation of differentially expressed proteins at the mRNA level

In order to verify the *Toxoplasma* stage preparation, gene expression levels of *sag1* (tachyzoites markers) *bag1* and *eno1* (bradyzoites markers) were analyzed by qRT-PCR. Our results showed that only *sag1* gene expression was highly expressed for all strains studied (**supplemental data 1**), this confirms the presence of only tachyzoites in our samples.

Then, to confirm the differential expression of proteins common to two of the strain comparisons, gene expression levels of *rop2*, *mic2*, *eno2* and *imc1* were determined by qRT-PCR (**Fig. 2**). For the type II strains, the results showed that the transcription levels of *rop2* (*significant at $p < 0.01$*) (**Fig. 2A**) and *eno2* (*significant at $p < 0.05$*) (**Fig. 2C**) were consistent with the protein levels identified by DIGE. For the type I strains, ROP2 and MIC2 proteins were not identified as differentially expressed by DIGE but their gene expression levels were significantly (*$p < 0.01$*) more abundant in the resistant strain TgA 103301 (**Fig. 2A and B**); *eno2* gene showed different expression patterns between the transcription and protein expression levels (**Fig. 2C**): ENO2 protein was more expressed in the sensitive strain RH while *eno2* expression level is significantly reduced in the RH strain (*$p < 0.01$*). No modulation of *imc1* gene expression was observed between sensitive and resistant strain whichever the genotype (**Fig. 2D**).



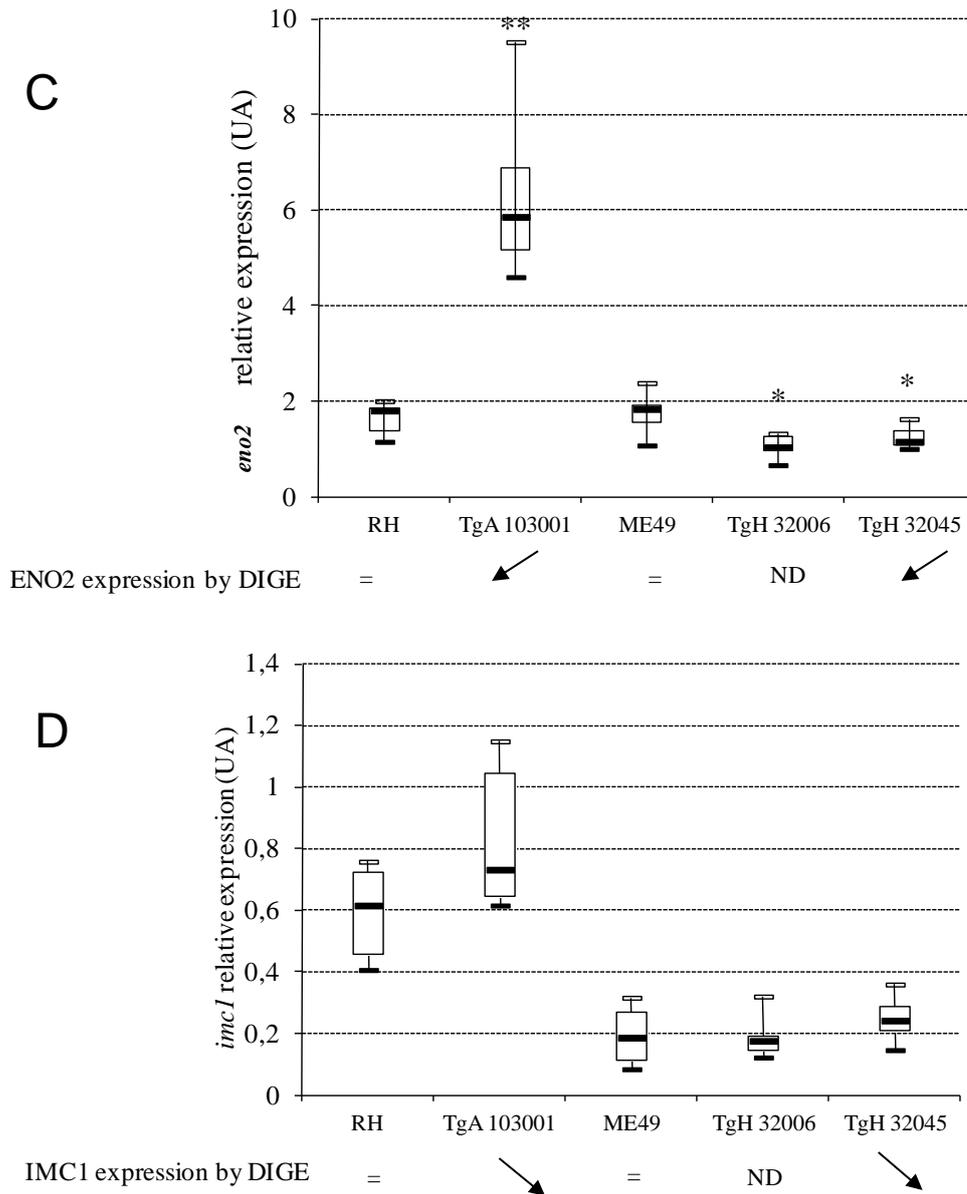


Figure 2: Relative expression of *rop2*, *mic2*, *eno2* and *imc1* genes by real-time qRT-PCR analysis. The mRNA levels of *rop2*, *mic2*, *eno2* and *imc1* genes were normalized to housekeeping *toxoplasma* β -*tubulin* gene. Results are representative of six independent experiments and presented as median \pm interquartile space (IQs) of relative variation of Ct values between RH/TgA 103001 strains, ME-49/TgH 32006 strains and ME-49/TgH32045 strains. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ represent significant difference between strains (Non parametric exact Wilcoxon-Mann-Whitney test). ND: not determined.

4. Discussion

There is increasing evidence for the emergence of strains of *T. gondii* that are resistant to treatment with sulfonamide and/or pyrimethamine-based compounds. In collaboration with Meneceur et al. (2008), we have recently isolated three strains of *T. gondii* resistant to sulfadiazine. As there is no apparent correlation with strain genotype or to mutations in drug target genes, in this study we used a proteomics approach to investigate the basis of drug resistance in these resistant strains.

We identified 31 unique proteins, including four hypothetical proteins, differentially expressed between resistant and sensitive strains to sulfadiazine. Some of the proteins which exhibited modulation between resistant and sensitive parasites were associated with carbohydrate metabolism (G3PDH, ENO2, lactate dehydrogenase and pyruvate kinase). These four proteins are involved in the glycolysis mechanism that plays important roles in stage conversion in *Toxoplasma* (Tomavo, 2001) and in the closely related protozoan parasite *Neospora caninum* (Marugán-Hernández et al., 2010). Here, the purity of *Toxoplasma* stage preparation was controlled through the stage-specific markers SAG1, BAG1 and ENO1 (**supplemental data 1**). Moreover, several proteins identified in this study were previously found as markers of the tachyzoite stage: p36 protein (ROP9) (Reichmann et al., 2001) and ENO2 (Tomavo, 2001) exclusively expressed in tachyzoites.

Among the differentially expressed proteins, a notable contribution of ENO2 has been reported in methotrexate resistance, an antifolate drug used in the treatment of cancer and autoimmune diseases (Selga et al., 2008). Kumar et al. (2010), in *Leishmania donovani*, have shown that the over expression of ENO2 in antimony derived resistant strains (sodium

antimony gluconate, an anti-leishmanial drug). In this study, we found that ENO2 was over-expressed in the two sensitive strains which could show a difference in pathways of the drug resistance mechanisms between these parasites. It has been proposed that differential expression of enolase in protozoan parasites may serve as a strategy for these parasites to adapt to different environmental conditions (Kibe et al., 2005).

In the present work, three heat shock proteins were identified to be differentially expressed in resistant and sensitive strains: small Hsp20, Hsp70 and Hsp90. HSPs are a family of proteins induced in many disease processes. In protozoan systems, a link between HSP and development and intracellular survival has been established (Shonhai et al., 2010). Hsp70 and Hsp90 were found more expressed in the sensitive strains; this could be explained by the higher necessity of the sensitive strains to facilitate the protein folding.

Moreover, we identified many proteins with differential expression which were associated with host cell interaction. In *T. gondii*, MIC proteins, including MIC1 and MIC2 identified in this study, are implicated in cellular processes including gliding motility, active cell invasion and migration (Carruthers and Tomley, 2008). Toxofilin is an actin binding protein which is associated with PP2C and secreted into host cells during invasion (Jan et al., 2007), although the main role of toxofilin remains unclear (Lodoen et al., 2010). *T. gondii* dense granule proteins participate in the modification of the parasitophorous vacuole (PV), which provides an unusual and highly specialized environment for parasite growth and development (Smith, 1995). Previous studies have shown that GRA2, a dense granule protein of *T. gondii* plays a role in protein trafficking to the dense granules, secretion into the vacuole, association with vacuolar membranes, induction of the membranous nanotubular network formation and

organisation of the parasites within the vacuole (Travier et al., 2008) and in this study the abundance of 28kDa antigen (GRA2) was higher in the resistant strain TgH 32006 compared to the sensitive strain. Another dense granule protein, GRA7, was identified from two separate gel spots with fluctuating expression in the comparison between TgH 32045 and ME-49. This would suggest that post-translational modification or processing generated the modulation observed. This modulation of GRA7 alongside an increase in NTPase I within the TgH 32045 strain is interesting as both of these proteins are known to play a role in the virulence of *T. gondii* tachyzoites (Nischik et al., 2001; Choi et al., 2010). Our results indicated that SRS29C protein (=SRS2, p35), a SAG-1 Related Sequence member, was over-expressed in the sensitive strain ME-49. SRS2 protein was also found to be highly abundant in the ME-49 strain in comparison to the highly virulent strain RH but the correlation with virulence is unknown (Manger et al., 1998).

In toxoplasmosis treatment, sulfonamides inhibit parasite replication by interfering in folate synthesis and also in purine biosynthesis. Indeed, folic acid is an important cofactor in purine biosyntheses. IMP dehydrogenase (IMPDH) is an enzyme which catalyzes the NAD-dependent conversion of IMP to XMP in the *de novo* purine nucleotide synthetic pathway. IMPDH was shown to be increased significantly in cancer cells and therefore considered to be a sensitive target for cancer chemotherapy (Franchetti and Grifantini, 1999), but also for *T. gondii* (Sullivan et al., 2005), and *C. parvum* (Sharling et al., 2010).

In this study we used a 2-DE approach to analyze proteome changes. However, visualization of membrane proteins in 2-DE gels is poor which limits our observation of proteins such as ABC transporters, or hydrophobic proteins like the ROP2-8 family (Ajioka

and Soldati, 2007) due to their poor solubility (Rabilloud et al., 2010). Moreover the solubilization protocol used in this study was not adapted for membrane proteins which require a carefully balanced hydrophilic and lipophilic environment (Rabilloud, 2009).

Nevertheless, clear differential protein expression was observed in resistant strains and by comparing results between themselves, several protein changes were common to more than one isolate. ROP2A and MIC2 were found to be modulated in both TgH 32006/ME-49 and TgH 32045/ME-49; ENO2 and IMC1 were found regulated in both TgA 103001/RH and TgH 32045/ME-49. The comparison of the protein expression with gene expression reveals some interesting discrepancies. Gene expression levels of *rop2* and *eno2* were consistent with their protein expression (results of DIGE) for Type II strain. No modulation of *imc1* gene expression was observed between sensitive and resistant strain whichever the genotype. On the other hand, gene expression of *eno2* was contradictory with protein expression in Type I strains, this may be due to post-translational modifications or protein degradation. Moreover *eno2* and *mic2* expression levels were increased in the resistant Type I strain but not in the two resistant type II strains, indicating that resistant mechanisms could be different among the strain genotype. In order to examine the intimate and complex relationship between transcription and translation, Wastling et al. (2009) reviewed advances in proteomic and transcriptomic in the Apicomplexa and many discrepancies between these types of data were highlighted. Indeed, numerous studies showed the presence of proteomic evidence and little or no mRNA expression evidence (detected by ESTs or microarrays) in the same analysis and vice versa. It is known that certain types of proteins may be under-represented in proteomic analysis due to their physicochemical composition, low levels of expression or high rates of turn-over and degradation.

One important point, of this study, is the possibility of variation in proteins levels due to strain to strain variation between parasites. Indeed in this study we compared proteomes of sensitive and resistant *T. gondii* strains from same genotype in order to identify sulfadiazine resistance mechanisms, and we found several proteins regulated in different abundance. However, no comparison by DIGE was presented here between two sulfadiazine sensitive strains of same genotype. Nevertheless, we confirmed by Western Blotting proteins regulation of several interesting proteins identified in DIGE (ENO2, IMC1, ROP2, MIC2 and GRA7) in the different strains studied. We also analyzed these proteins regulation in two others sensitive strains of genotype I (ENT) and genotype II (PRU), and we found the same results as in DIGE (**supplemental data 3**). However we not excluded that differentially expressed proteins identified in our study may be due to strain to strain variation and not only to sulfadiazine resistance. Further proteomic studies using strains of *T. gondii* where sulfadiazine resistance has been induced by *in vitro* methods are also warranted.

In conclusion we have identified 31 proteins which are differentially modulated between sulfadiazine resistant and sensitive strains of *T. gondii* according to their genotype. These proteins were predicted to be involved in several different mechanisms such as carbohydrate metabolism, host cell interaction and protein translation. Although none of them allow us to identify directly resistance mechanisms to sulfadiazine at this stage, several of these proteins represent encouraging potential targets to be followed-up.

Acknowledgments

We thank Dr S. Tomavo (University Lille, France) for his helpful discussion and providing ENO2 and IMC1 antibodies, and we thank Dr JF Dubremetz (University Montpellier, France)

for providing MIC2 and ROP2 antibodies. This research was funded by a grant from Region Champagne-Ardenne and Roche Laboratory, which was awarded to C. Doliwa for completion of a doctorate degree. We thank the BRC *Toxoplasma* for providing strains of this work and the Proteomics and Functional Genomics Group, University of Liverpool, for their contribution to proteomic instrumentation support.

References

- Ajioka, J.W., Soldati, D., 2007. *Toxoplasma* molecular and cellular biology. Horizon Biosciences, Norfolk.
- Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., Dardé, M.L., 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34(10), 1185-1196.
- Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., Dardé, M.L., 2010. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 48(12):4641-4645.
- Alban, A., David, S.O., Bjorkesten, L., Andersson, C., Sloge, E., Lewis, S., Currie, I., 2003. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 3, 36–44.
- Andrade, H.M., Murta, S.M., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirdé, P., Romanha, A.J., 2008. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J. Proteome Res.* 7(6), 2357-2367.
- Baatz, H., Mirshahi, A., Puchta, J., Gumbel, H., Hattenbach, L.O., 2006. Reactivation of *Toxoplasma* retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 14, 185–187.
- Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D.J., Heesemann, J., 1995. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (*hsp30/bag1*) of

Toxoplasma gondii, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. Mol. Microbiol. 16(6), 1221-1230.

Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L.H., Ware, P.L., Boothroyd, J.C., 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 141(10), 3584-3591.

Carruthers, V.B., Tomley, F.M., 2008. Microneme proteins in apicomplexans. Subcell. Biochem. 47, 33-45.

Castanys-Munoz, E., Perez-Victoria, J.M., Gamarro, F., Castanys, S., 2008. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. Antimicrob. Agents Chemother. 52 (10), 3573-3579.

Choi, S.H., Kim, T.Y., Park, S.G., Cha, G.H., 2010. Proteomic analysis of *Toxoplasma gondii* KI-1 tachyzoites. Korean J. Parasitol. 48(3), 195-201.

Dannemann, B., McCutchan, J.A., Israelski, D., Antoniskis, D., Leport, C., Luft, B., Nussbaum, J., Clumeck, N., Morlat, P., Chiu, J., Vilde, J.L., Orellana, M., Feigal, D., Bartok, A., Heseltine, P., Leedom, J., Remington, J., 1992. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. Ann. Intern. Med. 116(1), 33-43.

Derouin, F., Chastang, C., 1988. Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii* in tissue culture. Antimicrob. Agents Chemother. 32(3), 303-307.

- Franchetti, P., Grifantini, M., 1999. Nucleoside and non-nucleoside IMP dehydrogenase inhibitors as antitumor and antiviral agents. *Curr. Med. Chem.* 6(7), 599-614.
- Holmes, M., Liwak, U., Pricop, I., Wang, X., Tomavo, S., Ananvoranich, S., 2010. Silencing of tachyzoite enolase 2 alters nuclear targeting of bradyzoite enolase 1 in *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 12(1), 19-27.
- Ishikawa, Y., Kozakai, T., Morita, H., Saida, K., Oka, S., Masuo, Y., 2006. Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 42(3-4), 63-69.
- Jan, G., Delorme, V., David, V., Revenu, C., Rebollo, A., Cayla, X., Tardieux, I., 2007. The toxofilin-actin-PP2C complex of *Toxoplasma*: identification of interacting domains. *Biochem. J.* 401(3), 711-719.
- Katlama, C., Mouthon, B., Gourdon, D., Lapierre, D., Rousseau, F., 1996. Atovaquone as long-term suppressive therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS and multiple drug intolerance. *AIDS* 10(10), 1107-1112.
- Kibe, M.K., Coppin, A., Dendouga, N., Oria, G., Meurice, E., Mortuaire, M., Madec, E., Tomavo, S., 2005. Transcriptional regulation of two stage-specifically expressed genes in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 33(5), 1722-1736.
- Kumar, A., Sisodia, B., Misra, P., Sundar, S., Shasany, A.K., Dube, A., 2010. Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 70(4), 609-617.

Lodoen, M.B., Gerke, C., Boothroyd, J.C., 2010. A highly sensitive FRET-based approach reveals secretion of the actin-binding protein toxofilin during *Toxoplasma gondii* infection. *Cell. Microbiol.* 12(1), 55-66.

Manger, I.D., Hehl, A.B., Boothroyd, J.C., 1998. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.*, 66(5), 2237-2244.

Marouga, R., David, S., Hawkins, E., 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 382(3), 669-678.

Marugán-Hernández, V., Alvarez-García, G., Risco-Castillo, V., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M., 2010. Identification of *Neospora caninum* proteins regulated during the differentiation process from tachyzoite to bradyzoite stage by DIGE. *Proteomics* 10(9), 1740-1750.

McLeod, R., Boyer, K., Karrison, T., Kasza, K., Swisher, C., Roizen, N., Jalbrzikowski, J., Remington, J., Heydemann, P., Noble, A.G., Mets, M., Holfels, E., Withers, S., Latkany, P., Meier, P.; Toxoplasmosis Study Group, 2006. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin. Infect. Dis.* 42(10), 1383-1394.

Meneceur, P., Bouldouyre, M.A., Aubert, D., Villena, I., Menotti, J., Sauvage, V., Garin, J.F., Derouin, F., 2008. *In vitro* susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(4), 1269-1277.

- Nelson, M.M., Jones, A.R., Carmen, J.C., Sinai, A.P., Burchmore, R., Wastling, J.M., 2008. Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 76(2), 828-844.
- Nischik, N., Schade, B., Dytynska, K., Długońska, H., Reichmann, G., Fischer, H.G., 2001. Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes Infect.* 3(9), 689-699.
- Petersen, E., 2007. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 5(2), 285-293.
- Rabilloud, T. 2009. Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. *Electrophoresis.* 1:S174-180.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C., 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J. Proteomics* 73(11), 2064-2077.
- Reichmann, G., Długońska, H., Fischer, H.G., 2002. Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119(1), 43-54.
- Selga, E., Morales, C., Noé, V., Peinado, M.A., Ciudad, C.J., 2008. Role of Caveolin 1, E-Cadherin, Enolase 2 and PKCalpha on resistance to methotrexate in human HT29 colon cancer cells. *BMC Medical Genomics* 1, 35.

- Sharling, L., Liu, X., Gollapalli, D.R., Maurya, S.K., Hedstrom, L., Striepen, B., 2010. A screening pipeline for antiparasitic agents targeting *Cryptosporidium* inosine monophosphate dehydrogenase. PLoS Negl. Trop. Dis. 4(8), e794.
- Shonhai, A., 2010. Plasmodial heat shock proteins: targets for chemotherapy. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 58(1), 61-74.
- Smith, J.E., 1995. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 25(11), 1301-1309.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.L., Zhu, X.Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D. 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 109(15):5844-5849
- Sullivan, W.J., Dixon, S.E., Li, C., Striepen, B., Queener, S.F., 2005. IMP dehydrogenase from the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 49(6), 2172-2179.
- Tomavo, S., 2001. The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy. Int. J. Parasitol. 31(10), 1023-1031.
- Torres, R.A., Weinberg, W., Stansell, J., Leoung, G., Kovacs, J., Rogers, M., Scott, J., 1997. Atovaquone for salvage treatment and suppression of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Clin. Infect. Dis. 24(3), 422-429.

Travier, L., Mondragon, R., Dubremetz, J.F., Musset, K., Mondragon, M., Gonzalez, S., Cesbron-Delauw, M.F., Mercier, C., 2008. Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. *Int. J. Parasitol.* 38(7), 757-773.

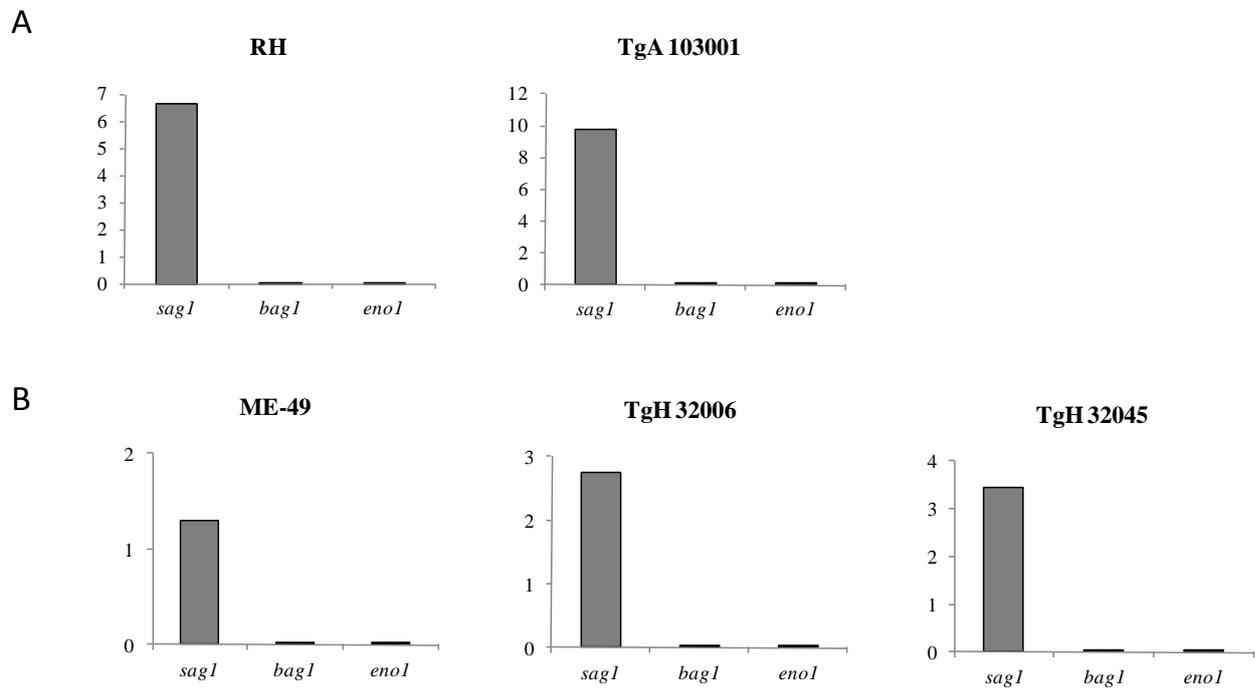
Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J., Ouellette, M., 2007. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 88–101.

Wastling, J.M., Xia, D., Sohal, A., Chaussepied, M., Pain, A., Langsley, G., 2009. Proteomes and transcriptomes of the Apicomplexa--where's the message? *Int. J. Parasitol.* 39(2),135-43.

Weiss, L.M., Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39(8), 895-901.

Xia, D., Sanderson, S.J., Jones, A.R., Prieto, J.H., Yates, J.R., Bromley, E., Tomley, F.M., Lal, K., Sinden, R.E., Brunk, B.P., Roos, D.S., Wastling, J.M., 2008. The proteome of *Toxoplasma gondii*: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. *Genome Biol.* 9(7), R116.

Supplemental data 1

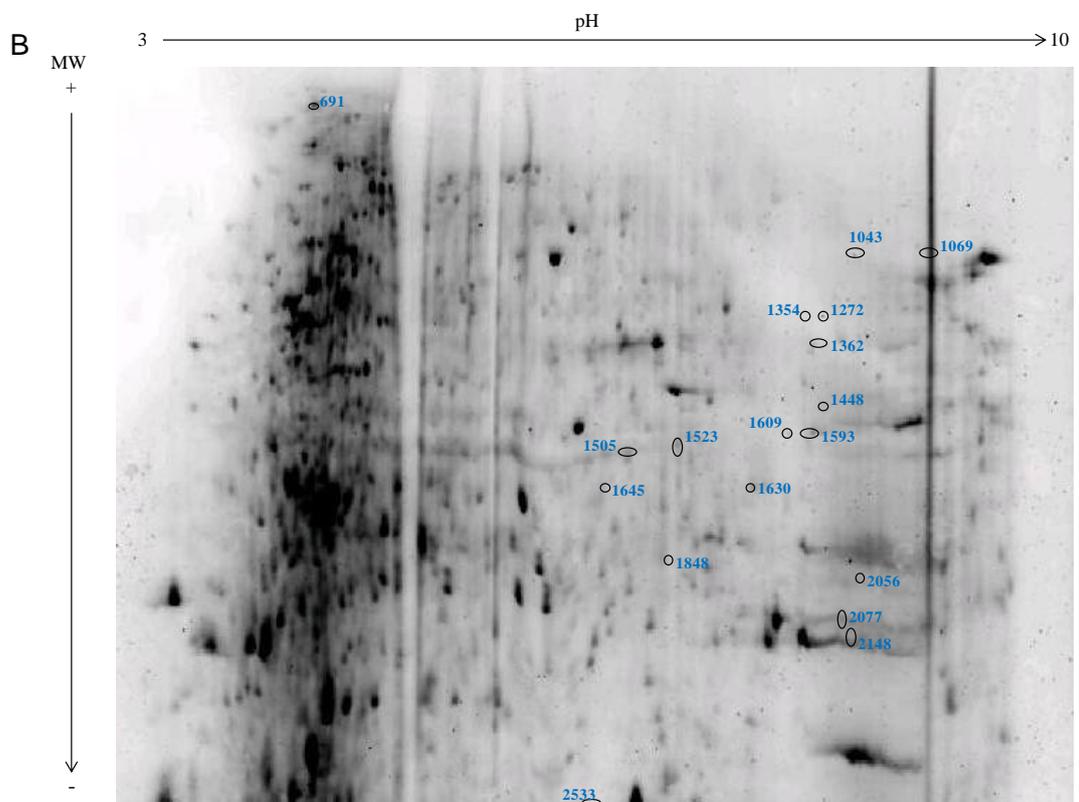
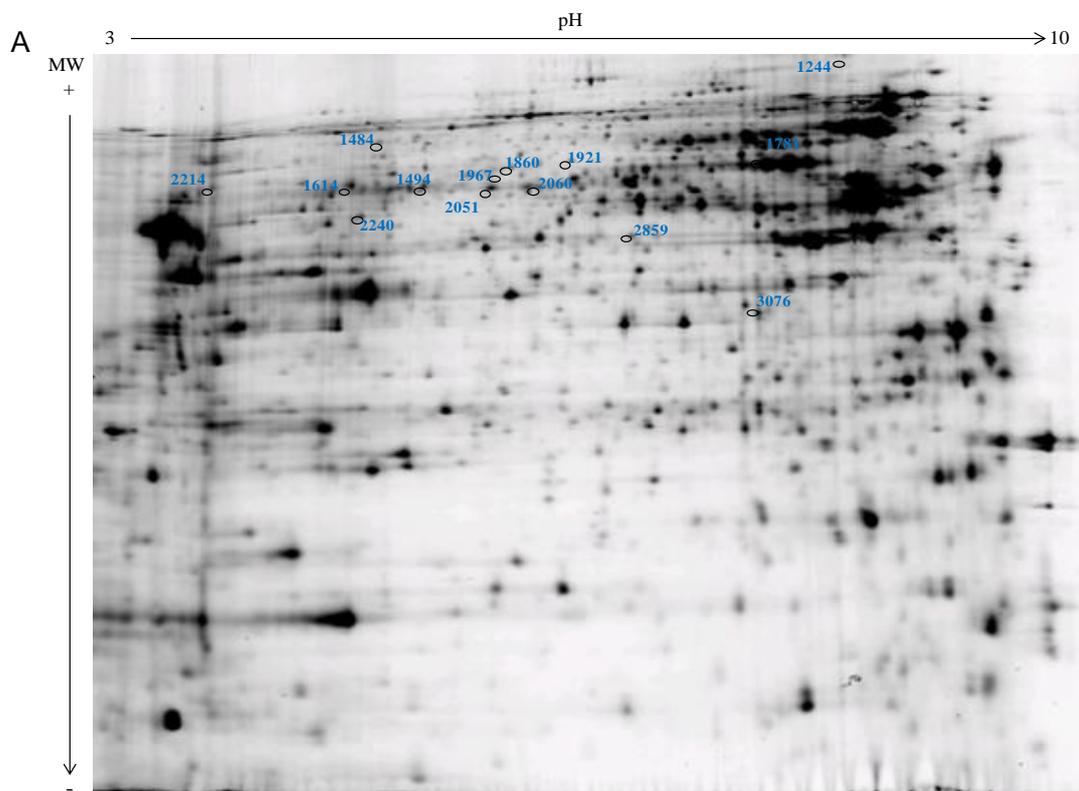


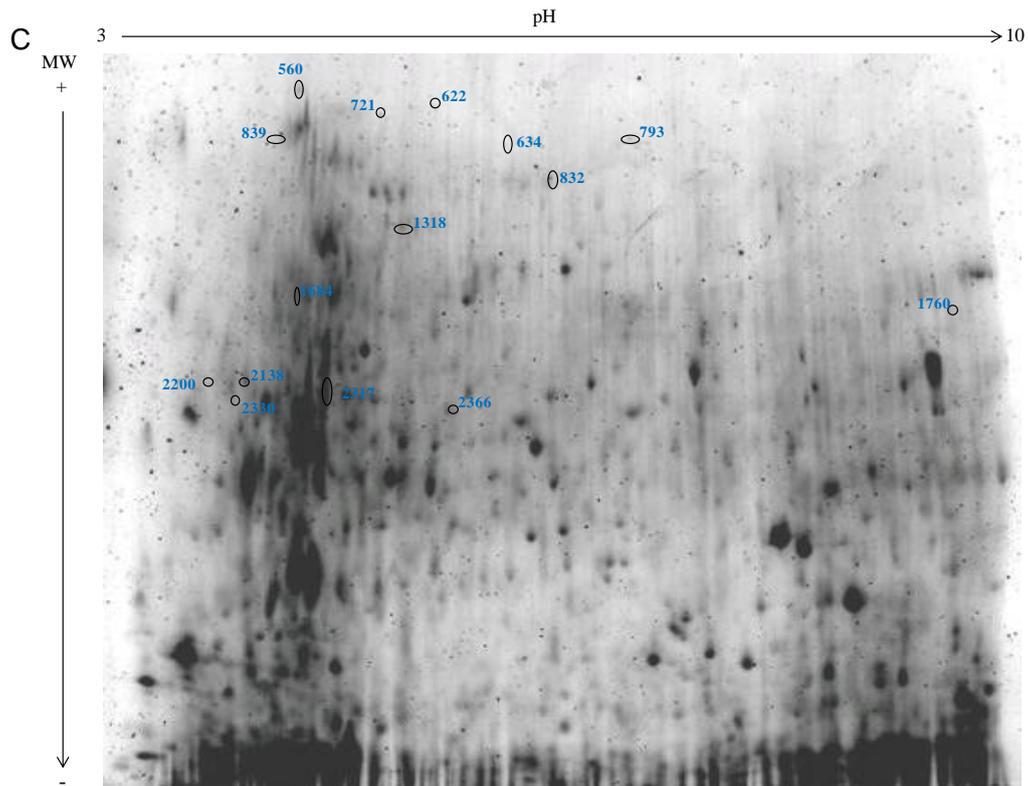
Relative expression of *T. gondii* tachyzoites markers, *sag1* gene, and bradyzoites markers, *bag1* and *eno1* genes, by real-time qRT-PCR analysis. Relative expression of *sag1*, *bag1* and *eno1* was evaluated in *T. gondii* genotype I strains (A) and genotype II strains (B). The mRNA levels of *sag1*, *bag1* and *eno1* genes were normalized to housekeeping *toxoplasma β-tubulin* gene. Results are representative of one experiment.

mRNA	Sense primer	Antisense primer
<i>sag1</i>	5'-ACG GGG GAT TCT GCT AGT CT-3'	5'-GGG GAA CTT CTC GAT TGG A-3'
<i>bag1</i>	5'-TGA GCG AGT GTC CGG TTA TT-3'	5'-ATT CCG TCG GGC TTG TAA T-3'
<i>eno1</i>	5'-GAG GCT CTG AAT CTC CTT GTT G-3'	5'-CTG CGT CAA ATG CGA TCT T-3'

***Sag1*, *bag1* and *eno1* sequences of primers used for qRT-PCR**

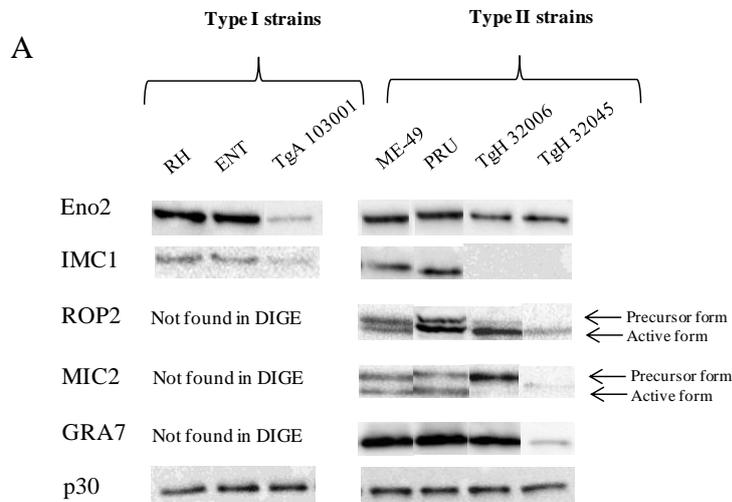
Supplemental data 2



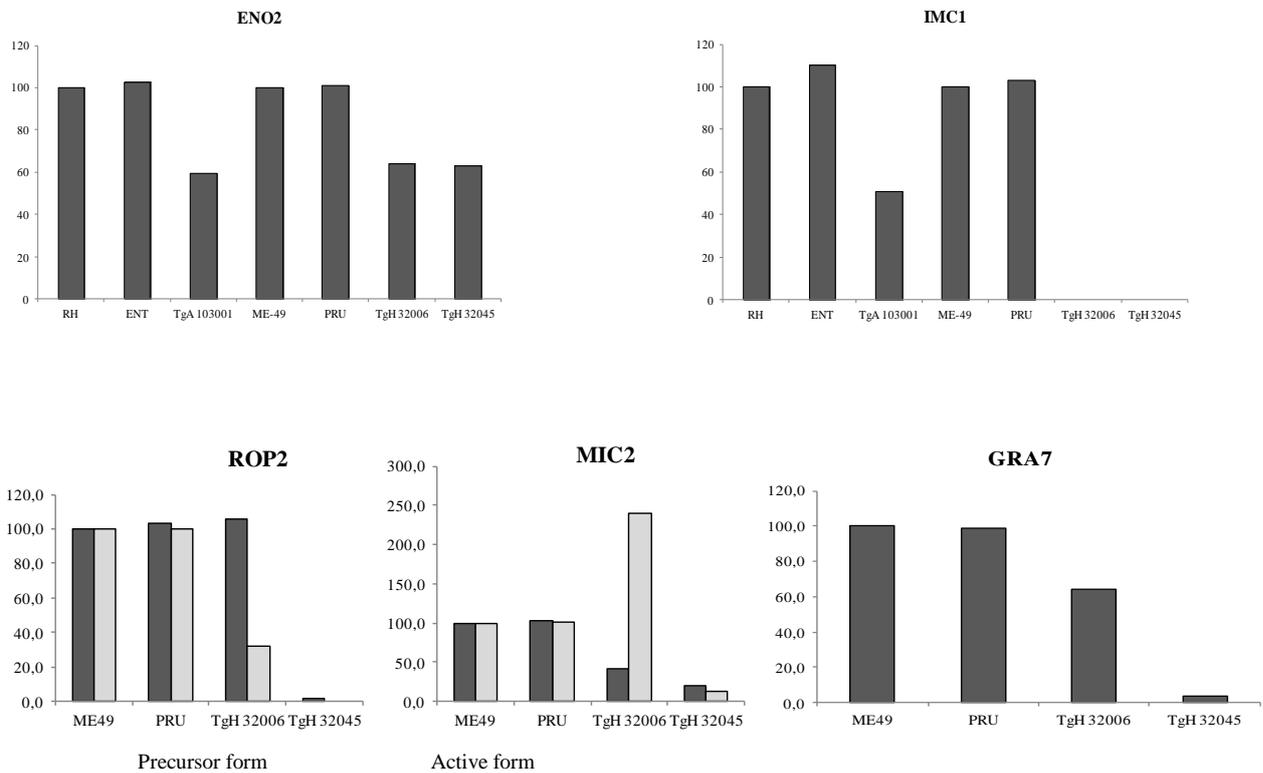


DIGE gels of *T. gondii* tachyzoites proteins: TgA 103001/RH strains (A), TgH 32045/ME-49 (B) and TgH 32006/ME-49 (C). (A) Spots numbers are presented in Table I. (B) Spots numbers are presented in Table II. (C) Spots numbers are presented in Table 3.

Supplemental data 3



B



Analysis by Western Blot of ENO2, IMC1, ROP2, MIC2 and GRA7 modulation in *T. gondii* sulfadiazine sensitive [RH and ENT (Type I), ME-49 and PRU (Type II)] and resistant strains [TgA103001 (Type I), TgH 32006 and TgH 32045 (Type II)] (A) and corresponding densitometry analysis (B). Proteins of *T. gondii* tachyzoites were extracted with RIPA buffer. 10 µg of proteins were separated on 12.5 % SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membrane. The membranes were blocked overnight at 4°C, incubated 1 h with the primary antibody against specific proteins and diluted at 1/5000 for ENO2 and IMC1 (Dr S. Tomavo), 1/2000 for GRA7 (Abbott), 1/1000 for ROP2 (Dr JF Dubremetz), MIC2 (Dr JF Dubremetz) and p30 (Argene Biosoft). Peroxydase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies were used (Biorad, 1/3000). p30 was used as positive control in all strains used.

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

- 31 protéines ont été différentiellement exprimées entre souches sensibles et résistantes. Ces protéines sont impliquées dans des mécanismes biologiques très différents tels que le métabolisme des glucides, interaction avec la cellule hôte, repliement des protéines, traduction, etc. Parmi elles, 44 % (13 protéines) sont surexprimées dans les trois souches résistantes TgA 103001, TgH 32006 et TgH 32045.
- La comparaison des souches TgA 103001/RH (Type I) et TgH 32045/ME-49 (Type II) a mis en évidence deux protéines, ENO2 et IMC1, sous-exprimées dans les souches résistantes.
- La comparaison des souches de Type II résistantes à la sulfadiazine, TgH 32006 et TgH 32045, à la souche de type II sensible, ME-49, a mis en évidence une protéine, ROP2, surexprimée dans les deux souches résistantes et une protéine, MIC2, sous-exprimée dans les deux souches résistantes.
- Ces résultats ne nous permettent pas de conclure quant à l'implication d'une ou plusieurs protéines dans les mécanismes de résistance à la SDZ chez *T. gondii*

Cette étude nous a permis de cartographier les protéomes de différentes souches de *T. gondii* et d'identifier des protéines dont les niveaux d'expression variaient entre souches sensibles et résistantes à la SDZ. Les protéines identifiées sont impliquées dans de nombreux mécanismes biologiques (métabolisme des glucides, interaction avec la cellule hôte, repliement des protéines, traduction,...) et ne nous permettent pas de mettre directement en évidence l'implication de l'une ou plusieurs d'entre elles dans les mécanismes de résistance à la SDZ. Par ailleurs, au vu de ces résultats, l'hypothèse de l'existence de différents mécanismes de résistance entre les trois souches résistantes paraît possible.

De plus, l'utilisation d'une gamme de pH 3-10 ne permet pas de cibler sur les zones à fortes concentrations protéiques, l'utilisation de gammes plus restreintes (pH3-6, pH5-8, pH7-10) nous permettrait certainement d'avoir accès à un nombre plus important de protéines.

Afin de comparer les protéomes de souches possédant le même fond génétique, nous proposons, dans la suite de notre travail, de développer des souches de *T. gondii* rendues résistantes à la SDZ *in vitro* par pression médicamenteuse.

Partie III. Développement d'une résistance à la sulfadiazine *in vitro* chez *T. gondii*

A l'heure actuelle, seules quatre souches naturelles ont été décrites pour leur résistance aux traitements antitoxoplasmiques et toutes pour leur résistance aux sulfamides. Si aucun mécanisme n'a encore été décrit pour expliquer la résistance des trois souches des travaux de Meneceur (Meneceur et al., 2008), le mécanisme responsable de la résistance de la « souche » Swa-20 décrite par Aspinall et al. est lié à un polymorphisme en position 407 de la DHFR (Aspinall et al., 2002) (polymorphisme non retrouvé sur nos trois souches résistantes). De manière intéressante, ce polymorphisme a été retrouvé sur une souche obtenue expérimentalement par Pfefferkorn (Pfefferkorn et al., 1992). Plusieurs souches résistantes aux sulfamides ont ainsi été décrites dans la littérature.

En 1971, Sander et Midtvedt développent *in vivo* une souche nommée SR, résistante au sulfonamide. Cette souche a été développée sur des souris ayant reçu dans leur alimentation 0,5 mg de sulphamethoxazole par jour pendant 290 jours (Sander et Midtvedt, 1971).

Par la suite, Pfefferkorn et al., ont rendu une souche RH résistante à la sulfadiazine par mutagénèse dirigée et par culture cellulaire en présence de concentrations croissantes de sulfadiazine. Ce mutant nommé R-Sul^R-5 a montré une résistance à la sulfadiazine supérieure de 300 fois à la souche parentale RH (Pfefferkorn et al., 1992). Des études complémentaires ont confirmé que la souche R-Sul^R-5 était résistante aux sulfamides avec une CI₅₀ de 5 mM de SDZ (soit 1 360 µg/mL de SDZ) (Aspinall et al., 2002).

Le mécanisme d'action identique entre la souche résistante naturelle, Swa-20, d'Aspinall (Aspinall et al., 2002) et celle obtenue par mutagénèse dirigée par Pfefferkorn (Pfefferkorn et al., 1992) nous a conduit à développer *in vitro* deux souches résistantes expérimentalement. La protéomique, technique que nous employons pour mettre en évidence le mécanisme de résistance, est une technique très puissante mais qui nécessite une standardisation la plus poussée possible. Dans l'article 2 (Partie II), les *reviewers* ont insistés sur la difficulté liée à l'analyse des variations entre souches résistantes et sensibles sans connaissance des variations intrinsèques entre souches sensibles. Les travaux de Khan et al.

(Khan et al., 2009), montrant des niveaux d'expression différents pour la souche RH par rapport à d'autres souches de type I, avaient déjà souligné les difficultés de choix entre souches « témoins » même si aucune différence n'a été retrouvée en Western Blot entre la souche RH et la souche ENT dans notre étude (Partie II). La différence de fond génétique entre les souches est un des principaux problèmes de l'analyse protéomique.

Dans ce cadre, il nous est paru intéressant d'induire la résistance à la SDZ *in vitro* sur les souches sensibles RH et ME-49 afin de pouvoir les comparer ensuite aux souches d'origine. Pour se faire, deux techniques sont utilisables : i) la mutagenèse dirigée suivie du criblage des mutants d'intérêt par mise en contact avec la drogue (Pfefferkorn et al., 1992), ii) la pression médicamenteuse par augmentation croissante des doses de la drogue (Berens et al., 1998). Ces deux stratégies ont été employées par Berens et al. Afin d'obtenir des mutants de *T. gondii* résistants à l'artémisinine. Seule la pression progressive lui a permis d'obtenir des mutants résistants, nous avons décidé d'utiliser son protocole : la concentration de départ appliquée correspondant à la CI_{50} des souches sensibles puis augmentation progressive des doses jusqu'à obtenir des souches résistantes. Berens et al. ont ainsi réussi à obtenir des souches résistantes à une dose de 25 $\mu\text{g/mL}$ d'artémisinine soit 50 fois la dose initiale, la limite supérieure étant liée à la toxicité directe de la drogue sur le parasite et/ou la cellule (Berens et al., 1998).

Les cellules utilisées pour la détermination de la CI_{50} dans l'étude de Meneceur (MRC-5) ont deux inconvénients majeurs : l'utilisation de cellules primaires nécessite leur commande en synchronisation avec l'obtention de parasites et la dose limite d'utilisation de la sulfadiazine sur les cellules MRC-5 est faible (50 $\mu\text{g/mL}$). Dans ces conditions, nous avons choisi de revalider un test de chimiosensibilité sur cellules Vero qui possèdent le double avantage de la lignée cellulaire et de l'utilisation de sulfadiazine jusqu'à des doses de 1000 $\mu\text{g/mL}$ sans altération de la cellule ni du parasite. Ces deux aspects sont développés dans l'article accepté dans *Experimental Parasitology*.

Deux étapes ont été nécessaires pour conduire notre étude :

1) Nous avons décidé d'utiliser le principe du test immuno-enzymatique de chimiosensibilité utilisé sur cellules MRC-5 par Meneceur et al (Meneceur et al., 2008) en l'adaptant sur notre modèle cellulaire Vero.

2) Par pression médicamenteuse croissante, nous avons développé deux souches, nommées RH-R^{SDZ} et ME-49-R^{SDZ}, résistantes à la SDZ. Cette résistance a pu être vérifiée par notre test, et les deux souches résistantes induites ont montré des CI₅₀ équivalentes à celles des souches naturellement résistantes.

Article 3

Induction of sulfadiazine resistance *in vitro* in *Toxoplasma gondii*

Christelle Doliwa, Sandie Escotte-Binet, Dominique Aubert, Frédéric Velard,

Aline Schmid, Régine Geers, Isabelle Villena

Accepté dans *Experimental Parasitology* en Novembre 2012.

Induction of sulfadiazine resistance *in vitro* in *Toxoplasma gondii*

Authors: C. Doliwa^a, S. Escotte-Binet^{a,b}, D. Aubert^{a,b}, F. Velard^c, A. Schmid^a, R. Geers^{a,b}, I. Villena^{a,b,*}

^aLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex, France.

^bCRB *Toxoplasma* et CNR de la Toxoplasmose, Hôpital Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France.

^cPlateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, 51 Rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France.

***Corresponding author:**

Mailing address: Pr Isabelle Villena

45 rue Cognacq-Jay

51092 Reims Cedex, France.

Tel: +33 3 2678 4220

Fax: +33 3 2678 7328

E-mail: ivillena@chu-reims.fr

Authors e-mail adress: christelle.doliwa@univ-reims.fr (C. Doliwa)
 sandie.escotte@univ-reims.fr (S. Escotte-Binet)
 daubert@chu-reims.fr (D. Aubert)
 frederic.velard@univ-reims.fr (F. Velard)
 rgeers@chu-reims.fr (R. Geers)
 ivillena@chu-reims.fr (I. Villena)

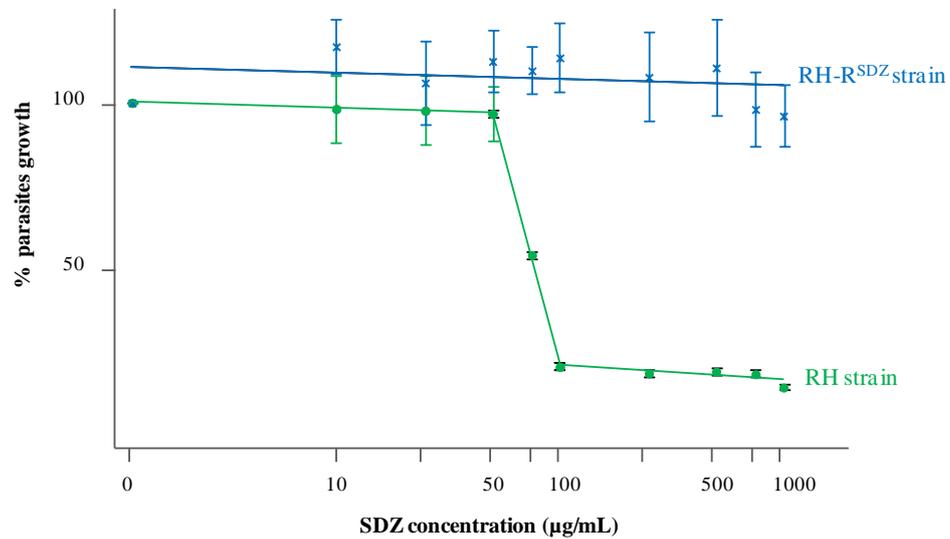
Abstract:

We induced sulfadiazine resistance in two sulfadiazine sensitive strains of *T. gondii*, RH (Type I) and ME-49 (Type II) *in vitro* by using drug pressure. At first, sulfadiazine susceptibility of the two sensitive strains and two naturally resistant strains of *T. gondii* was evaluated on Vero cells using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The IC₅₀ values of sulfadiazine were 77 µg/mL for RH, 51 µg/mL for ME-49 and higher than 1,000 µg/mL for the two natural resistant strains. Secondly, induced resistance of the strains by gradually increase sulfadiazine concentration was verified by this test, which resulted IC₅₀ values at higher than 1,000 µg/mL. In conclusion we developed *in vitro* two sulfadiazine resistant strains called RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ}. These strains resistant to sulfadiazine would be useful to characterize resistance mechanisms to sulfadiazine.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, drug resistance, sulfadiazine, *in vitro*

Abbreviations: SDZ, sulfadiazine

Graphical abstract



Highlights

- Adaptation of a specific *Toxoplasma* enzyme immunoassay on Vero cells line
- Determination of IC₅₀ values on several *T. gondii* strains
- Confirmation of sulfadiazine susceptibilities on *T. gondii* strains
- Development *in vitro* of two sulfadiazine resistant strains: RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ}

1. Introduction

Prophylaxis and treatment for toxoplasmosis are based on a combination of pyrimethamine and sulfonamide. These two drugs act synergistically to block the folate biosynthesis pathway by inhibiting dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR), which are essential for parasite survival and replication. Nevertheless several treatment failures have been reported for the treatment of toxoplasmic encephalitis, chorioretinitis, and congenital toxoplasmosis (Baatz et al., 2006; Danneman et al., 1992; Katlama et al., 1996; Petersen, 2007; Torres et al., 1997). Several pharmacological factors may contribute to these failures: malabsorption, drug intolerance, compliance or tissue diffusion. However, given the target of drugs used in the treatment of toxoplasmosis, it is suspected that factors of resistance or lower susceptibility depending on the parasite strain may exist.

Recently, *in vitro* sulfadiazine (SDZ) susceptibilities of 17 *T. gondii* strains were evaluated by Meneceur et al. (2008) by calculating the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) according to a method developed by Derouin and Chastang (1988) on MRC-5 cells. The existence of three strains naturally resistant to sulfadiazine was observed: TgA 103001 (previously described as B1, type I strain), TgH 32006, (previously described as RMS-1995-ABE, type II strain) and TgH 32045 (previously described as RMS-2001-MAU, type II variant strain). These three strains have shown IC₅₀ values for sulfadiazine > 50 µg/mL on MRC-5 cells in comparison to the other strains studied which had an IC₅₀ ranging from 3 to 18.8 µg/mL and therefore considered as sensitive (e.g., IC₅₀ of the RH strain = 6.52 µg/mL and IC₅₀ of the ME-49 strain = 6.55 µg/mL of sulfadiazine) (Meneceur et al., 2008). No

apparent correlation with strain genotype or mutations in known drug target genes was found in these three strains (Meneceur et al., 2008). Thus, the mechanism of resistance to sulfadiazine in *T. gondii* remains unclear.

Until now, the only data on the selection of sulfonamide resistance in *T. gondii* are obtained experimentally. Firstly, a sulphonamide resistant strain, called SR strain, was developed in mice after 290 days exposure to sulphamethoxazole (Sander and Midtvedt, 1971). Then, Pfefferkorn et al. (1992), induced resistance to the wild-type RH by the use of chemical mutagenesis and growth in gradually increased sulfadiazine concentrations. This mutant parasite (R-Sul^R-5) showed to be 300-fold more resistant than the parental strain RH. Further study on R-Sul^R-5 confirmed previous observations that growth of this strain is sulfonamide resistant with an IC₅₀ value to be nearly 5 mM (equivalent to 1,360 µg/mL) like another sulfadiazine resistant strain Swa-20 isolated from patient with clinical toxoplasmosis (Aspinall et al., 2002).

In our present study, we induced sulfadiazine resistance on two sensitive strains of *T. gondii in vitro* and in order to verify this resistance, we performed an *in vitro* quantitative sulfadiazine resistance study on parasites by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

2. Material and methods

2.1. Parasites

Four strains of *T. gondii* tachyzoites have been used in this study: RH (type I, sensitive strain), TgA 103001 (type I, natural resistant strain), ME-49 (type II, sensitive strain) and TgH 32006 (type II, natural resistant strain). All strains studied were provided by the French Biological *Toxoplasma* Resource Centre (BRC *Toxoplasma*, France) and are previously described for their sulfadiazine susceptibilities in MRC-5 cell culture (Meneceur et al., 2008).

2.2. Parasites growth

Tachyzoites were maintained on Vero cell monolayers (ATCC, CCL-81) at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. Cells and parasites were grown in complete medium: Iscove's Modified Dulbecco's Medium/Glutamax (IMDM; Invitrogen, France) supplemented with 2% (v/v) fetal calf serum (Biowest, France) and antibiotics (100 IU/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin) (GIBCO). Parasite growth rates varied depending on strain genotypes (Meneceur et al., 2008); host cells were infected at different parasite to cell ratio (1:1 for the type I strains, 4:1 for the type II strains). For all the study, cells and tachyzoites were counted using a Kova Slide counting chamber in the presence of Trypan blue (v/v). The parasites were routinely checked for *Mycoplasma spp.* contamination and found to be negative using a *Mycoplasma spp.* real-time PCR (Ishikawa et al., 2006).

2.3. In vitro studies

The assessment of the in vitro inhibitory effects of antimicrobial agent on *Toxoplasma* growth was determinate on Vero cell cultures using 96-well plates. Briefly, 200 µL of a suspension

containing 15,000 cells were placed into each well of 96-well plates and incubated for 3 h at 37°C to allow cells to adhere. Then, each well of the plate, except eight control wells, was inoculated with 50 µL of tachyzoites suspension (i.e., 7,500 tachyzoites in 50 µL for type I strains and 30,000 tachyzoites in 50 µL for type II strains). After 3 h at 37°C, SDZ (Sigma-Aldrich, France) at various concentrations (10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 and 1,000 µg/mL) was added to the wells. After 72 h, the cultures were fixed with cold methanol. Each concentration was tested in eight replicate wells. *Toxoplasma* growth was evaluated by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed directly on the infected cultures, with an anti-*T. gondii* SAG-1-HRP conjugated monoclonal antibody (Argene Biosoft, France): culture plates were rehydrated 10 min in PBS 1X, then 60 µL per well of the monoclonal antibody (1.01 mg/mL) at a titration of 1:3,000 diluted in antibody buffer [Tris/NaCl (pH 7.3), 0.1% (v/v) IGEPAL® CA-630 (Sigma-Aldrich, France), 0.2 mM Ethylmercuriothiol-Benzoésäure Natrium Sals (Merck Millipore, France), 25% (v/v) fetal calf serum (Biowest), 50 mM Potassium hexacyanoferrate (Sigma-Aldrich)] was added and incubated for 1 h at 37°C. After four washing with 1X washing buffer [0.14 M Sodium chloride (Merck Millipore), 2.5 mM Potassium chloride (Merck Millipore), 2.5 mM Di-potassium hydrogen phosphate dihydrate (Merck Millipore), 10 mM Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate (Merck Millipore), 0.02 mM Ethylmercuriothiol-Benzoésäure Natrium Sals (Merck Millipore), 0.1% (v/v) Tween 20 (Merck Millipore)], o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma) substrate was added (200 µL per well), one tablet of OPD was dissolved in 10 mL of substrate buffer [40 mM Citric acid monohydrate (Merck Millipore, France), 120 mM Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate (Merck Millipore), 0.2 mM Ethylmercuriothiol-Benzoésäure Natrium Sals (Merck Millipore), 0.02% (v/v) Hydrogen peroxide 30%]. The reaction was stopped by the addition of 100 µL per well of 1 N HCl, 200

μL were taken from each well and transferred into new 96-well plates for spectrophotometric readings at 450 nm corrected at 630nm; blank readings were made on the mean value of the eight negative control wells. In the same time, the culture plates were immediately washed with distilled water, stained with kit RAL 555 (RAL Diagnostics, France) and examined microscopically (Axiovert 200M, Zeiss, France) at magnification 20x to observe large foci of parasitized cells on the positive-control cultures and sulfadiazine effects on the other wells. For each tested strains, the data reported here are representative of two experiments performed in eight replicates at each drug concentration.

2.4. *Sulfadiazine resistance induction*

To induce SDZ resistance, parental strains RH and ME-49 were cultivated on Vero cells (as previously described in 2.3) with gradual increase in sulfadiazine concentration (Sigma-Aldrich, France). SDZ was initially dissolved in 50% NaOH 2N-50% complete medium at a concentration of 100 mg/mL. Cultures were started at a concentration of SDZ closed to the IC_{50} value of parental strains. SDZ concentration was increased every three to five passages from 50 to 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SDZ, when tachyzoites displayed reproducible growth and infectivity. The duration between each passage varied from 4 to 25 days for the mutant RH strain and 4 to 30 days for the mutant ME-49 strain. . Strains required 23 passages for the mutant RH and 25 passages for the mutant ME-49. The RH and ME-49 strains resistant to sulfadiazine were called RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ} respectively.

2.5. *IC₅₀ Data analysis*

The effect of SDZ at various concentrations was described by data plotting as previously described (Derouin and Chastang, 1989) with minor modifications to the y axis (Optical

Density for Derouin and Chastang were turned into percentage of parasites growth in our study). Results were averaged, OD values for cultures without drug treatment was used at 100% value of parasites growth and plotted in function of the logarithm of SDZ concentration. Briefly, curves displayed a sigmoid shape with three linear regression models. This allowed us to describe each drug effect as a sequence of three lines: line 1 indicated the absence of inhibitory effect, line 2 indicated a marked increase of inhibition, and line 3 indicated a residual effect for higher concentrations. For ELISA assay, values are expressed as mean \pm SD.

3. Results

In order to develop a laboratory-induced *in vitro* resistance on two strains by gradually increase sulfadiazine concentration, several aspects were examined: i) to adapt the specific *Toxoplasma* enzyme immunoassay developed by Derouin and Chastang (1988) to Vero cells, ii) to determinate IC₅₀ values on previously studied strains (RH, ME-49, TgA 103001 and TgH 32006) (Meneceur et al., 2008) and to confirm their SDZ-susceptibility and iii) to verify the SDZ-resistance of the two strains RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ}.

Preliminary studies indicate that final concentrations of NaOH 2N in dilution of SDZ, that is to say 0.1 N at maximum SDZ concentration, did not inhibit the growth of *T. gondii* (*data not shown*).

3.1. RH strain (*sulfadiazine sensitive*)

For the RH strain, an inhibitory effect was observed for SDZ concentration greater than 50 µg/mL. Between 50 and 100 µg/mL, this effect was summarized by regression line L2: $y=522.34-108.65\ln(C)$ where C is the concentration. The IC₅₀ was estimated to be 77 µg/mL of SDZ (Fig. 1a). The microscopic observation showed a decreased of the tachyzoite rosettes number at a concentration close to the IC₅₀ (75 µg/mL) (Fig. 2b) in comparison to the control (Fig. 2a) and a complete inhibition of *T. gondii* growth at 1,000 µg/mL (Fig. 2c).

3.2. ME-49 strain (*sulfadiazine sensitive*)

An inhibitory effect was observed for SDZ concentration greater than 25 µg/mL for the ME-49 strain. Between 25 and 100 µg/mL, this effect was summarized by regression line L2: $y=276.26-57.484\ln(C)$. The IC₅₀ was estimated to be 51 µg/mL of SDZ (Fig. 3a). This inhibitory effect appeared on microscopic observation at 50 µg/mL, which halved parasite growth rate (Fig. 4b) comparing to the control (Fig. 4a). *T. gondii* growth was totally inhibited at 1,000 µg/mL (Fig. 4c).

3.3. TgA 103001 strain (*sulfadiazine resistant*)

SDZ had no effect on the TgA 103001 strain. This was summarized by regression line L1 indicating the absence of inhibitory effect. In this case, the IC₅₀ value for SDZ was higher than 1,000 µg/mL of SDZ (Fig. 1b). Microscopic examination of the stained-culture showed no inhibitory effect for the SDZ concentrations up to 1,000 µg/mL, with an important cell lysis due to parasites (Fig. 2d, e and f).

3.4. TgH 32006 strain (*sulfadiazine resistant*)

SDZ had no effect on the TgH 32006 strain. This was summarized by regression line L1 indicating the absence of inhibitory effect. In this case, the IC₅₀ value for SDZ was higher than 1,000 µg/mL (Fig. 3b). This effect was confirmed by microscopic observation (Fig. 4d, e and f).

3.5. Sulfadiazine resistance induction

RH and ME-49 strains have IC₅₀ values at ~ 75 µg/mL and 50 µg/mL respectively (Fig. 1a and 3a). To develop sulfadiazine resistant strains *in vitro*, the two strains cultures

were started at the same concentration of SDZ (50 µg/mL of SDZ). Over a period of 8 months, RH and ME-49 strains were grown in the presence of increasing SDZ concentration (50, 100, 200, 400 and 800 µg/mL of SDZ) to obtain two strains that are able to grow in the presence of 800 µg/mL of SDZ. These two strains were called RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ}.

3.6. Susceptibilities of RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ}

SDZ had no effect on the RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ} strains. Their growth curves (Fig. 1c and 3c respectively) showed the same profile as those of natural resistant strains: TgA 103001 and TgH 32006 (Fig. 1b and 3b respectively). This was summarized by regression line L1 on the two graphs (Fig. 1c and 3c) indicating the absence of inhibitory effect. In this case, for the two strains RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ}, IC₅₀ values for SDZ were higher than 1,000 µg/mL.

Microscopic observations of the stained cultures showed no inhibition of parasites growth with SDZ up to 1,000 µg/mL for RH-R^{SDZ} (Fig. 2g, h and i) and ME-49-R^{SDZ} (Fig. 4g, h and i).

The resistance of RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ} strains is consistently observed after several passages in cell culture without sulfadiazine and the same IC₅₀ values were observed after thawing of these strains (*data not shown*). Moreover, tachyzoites of these strains displayed reproducible growth and infectivity as parental strains RH and ME-49.

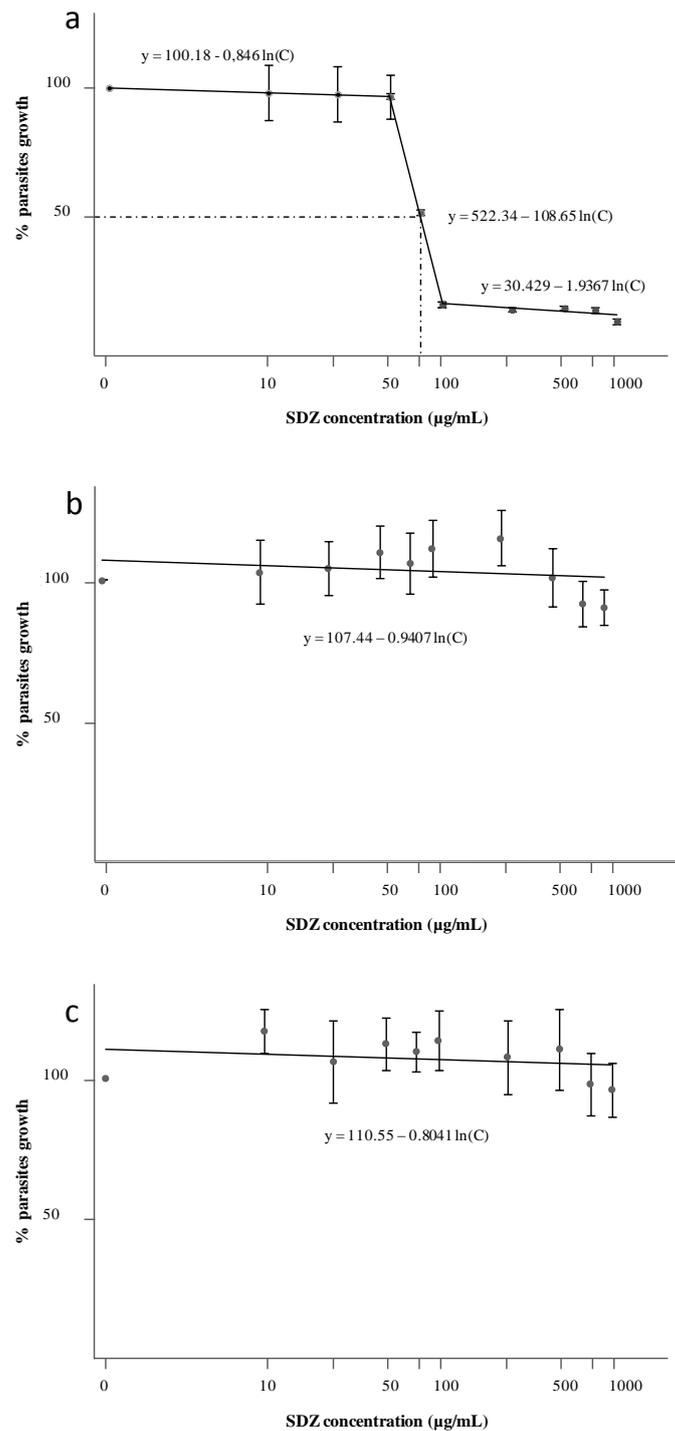


Figure 1. *In vitro* effect of sulfadiazine on *T. gondii* growth for Type I strains. Each graph shows the percentage of parasites growth determined by ELISA with infected monolayers (y axis) versus SDZ concentration (x axis) for RH strain (a), TgA 103001 strain (b) and RH- R^{SDZ} strain (c). Values are expressed as mean \pm SD.

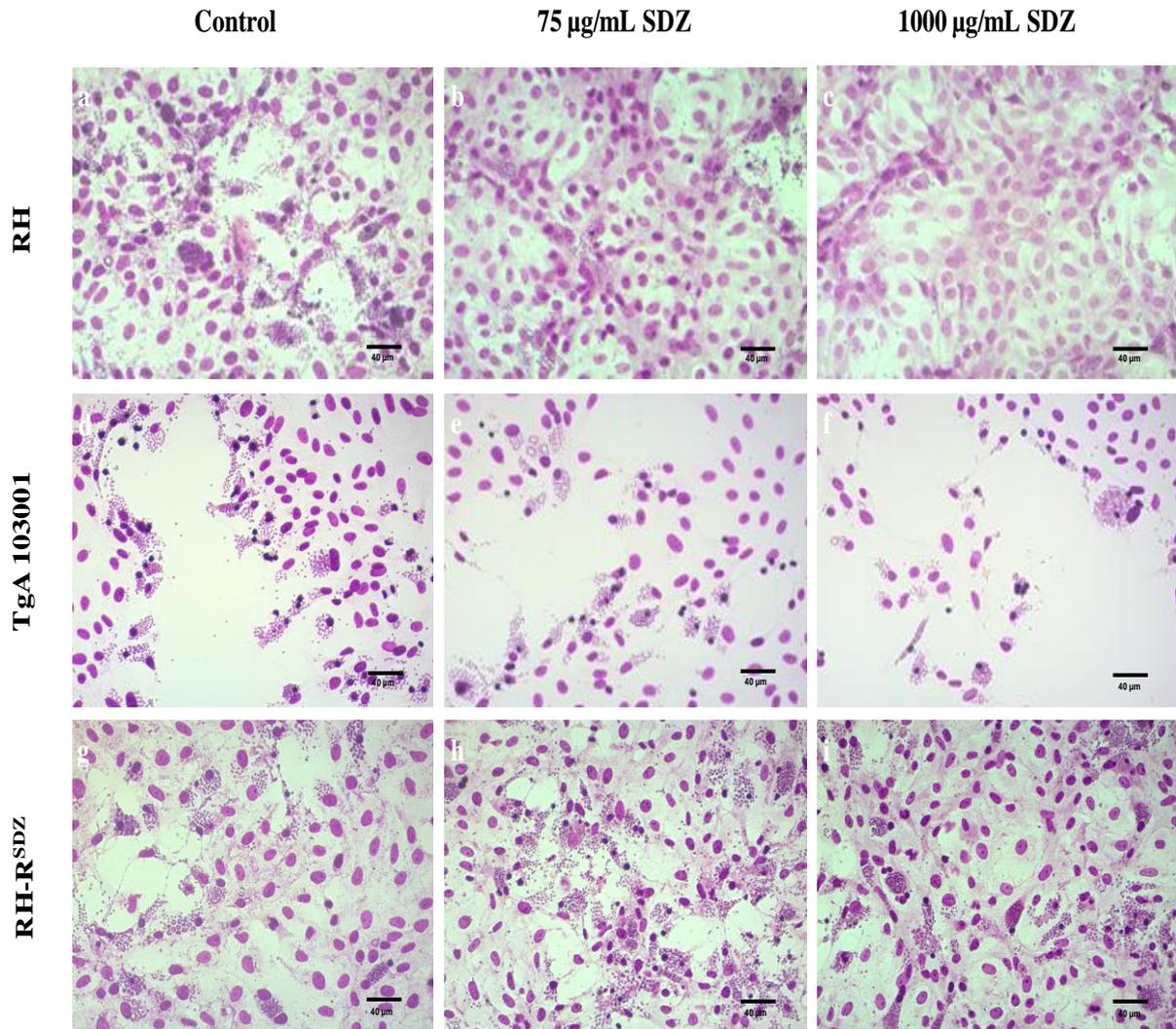


Figure 2. Optical microscopic observation of *T. gondii* growth for Type I strains in presence of SDZ for 72h. Strains of *T. gondii*, RH (a, b, c), TgA 103001 (d, e, f) and RH-R^{SDZ} (g, h, i) were cultured on Vero cells with SDZ at 0 $\mu\text{g/mL}$ (a, d, g), 75 $\mu\text{g/mL}$ (b, e, h) and 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (c, f, i) for 72h. Cultures were then fixed with methanol, stained with kit RAL 555 and microscopically inspected (magnification: 20x, bars represent 40 μm). Tachyzoites were indicated by arrows.

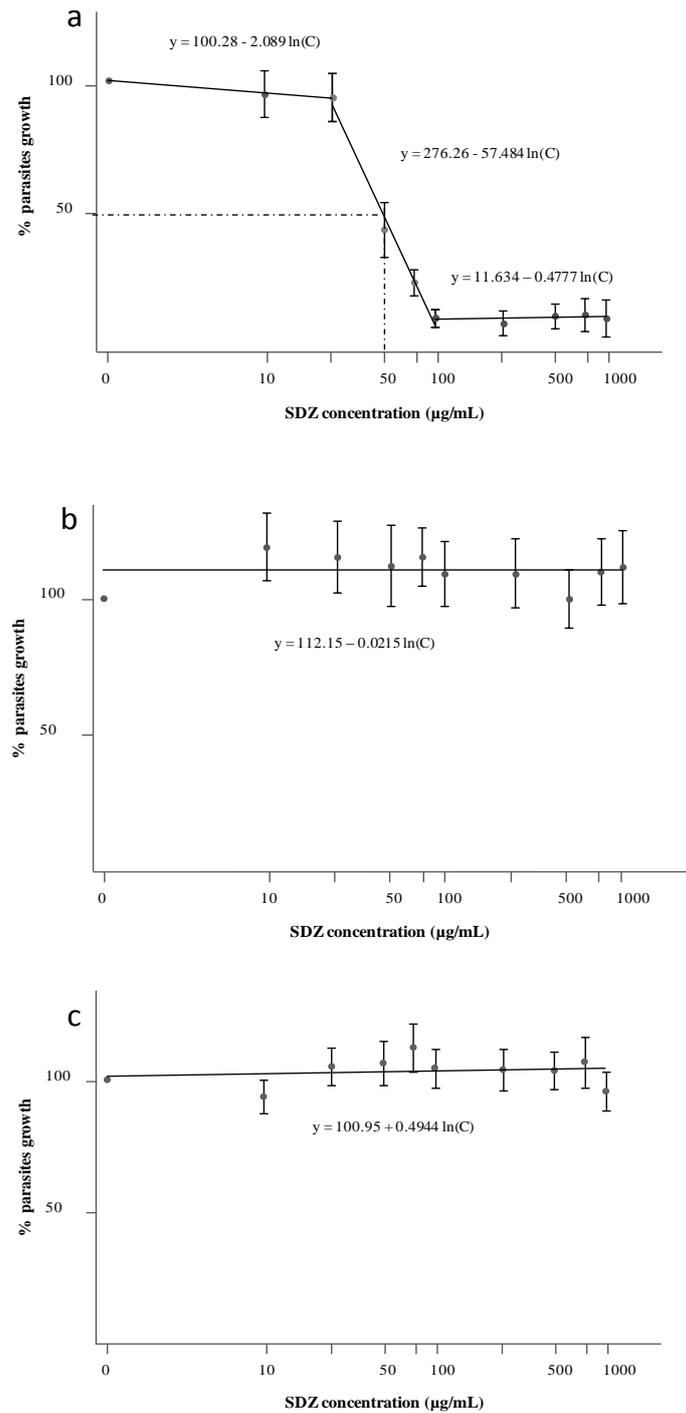


Figure 3. *In vitro* effect of sulfadiazine on *T. gondii* growth for Type II strains. Each graph shows the percentage of parasites growth determined by ELISA with infected monolayers (y axis) versus SDZ concentration (x axis) for ME-49 strain (a), TgH 32006 strain (b) and ME-49-R^{SDZ} strain (c). Values are expressed as mean ± SD.

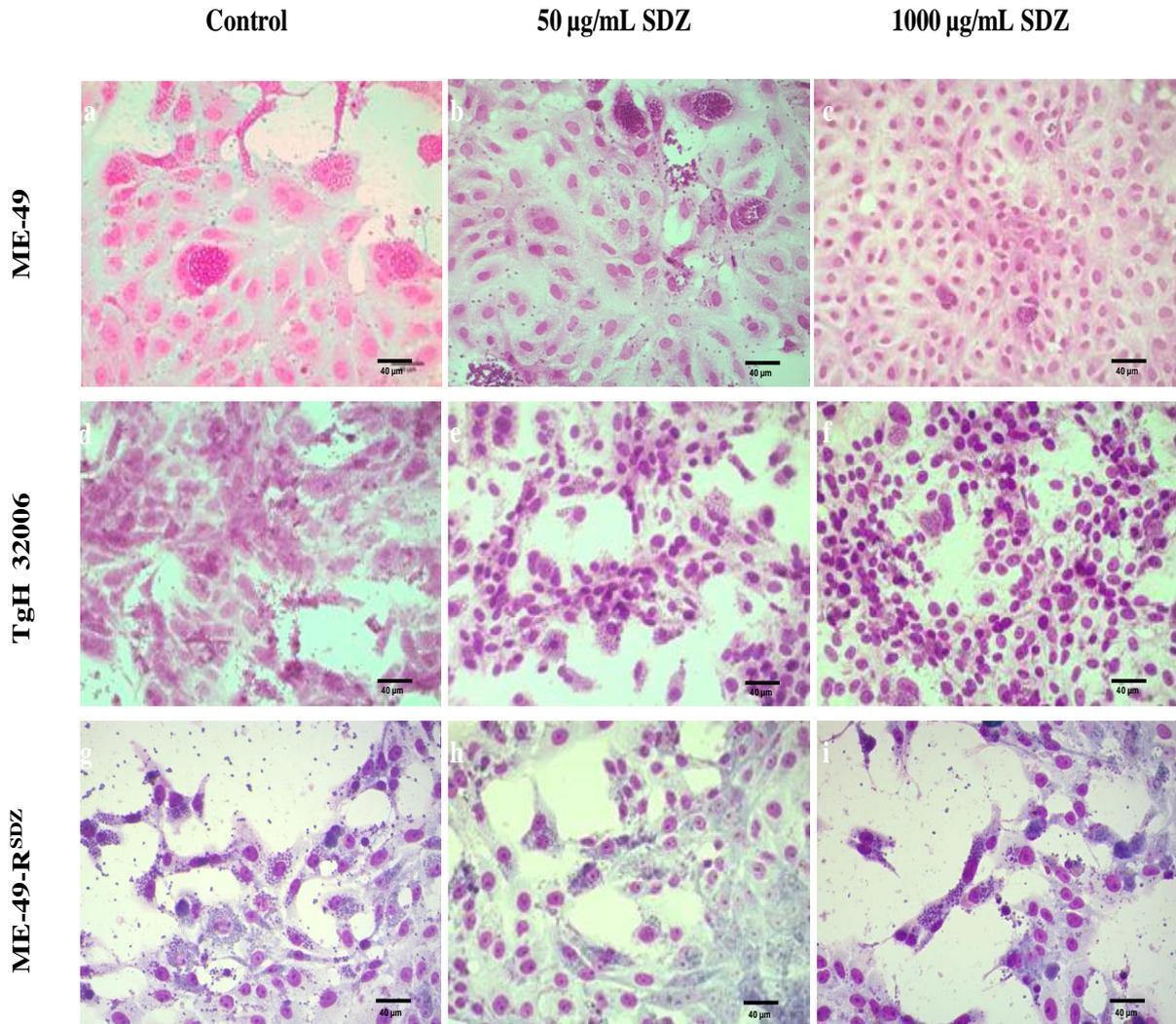


Figure 4. Optical microscopic observation of *T. gondii* growth for Type II strains in presence of SDZ for 72h. Strains of *T. gondii*, ME-49 (a, b, c), TgH 32006 (d, e, f) and ME-49-R^{SDZ} (g, h, i) were cultured on Vero cells with SDZ at 0 $\mu\text{g/mL}$ (a, d, g), 50 $\mu\text{g/mL}$ (b, e, h) and 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (c, f, i) for 72h. Cultures were then fixed with methanol, stained with kit RAL 555 and microscopically inspected (magnification: 20x, bars represent 40 μm). Tachyzoites were indicated by arrows.

4. Discussion

In this study, the first step was to adapt, on Vero cells, the specific *Toxoplasma* enzyme immunoassay developed by Derouin and Chastang (1988) and used by Meneceur et al. on MRC-5 cells to evaluate the sulfadiazine susceptibilities of 17 *T. gondii* strains. Similar to all primary cell lines, using MRC-5 cells have limitations such as availability and limited life in cell culture. On contrary, *T. gondii* culture on Vero cell has significant advantages such as yield, purity and viability (Saadatnia et al., 2010) which make it a good candidate for standardization. Actually, numerous human strains of *T. gondii* are available at the BRC *Toxoplasma* (France) (more than 600 isolates) and we want to develop an easy-to-use test to assess the susceptibilities to sulfadiazine. We induced resistance by gradually increase sulfadiazine concentration on two strains (RH, Type I and ME-49, Type II) in order to have the same genotype as two of the three strains described as naturally resistant by Meneceur et al. (2008).

In accordance with Meneceur et al. (2008), our results showed that the RH and ME-49 strains were sensitive to SDZ with an IC_{50} value at 77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the RH strain and 51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the ME-49 strain, whereas IC_{50} was determined to be 6.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on MRC-5 cells for both strains (Meneceur et al., 2008). Using the same approach, we confirmed that the strains TgA 103001 and TgH 32006 were resistant to sulfadiazine with IC_{50} values higher than 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SDZ on Vero cells whereas the IC_{50} values for these resistant strains were shown to be higher than 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on MRC-5 cells (Meneceur et al., 2008). Moreover, several other strains studied by Meneceur et al. (2008) were examined by our test that showed similar results. Strain TgH 32045, described as resistant on MRC5 cells, was also found to be

resistant on Vero cells by our team with IC₅₀ values higher than 1,000 µg/mL of SDZ (*data not shown*). Indeed, numerous studies have shown that the drug susceptibility for parasites depended on the host cells used: using RH strain as model, IC₅₀ value was found to be 6,5 µg/mL of SDZ on HEP2 cells (Van Der Ven et al., 1996) and MRC-5 cells (Meneceur et al., 2008) while IC₅₀ was found to be 70 µg/mL on HFF cells (De Oliveira et al., 2009) and 1,800 µg/mL on Hela cells (Jin et al., 2009). In comparison to MRC-5 cells, Vero cells showed a broader range to study toxicity of sulfadiazine: IC₅₀ values for SDZ varied between 50-75 µg/mL to 1,000 µg/mL on Vero cells while IC₅₀ values varied only between 6 µg/mL to 50 µg/mL on MRC-5 cells.

Until now, relevant studies investigating mutant resistant to sulfonamides in *T. gondii* are focused on the R-Sul^R-5 strain obtained by mutagenesis (Pfefferkorn et al., 1992). This mutant parasite was selected by a combination of chemical mutagenesis and growth in gradually increased sulfadiazine concentrations and has been shown to be 300 times more resistant to sulfonamides than the wild-type RH strain. Aspinall et al. (2002) studied the R-Sul^R-5 strain and confirmed that this strain was sulfonamide resistant with an IC₅₀ value to be nearly 5 mM. When exposed for a long period to sulphonamides, *T. gondii* can develop resistance *in vitro* as we demonstrated it in this present work, as well as *in vivo* (Sander and Midtvedt, 1971), where SR strain (sulphonamide resistant strain originated from RH strain) was transferred on mice for 290 days receiving additional 0.5 mg sulphamethoxazole daily in their diet. These results raise the question already asked by Aspinall et al., (2002): was the resistance acquired following parasite exposure to drugs, or was it innate? Among the 17 *Toxoplasma* strains studied by Meneceur et al. (2008), three were determined to be sulfadiazine resistant, which was also confirmed by our test. These strains included TgA

32006, which was coming from a congenital infection with a resulting treatment consisting of pyrimethamine and sulfadoxine for 12 weeks; TgA 103001, which was coming from an aborted fetus of bovine without drug exposure before strain isolation and TgH 32045, which was coming from a congenital toxoplasmosis without sulfonamides used during treatment (Meneceur et al., 2008). Aspinall et al. (2002) studied a SDZ-resistant clinical isolate (Sw-20), which was isolated without sulfonamide treatment. These SDZ-resistant clinical isolates, except the TgH 32006 strain, suggested that parasites already carrying sulfonamide resistance before infection.

In the present study, the RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ} strains developed in our laboratory are stable after several passages in cell culture without drug pressure (more than 5 months) and also after thawing (*data not shown*). This indicates that resistance was acquired and continues without affecting phenotypic traits of parasite.

To conclude, we have developed two SDZ-resistant strains (Type I and II) *in vitro* named RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ} and we have confirmed their susceptibilities to SDZ on Vero cells. These resistant strains could establish a good approach to study and understand the mechanism of sulfadiazine resistance in *T. gondii* by using several techniques such as proteomics techniques (comparison of proteomes between sensitive and *in vitro* resistant strains) or transcriptomics analysis (comparison of mRNA levels between sensitive and *in vitro* resistant strains). The development of this new ELISA test will be useful to test strains included in BRC *Toxoplasma* and to evaluate the prevalence among these resistant strains. In the case of treatment failures of toxoplasmosis, ELISA test could also be carried out to verify strains susceptibilities to the drugs used. Moreover, further studies of these strains could make

connection between naturally resistant strains and induced resistant strains to better understand resistance mechanisms.

Acknowledgments

We thank Dr D. Xia (University Liverpool) for proofreading the manuscript, Pr F. Derouin (University Paris VII) for his helpful discussion, the BRC *Toxoplasma* (France) for providing strains of this work and the Cellular and Tissular Imaging Platform (Reims, France) for the microscopic inspections. This research was funded by a grant from Region Champagne-Ardenne and Roche Laboratory, which was awarded to C. Doliwa for completion of a doctorate degree.

References

Aspinall, T.V., Joynson, D.H., Guy, E., Hyde, J.E., Sims, P.F., 2002. The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 185(11), 1637-1643.

Baatz, H., Mirshahi, A., Puchta, J., Gumbel, H., Hattenbach, L.O., 2006. Reactivation of *Toxoplasma* retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 14, 185-187.

Dannemann, B., McCutchan, J.A., Israelski, D., Antoniskis, D., Leport, C., Luft, B., Nussbaum, J., Clumeck, N., Morlat, P., Chiu, J., Vilde, J.L., Orellana, M., Feigal, D., Bartok, A., Heseltine, P., Leedom, J., Remington, J., 1992. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. *Ann. Intern. Med.* 116(1), 33-43.

De Oliveira, T.C., Silva, D.A., Rostkowska, C., Béla, S.R., Ferro, E.A., Magalhães, P.M., Mineo, J.R., 2009. *Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Parasitol.* 122(3), 233-241.

Derouin, F., Chastang, C., 1988. Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(3), 303-307.

Derouin, F., Chastang, C., 1989. *In vitro* effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 33(10), 1753-1759.

Ishikawa, Y., Kozakai, T., Morita, H., Saida, K., Oka, S., Masuo, Y., 2006. Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 42(3-4), 63-69.

Jin, C., Kaewintajuk, K., Jiang, J., Jeong, W., Kamata, M., Kim, H.S., Wataya, Y., Park, H., 2009. *Toxoplasma gondii*: a simple high-throughput assay for drug screening in vitro. *Exp. Parasitol.* 121(2), 132-136.

Katlama, C., Mouthon, B., Gourdon, D., Lapierre, D., Rousseau, F., 1996. Atovaquone as long-term suppressive therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS and multiple drug intolerance. *AIDS.* 10(10), 1107-1112.

Meneceur, P., Bouldouyre, M.A., Aubert, D., Villena, I., Menotti, J., Sauvage, V., Garin J.F., Derouin, F., 2008. *In vitro* susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(4), 1269-1277.

Petersen, E., 2007. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 5(2), 285-293.

Pfefferkorn, E.R., Borotz, S.E., Nothnagel, R.F., 1992. *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to sulfonamides. *Exp. Parasitol.* 74(3), 261-270.

Saadatnia, G., Haj Ghani, H., Khoo, B.Y., Maimunah, A., Rahmah, N., 2010. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Trop. Biomed.* 27(1), 125-130.

Sander, J., Midtvedt, T., 1971. Development of sulphonamide resistance in *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B Microbiol. Immunol.* 79(4), 531-533.

Torres, R.A., Weinberg, W., Stansell, J., Leoung, G., Kovacs, J., Rogers, M., Scott, J., 1997. Atovaquone for salvage treatment and suppression of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 24(3), 422-429.

Van der Ven, A.J., Schoondermark-van de Ven, E.M., Camps, W., Melchers, W.J., Koopmans, P.P., Van der Meer, J.W., Galama, J.M., 1996. Anti-*toxoplasma* effect of pyrimethamine, trimethoprim and sulphonamides alone and in combination: implications for therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 38(1), 75-80.

Résultats complémentaires

I. Etude de la chimiosensibilité de la souche TgH 32045

La souche résistante naturelle de génotype II variant TgH 32045, non-étudiée dans le précédent article, a fait l'objet du test immuno-enzymatique de chimiosensibilité.

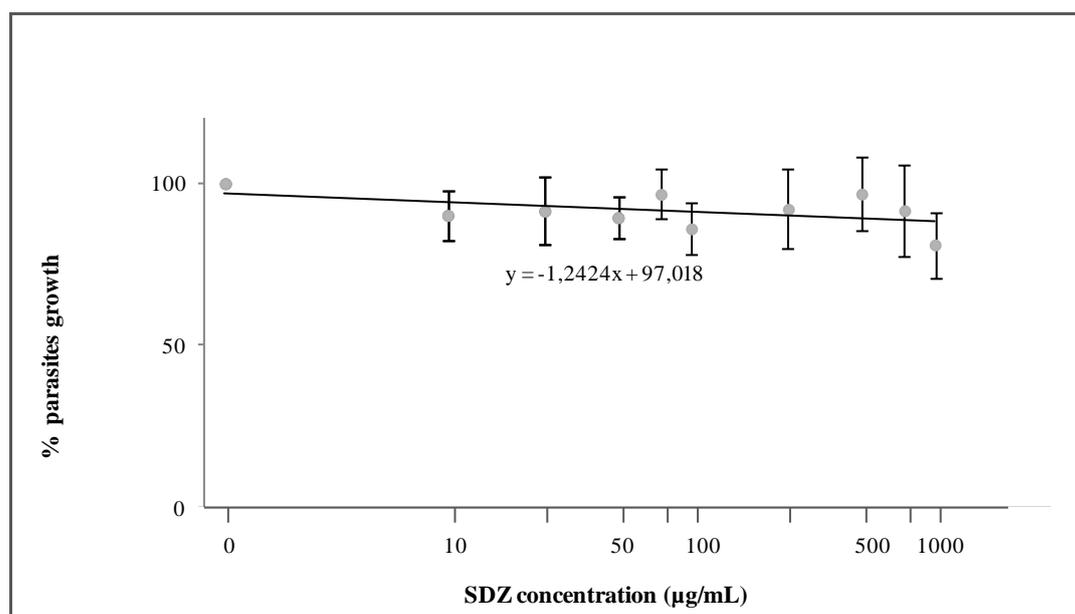


Figure 29. Effet *in vitro* de la sulfadiazine sur la croissance de la souche de *T. gondii* de Type II variant TgA 32045.

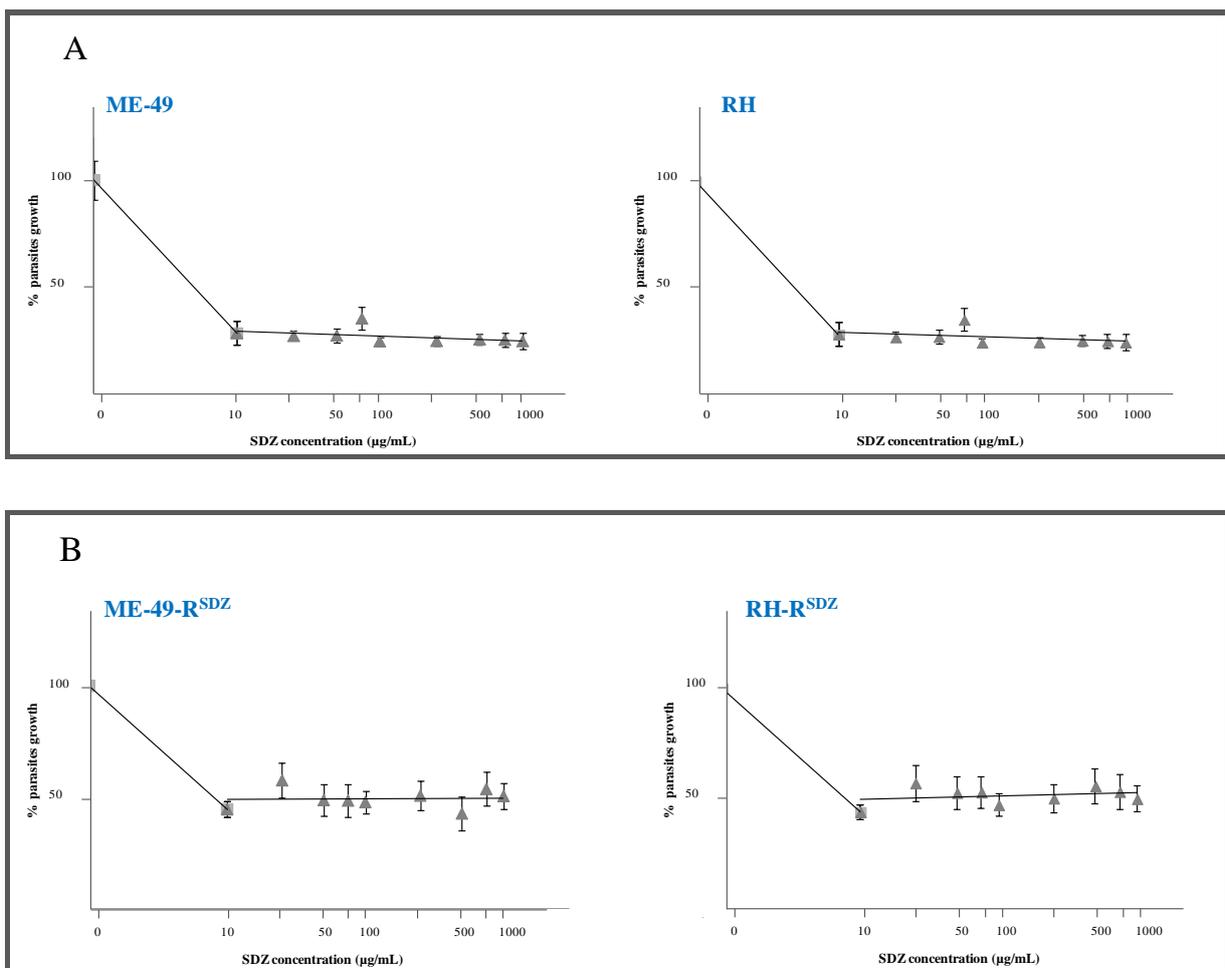
Le graphique représente la concentration de SDZ (axe des abscisses) en fonction du pourcentage de la croissance parasitaire par ELISA (axe des ordonnées) pour la souche TgA 32045. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET.

Les résultats montrent, de la même façon que pour les souches résistantes à la sulfadiazine (naturelles et induites) décrites dans l'Article 3, une absence d'effet de la SDZ sur la croissance parasitaire de la souche TgH 32045 avec une CI_{50} supérieure à 1000 $\mu\text{g/mL}$ de SDZ (**Figure 29**).

II. Etude de la sensibilité des souches de *T. gondii* à la sulfadiazine en présence de probénécide

Dans leur étude Berens et al. ont testé l'effet du vérapamil, inhibiteur d'efflux des Pgp, sur les mutants obtenus dans le but de réverser leur résistance. Cependant l'incubation en présence de 20 μM de Vérapamil n'a eu aucun effet sur les souches mutantes (Berens et al., 1998). De la même façon Nzila et al. ont montré, chez *P. falciparum*, la capacité du probénécide (50 μM) à réverser la résistance de souches résistantes aux antifolates (Nzila et al., 2003).

Nous avons étudié l'effet du probénécide sur les souches sensibles et résistantes de *T. gondii* grâce au test de chimiosensibilité mis au point sur cellules Vero.



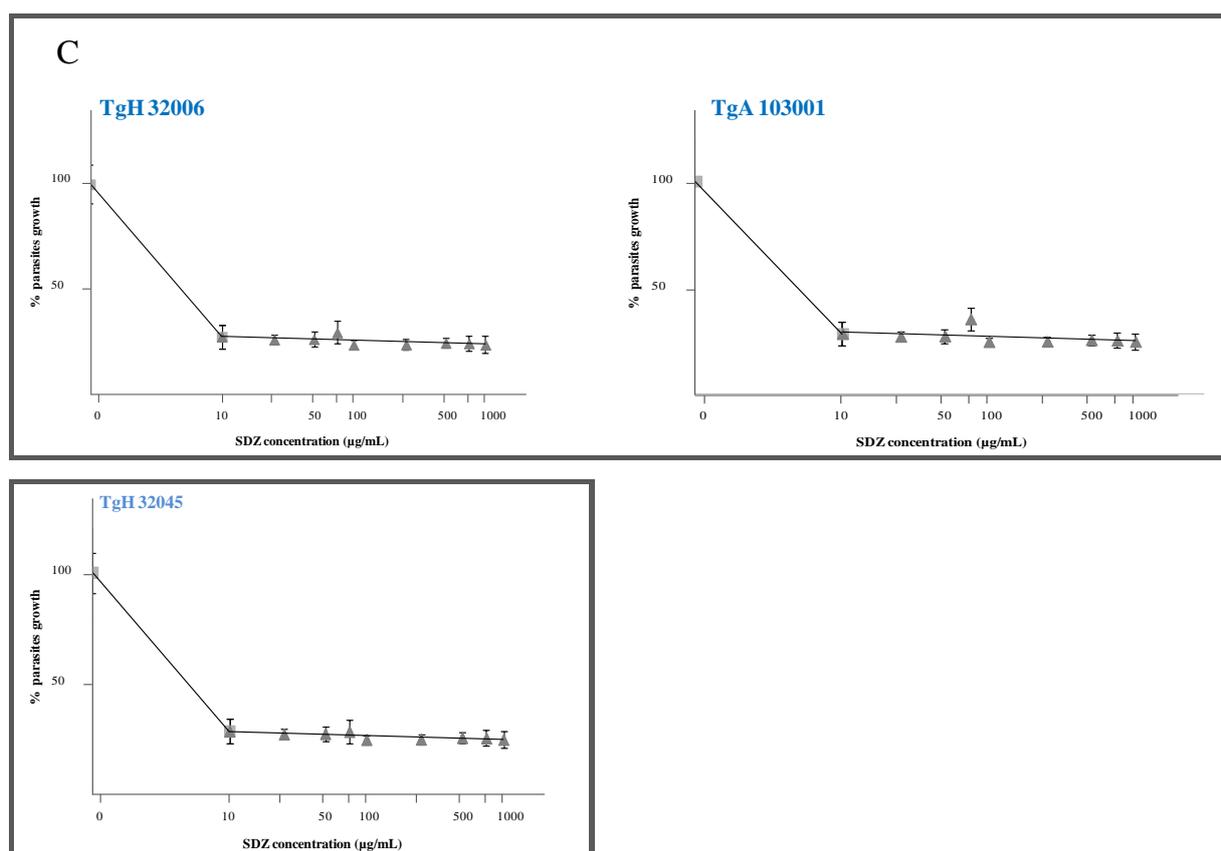


Figure 30. Effet *in vitro* de la sulfadiazine et du probénécide sur la croissance des souches sensibles (A), résistantes induites (B) et résistantes naturelles (C) de *T. gondii*.

Les graphiques représentent la concentration de SDZ (axe des abscisses) en présence d'1 mM de probénécide en fonction du pourcentage de la croissance parasitaire par ELISA (axe des ordonnées) pour les souches sensibles (ME-49 et RH), résistantes induites (ME-49-R^{SDZ} et RH-R^{SDZ}) et résistantes naturelles (TgH 32006, TgH 103001 et TgH 32045) de *T. gondii*. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm ET.

La sulfadiazine en présence d'1 mM de probénécide induit une diminution de la croissance parasitaire de 70 % pour les souches sensibles ME-49 et RH (**Figure 30A**), ceci à partir d'une concentration de 10 µg/mL de sulfadiazine. Le probénécide seul n'a aucun effet sur toutes les souches étudiées.

En présence d'1 mM de probénécide, on observe une diminution de 50 % de la croissance parasitaire pour les deux souches résistantes induites, ME-49-R^{SDZ} et RH-R^{SDZ} (**Figure 30B**).

Une diminution de la croissance parasitaire de 70 % est également observée pour les trois souches naturellement résistantes TgH 32006, TgH 32045 et TgA 103001 (**Figure 30C**). Ceci implique que le probénécide induit une réversion de la sensibilité des souches naturellement résistantes.

De façon intéressante, la réversion observée pour les deux souches résistantes induites est moins importante (50 %) que pour les souches naturellement résistantes (70 %).

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

- Le test immuno-enzymatique de chimiosensibilité spécifique à *T. gondii* développé par Derouin et Chastang, et utilisé sur cellules MRC-5 par Meneceur et al. (Meneceur et al., 2008) a été transposé à notre modèle cellulaire Vero présentant de nombreux avantages (rendement, pureté, viabilité, bon support pour la normalisation) contrairement aux cellules primaires MRC-5 qui ont une durée de vie limitée.
- Les valeurs des CI_{50} ont ainsi pu être déterminées sur notre modèle cellulaire. Les souches sensibles RH et ME-49 ont respectivement des CI_{50} de 77 $\mu\text{g/mL}$ de SDZ et 51 $\mu\text{g/mL}$ de SDZ. Les souches résistantes TgA 103001, TgH 32006 et TgH 32045 (résultat complémentaire) ont montré des valeurs de $CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ de SDZ. Nous avons donc confirmé les niveaux de résistance retrouvés précédemment sur cellules MRC-5.
- A partir de deux souches de référence RH et ME-49 de génotype I et II respectivement nous avons développé, par pression médicamenteuse croissante, deux souches, nommées RH-R^{SDZ} et ME-49-R^{SDZ} résistantes à la SDZ. Cette résistance a pu être vérifiée par notre test, et les deux souches résistantes induites ont montré des $CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ de SDZ comme les souches résistantes naturelles. Les souches RH-R^{SDZ} et ME-49-R^{SDZ} développées *in vitro* sont stables et restent résistantes à la sulfadiazine même après 5 mois de culture cellulaire en absence de SDZ.
- Nos souches résistantes induites montrent certains points communs avec les souches résistantes à l'artémisinine de Berens et al. (Berens et al., 1998) : après des cycles de congélation/décongélation et après plusieurs mois de culture sans ajout de drogue, la résistance est conservée dans les deux expériences (6 mois pour Berens et al., au moins 5 mois dans notre étude), contrairement à Cui et al. pour qui, en absence pression médicamenteuse chez *P. falciparum*, la résistance à l'artémisinine était réversée (Cui et al., 2012). Cependant si les mutants de *T. gondii* résistants à l'artémisinine montraient une vitesse de multiplication divisée par quatre, il n'en est rien pour nos souches mutantes résistantes à la sulfadiazine.

- Enfin, nous avons montré qu'en présence d'1 mM de probénécide, la sensibilité à la sulfadiazine de nos souches sensibles et résistantes était augmentée entraînant une réversion de la résistance de nos souches résistantes naturelles (TgA 103001, TgH 32006 et TgH 32045) et induites (RH-R^{SDZ} et ME-49-R^{SDZ}). Des expériences réalisées au laboratoire ont montré que cette réversion est dose-dépendante (résultats non montrés). Cependant, comme l'a souligné Nzila et al., la dose maximale de probénécide qui peut être administrée à l'homme est de 3 g par jour avec, pour une concentration à 2 g, une concentration sérique comprise entre 500 et 700 µM (Nzila et al., 2003).

Nos résultats montrent, pour la première fois, le développement *in vitro* de souches résistantes à la SDZ par pression médicamenteuse uniquement. Les souches décrites précédemment dans la littérature avaient été obtenues soit *in vivo* par passages sur des souris ayant reçu dans leur alimentation 0,5 mg de sulphaméthoxazole par jour pendant 290 jours (Sander et Midtvedt, 1971) soit *in vitro* par mutagenèse dirigée (Pfefferkorn et al., 1992). Nos souches présentent une résistance à la SDZ similaire à celles des souches naturellement résistantes ($CI_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ de SDZ). Ces souches feront un bon modèle d'étude pour comprendre les mécanismes de résistance à la SDZ chez *T. gondii*.

De plus, aucune modulation d'expression des gènes cibles et des ABC transporteurs précédemment étudiés (Partie I) n'a été retrouvée dans les souches résistantes RH-R^{SDZ} et ME-49-R^{SDZ} (données non montrées).

Partie IV. Analyse protéomique comparative des souches ME-49, ME-49-R^{SDZ} et TgH 32006

Afin d'analyser les mécanismes de résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii* par approche protéomique sur des souches de même fond génétique, nous avons développé *in vitro* deux souches résistantes à la sulfadiazine, RH-R^{SDZ} et ME-49-R^{SDZ}, à partir de deux souches sensibles, RH et ME-49. Dans cette partie, nous nous proposons de comparer, par électrophorèse bidimensionnelle, les protéomes des souches de génotype II, génotype le plus représentatif de la majorité des infections toxoplasmiques en France. Ainsi les protéomes des souches ME-49 (souche sensible à la sulfadiazine), TgH 32006 (souche résistante naturelle à la sulfadiazine) et ME-49-R^{SDZ} (souche résistante induite à la sulfadiazine) seront comparés et les spots protéiques présentant des variations d'intensité seront analysés par spectrométrie de masse.

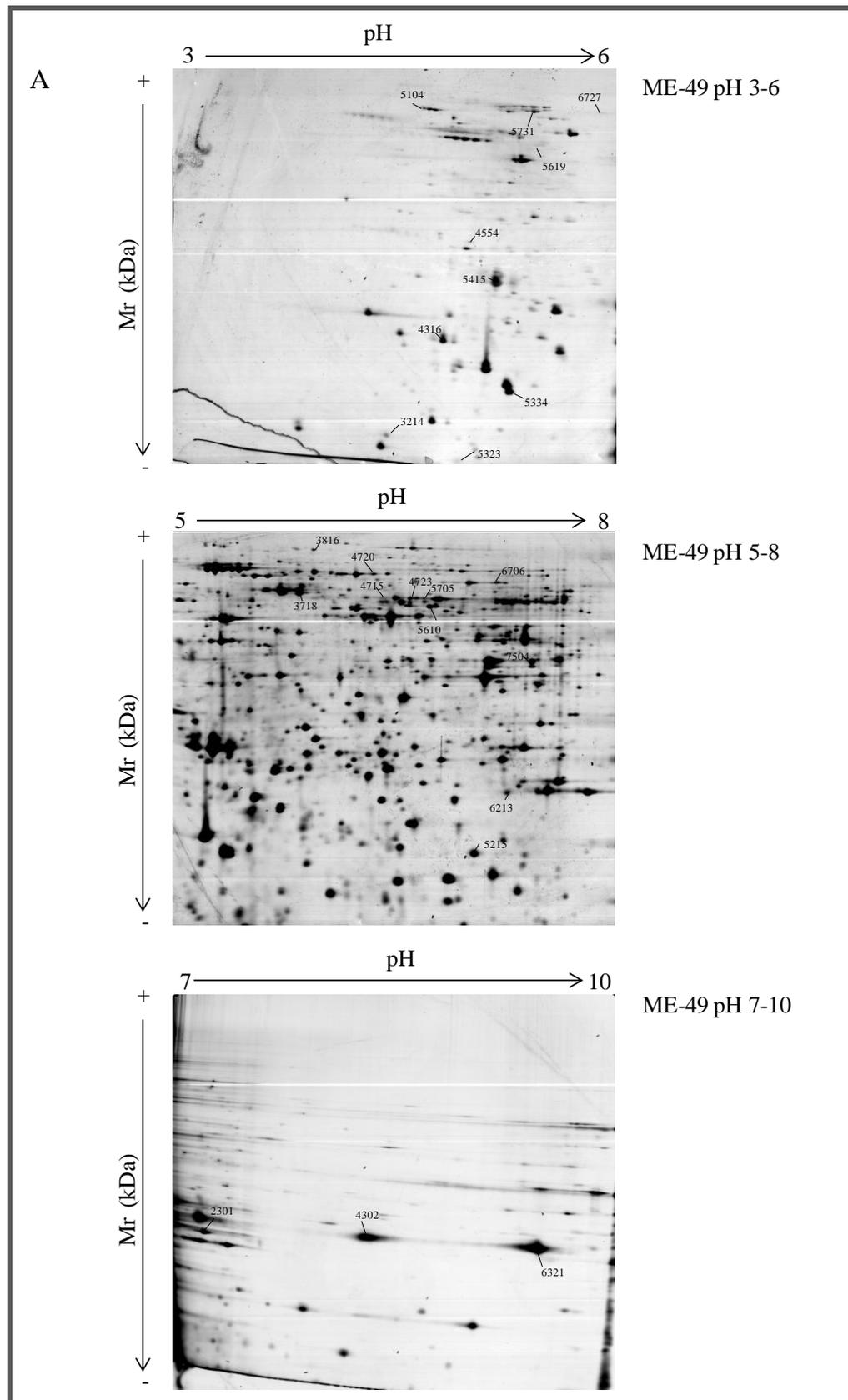
I. Cartographie protéique

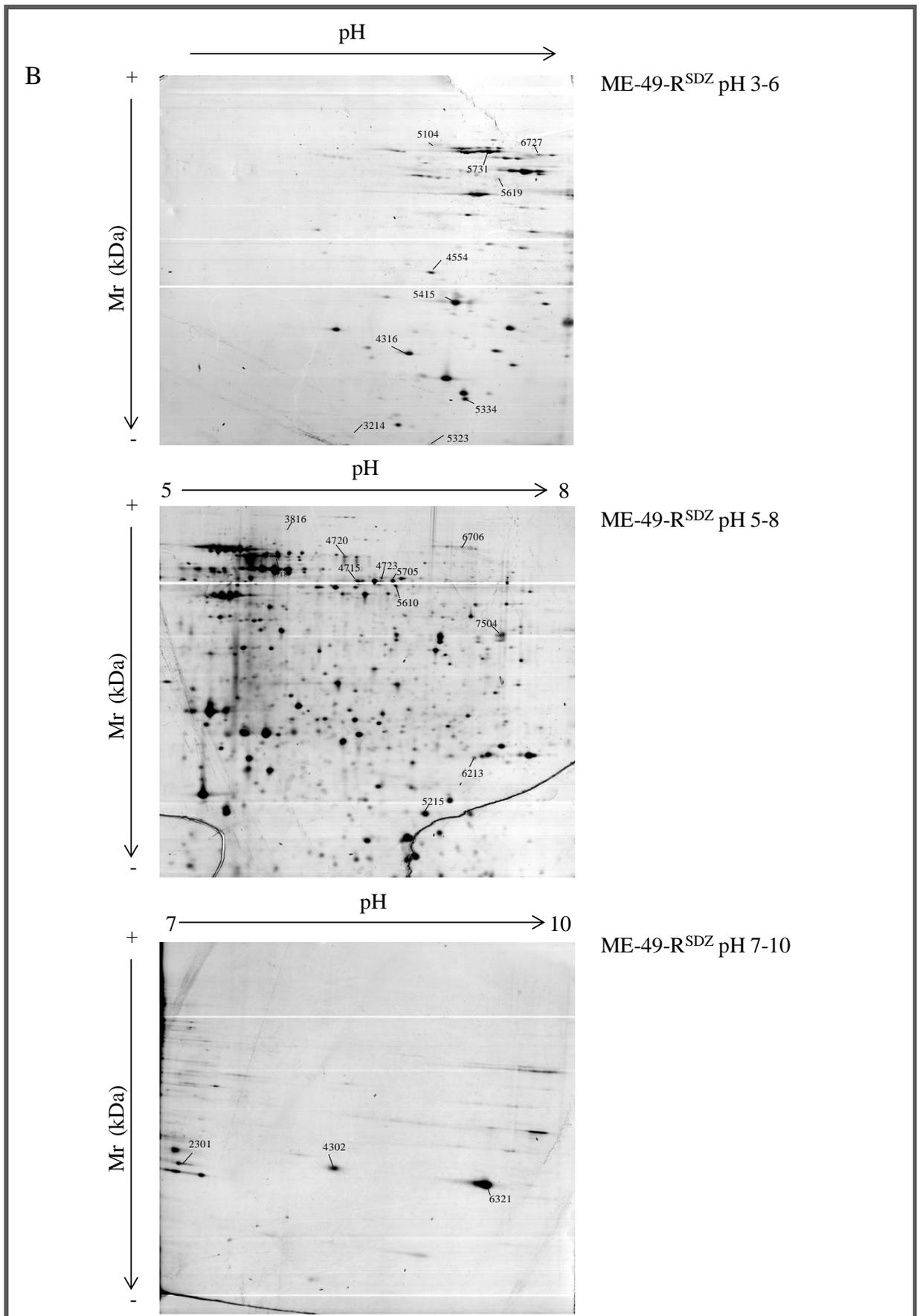
Dans un premier temps nous avons réalisé une cartographie protéique des trois souches étudiées : ME-49, TgH 32006 et ME-49-R^{SDZ}. Les isoélectrofocalisations ont été réalisées sur 3 gammes de pH restreintes: pH 3-6, pH 5-8 et pH 7-10. Dans la première partie, nous avons utilisé la technique de DIGE afin de comparer les protéomes de souches de *T. gondii* sensibles et naturellement résistantes à la sulfadiazine en utilisant de larges gammes de pH (3-10). Les cartographies obtenues étaient bien résolues cependant certaines zones apparaissaient assez denses en protéines. Dans cette partie, nous avons donc fait le choix d'utiliser des gammes de pH plus restreintes (pH 3-6, pH 5-8 et pH 7-10) afin d'améliorer la résolution dans ces différentes zones et de cibler un nombre plus important de protéines. De plus, la technique d'électrophorèse bidimensionnelle étant une technique moins sensible que la technique de DIGE, l'utilisation de gammes de pH plus restreintes permet de détecter des spots dont l'intensité était trop faible pour être visualisés sur pH 3-10.

La **Figure 31** montre 9 gels annotés représentant les protéomes des trois souches étudiées (ME-49, TgH 32006 et ME-49-R^{SDZ}) sur les trois gammes de pH choisies (pH 3-6, pH 5-8 et pH 7-10). Les trois premiers gels (**Figure 31A**) correspondent aux protéomes de la souche sensible ME-49 selon les 3 gammes de pH, les trois gels suivants représentent les protéomes de la souche résistante induite ME-49-R^{SDZ} (**Figure 31B**) et enfin les trois derniers gels correspondent aux protéomes de la souche naturellement résistante TgH 32006 (**Figure 31C**).

Nous pouvons également observer une grande abondance de protéines dans la gamme de pH 5-8, et une mauvaise résolution des protéines dans la gamme de pH 7-10 (**Figure 31**).

Tous les spots présentant une variation d'intensité inférieure à 0,5 fois ou supérieure à 2 fois entre la souche sensible ME-49 et l'une ou l'autre des souches résistantes (TgH 32006 et ME-49-R^{SDZ}) ont été excisés pour une identification par spectrométrie de masse. A partir des 101 spots excisés, seuls 25 spots protéiques ont été analysés par nano-LC-MS/MS. En effet, de nombreuses protéines n'ont pu être identifiées à cause d'une contamination des spots par la kératine.





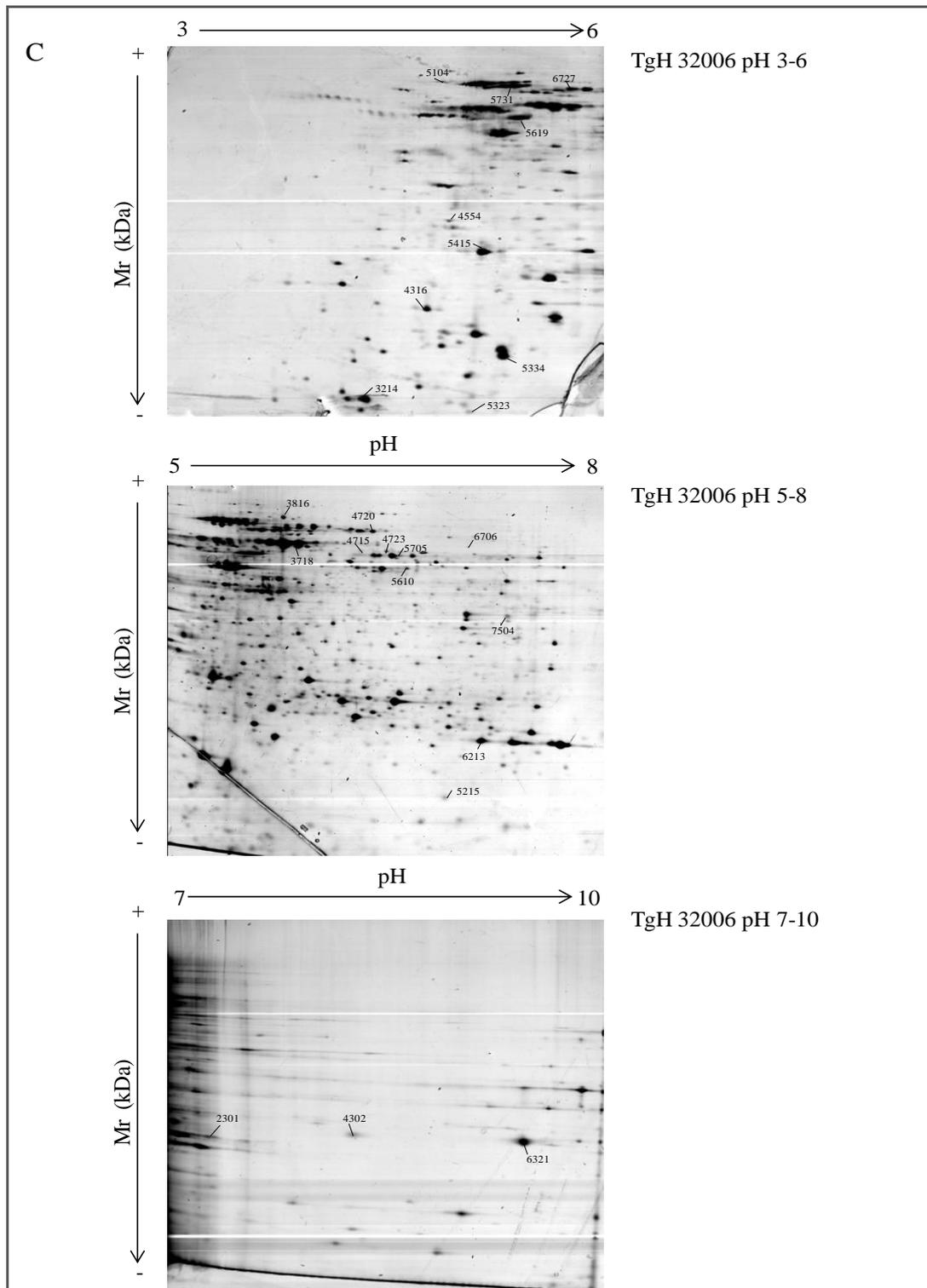


Figure 31. Cartographies protéomiques comparatives de trois souches de *T. gondii*: ME-49 (A), ME-49-R^{SDZ} (B) et TgH 32006 (C).

Le protéome de chacune des souches est cartographié selon 3 gammes de pH : pH 3-6, pH 5-8 et pH 7-10. Chaque gel est représentatif de quatre extractions différentes de tachyzoïtes analysées en quadruplicats, soit 12 gels analysés au total.

II. Etude comparative des protéomes de la souche sensible et des deux souches résistantes à la sulfadiazine

L'étude comparative des niveaux d'intensité des spots protéiques de ces différentes cartographies a permis de mettre en évidence 25 spots protéiques présentant des différences d'expression entre la souche sensible ME-49 et les deux souches résistantes à la sulfadiazine, TgH 32006 et ME-49-R^{SDZ}. L'analyse de ces 25 spots protéiques a permis l'identification de 15 protéines uniques. En effet, 5 protéines (GRA7, GRA2, hsp60, TCP-1/cpn60 family chaperonin et peroxiredoxine) ont été retrouvées dans différents spots protéiques (**Tableau XIII**).

Quatre protéines associées à l'interaction du parasite avec l'hôte ont été identifiées. Ces protéines sont principalement retrouvées dans les études portant sur l'invasion du parasite.

Trois protéines des granules denses ont été retrouvées dans notre étude, 28 kDa Antigen (GRA2), Dense Granule 5 (GRA5) et Dense Granule 7 (GRA7). Les protéines des granules denses jouent un rôle majeur dans les modifications de la vacuole parasitophore lors de l'invasion dans le but de maintenir le parasitisme intracellulaire dans les cellules hôtes (Nam, 2009). GRA2 est associée au réseau intravacuolaire du parasite et s'associe spécifiquement à GRA4 et GRA6 pour former un complexe stable impliqué dans le transport des protéines à l'intérieur de la vacuole parasitophore (Labruyere et al., 1999). GRA5, qui possède des domaines transmembranaires putatifs, pourrait permettre l'ancrage de la membrane de la vacuole parasitophore au réticulum endoplasmique (Kim et al., 2008). GRA7 est impliqué dans la séquestration des vésicules endolysosomales de l'hôte à l'intérieur de la vacuole parasitophore permettant ainsi au parasite d'avoir accès à un large éventail de protéines de faibles poids moléculaires produites par le système endo-lysosomal de l'hôte (Coppens et al., 2006)

Une seule protéine de rhoptries a été identifiée, ROP1, qui est un facteur de pénétration indispensable à l'invasion du parasite (Smith, 1995). En effet, il a été montré que ROP1 était sécrété dans la vacuole parasitophore au début de l'invasion puis disparaissait rapidement suggérant un rôle dès le début du processus d'invasion (Saffer et al., 1992).

Par ailleurs, quatre protéines régulatrices ont également été mises en évidence dont Hsp70, Hsp 60, TCP-1/cpn60 family chaperonin et Hsc70/Hsp90-organizing protein, qui sont des protéines chaperonnes retrouvées fréquemment dans les études protéomiques. Chez les protozoaires, les *heat shock proteins* jouent un rôle important dans le développement et la survie du parasite (Shonhai et al., 2011). La 18 kDa cyclophilin ou TgCyp18, protéine impliquée dans la réponse immunitaire, a également été retrouvée. Elle induit la production d'IL-12 par association directe avec le récepteur CCR5. Il a également été montré que TgCyp18 recrute les macrophages au niveau du site de l'infection et améliore la croissance cellulaire afin de maintenir l'interaction entre le parasite et l'hôte (Ibrahim et al., 2010).

Spot number	Accession no ^a	Protein name	MW/pI ^b	Gel identification	Sequence coverage (%)	Identified peptides ^c	Average ratios (/ ME-49) ^d	
							TgH 32006	ME-49-R ^{SDZ}
Carbohydrate metabolism								
5705	TGME49_056760	Pyruvate kinase, putative	58120/6.36	pH 5-8	7,91	4	0,25	0,14
5610	TGME49_068850	Enolase 2	52765/6.84	pH 5-8	8,63	3	0,67	0,26
Host cell interaction								
5415	TGME49_003310	Dense granule protein 7	25919/5.06	pH 3-6	19,5	3	2	0,94
5334	TGME49_003310	Dense granule protein 7	25919/5.06	pH 3-6	49,2	9	4,15	3,19
5323	TGME49_086450	Dense granule protein 5 precursor	12839/5.26	pH 3-6	11,7	1	2,03	1,77
5619	TGME49_109590	Rhoptry protein, putative (ROP1)	47996/4.9	pH 3-6	2,24	1	8,99	0,01
4302	TGME49_027620	28 kDa antigen (GRA2)	19805/10	pH 7-10	11,90	2	0,2	0,99
6321	TGME49_027620	28 kDa antigen (GRA2)	19805/10	pH 7-10	17,80	3	0,59	2
2301	TGME49_027620	28 kDa antigen (GRA2)	19805/10	pH 7-10	17,80	3	0,49	1
Protein folding								
5731	TGME49_111720	Heat shock protein 70, putative	72881/4.82	pH 3-6	24,70	11	0,01	5,68
3816	TGME49_047550	Heat shock protein 60	60915/5.78	pH 5-8	2,09	1	6,13	0,75
3718	TGME49_047550	Heat shock protein 60	60915/5.78	pH 5-8	2,09	1	3,01	1,51
4723	TGME49_097500	TCP-1/cpn60 family chaperonin, putative	59476/5.76	pH 5-8	15,00	6	0,95	0,02
4720	TGME49_043710	TCP-1/cpn60 family chaperonin, putative	59476/5.76	pH 5-8	15,10	8	0,41	0,16
5215	TGME49_021210	18 kDa cyclophilin	19605/6.52	pH 5-8	5,59	2	1,19	0,39
6706	TGME49_052220	Hsc70/Hsp90-organizing protein, putative	63344/6.44	pH 5-8	21,10	10	0,35	0,17
Protein binding								
5610	TGME49_009030	Actin	41908/4.81	pH 5-8	4,79	1	0,67	0,26
Translation								
4554	TGVEG_067410	Elongation factor 1-beta, putative	26876/4.43	pH 3-6	15,3	4	1,16	0,01

Cell redox homeostasis								
3214	TGME49_017890	Peroxiredoxin	21722/6.87	pH 3-6	33,70	5	4	0,92
6213	TGME49_017890	Peroxiredoxin	21722/6.87	pH 5-8	10,20	3	11,66	0,51
Purine metabolism								
6727	TGGT1_105180	Nucleoside-triphosphatase I, putative	69577/5.79	pH 3-6	6,05	3	4,41	3,19
Others/Unknown functions								
5104	TGME49_110290	Hypothetical protein, conserved	64902/7.36	pH 3-6	1,31	1	2,82	0,03
4316	TGME49_110790	Hypothetical protein, putative	24708/4.59	pH 3-6	11,90	3	1,2	2,42
7504	TGME49_110780	Hypothetical protein, putative	36330/6.8	pH 5-8	13,90	2	0,51	0,01
4715	TGME49_092320	Hypothetical protein, putative	97752/6.21	pH 5-8	0,88	1	0,38	0,02

Tableau XIII. Protéines différenciellement exprimées entre les souches ME-49, ME-49-R^{SDZ} et TgH 32006 de *T. gondii*

(a) Numéro d'accèsion dans la base de données ToxoDB

(b) Poids moléculaire et point isoélectrique théorique

(c) Nombre de peptides identifiés

(d) Ratio moyen normalisés par rapport à la souche ME-49. Les variations d'intensité inférieures à 0,5 ou supérieures à 2 ($p < 0,05$, Student t-test) sont considérés comme significatifs.

Les protéines surexprimées dans la souche naturellement résistante TgH 32006 sont écrites en **bleu**, les protéines sous-exprimées en **rose**.

Les protéines surexprimées dans la souche résistante induite ME-49-R^{SDZ} sont écrites en **vert**, les protéines sous-exprimées en **mauve**.

Les protéines surexprimées dans les deux souches résistantes, TgH32006 et ME-49-R^{SDZ}, sont encadrées en **violet**, les protéines sous-exprimées sont encadrées en **orange**.

Les protéines précédemment identifiées en DIGE sont **en gris**.

Les autres protéines identifiées sont principalement des éléments du métabolisme des carbohydrates (Pyruvate kinase et Enolase 2), de la traduction (EF1- β), du métabolisme des purines (NTPase I), de l'organisation cellulaire (actine), de l'homéostasie (peroxiredoxine) et 4 protéines sont hypothétiques.

La pyruvate kinase et l'ENO2 sont impliquées dans les mécanismes de glycolyse chez *T. gondii* jouant un rôle important dans la conversion tachyzoïte/bradyzoïte chez *Toxoplasma* (Tomavo, 2001). Cependant, les enzymes glycolytiques telles qu'ENO2 ont de multiples fonctions surtout chez les procaryotes, où elles sont utilisées pour d'autres fonctions que celles de départ, par exemple la régulation de l'expression des gènes (Discussion avec le Dr S. Tomavo).

EF1- β est un facteur d'élongation dont le rôle, à ce jour, n'a jamais été décrit chez *T. gondii*.

Chez *T. gondii*, la NTPase possède deux isoformes, NTPase I et II, qui diffèrent par leurs propriétés cinétiques (Asai et al., 2002). Les NTPases sont sécrétées en grande quantité après l'invasion de l'hôte, et Nakaar et al. ont montré qu'une inhibition du gène *NTPase* par des ARN anti-sens s'accompagnait d'une incapacité pour le parasite de se répliquer (Nakaar et al., 1999).

La peroxiredoxine (PRX) est une protéine impliquée dans les mécanismes de détoxification chez les eucaryotes et les procaryotes. Chez *T. gondii*, la PRX agit comme une enzyme anti-oxydante en éliminant le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles (Son et al., 2001). Plus récemment il a été montré qu'en interagissant avec l'histone lysine méthyltransférase (KMTox), PRX formait un complexe capable de réguler les gènes du parasite liés aux défenses antioxydantes et au maintien de l'homéostasie cellulaire (Marshall et al., 2011). Chez *P. falciparum*, il a été montré que la peroxiredoxine jouait un rôle dans la résistance à la doxycycline (Briolant et al., 2010).

Pour la souche naturellement résistante TgH 32006, 7 protéines uniques (GRA7, GRA5, ROP1, hsp60, Peroxiredoxine, NTPase I et une protéine hypothétique), identifiées dans 10 spots protéiques, sont surexprimées (intensité de variations > 2) (en bleu dans le **Tableau XIII**) et 6 protéines uniques (Pyruvate kinase, GRA2, hsp70, TCP-1/cpn60 family chaperonin, hsc70/hsp90 organizing protein et une protéine hypothétique), identifiées dans 7

spots protéiques, sont sous-exprimées (intensité de variations <0,5) (en rose dans le **Tableau XIII**).

Pour la souche résistante induite ME-49-R^{SDZ}, 4 protéines uniques identifiées (GRA7, hsp70, NTPase I et une protéine hypothétique) sont surexprimées (en vert dans le **Tableau XIII**) et 11 protéines uniques (Pyruvate kinase, ENO2, ROP1, TCP-1/cpn60 family chaperonin, hsc70/hsp90 organizing protein, 18 kDa cyclophilin, actine, EF1β et trois protéines hypothétiques), identifiées dans 12 spots protéiques, sont sous-exprimées (en mauve dans le **Tableau XIII**).

Parmi les 25 protéines identifiées, 6 protéines sont modulées de la même façon entre les deux souches résistantes, TgH 32006 et ME-49-R^{SDZ}. Deux protéines sont surexprimées dans les deux souches résistantes: GRA7 et NTPase I (encadrées en violet dans le **Tableau XIII**). Quatre protéines sont sous-exprimées dans les deux souches résistantes : pyruvate kinase, TCP-1/cpn60 family chaperonin, Hsc70/Hsp90-organizing protein ainsi qu'une protéine hypothétique (encadrées en orange dans le **Tableau XIII**).

Trois protéines (GRA7, GRA2 et TCP-1/cpn60 family chaperonin) identifiées dans plusieurs spots protéiques susceptibles de représenter différents isoformes, ont montré des différences d'expression contradictoires dans les différents spots protéiques (**Tableau XIII**). GRA7 est retrouvé dans 2 spots protéiques, l'un est surexprimé dans ME-49-R^{SDZ}, l'autre ne présente pas de différence d'expression avec la souche sensible ME-49. GRA2 est retrouvé dans 3 spots protéiques : 2 sont sous-exprimés dans la souche TgH 32006 et le 3^{ème} ne présente pas de différence d'expression avec la souche sensible ME-49 ; pour la ME-49-R^{SDZ}, un spot protéique est surexprimé et les deux autres ne présentent pas de différence d'expression avec la souche ME-49. TCP-1/cpn60 family chaperonin est retrouvé dans 2 spots protéiques : l'un est sous-exprimé dans la souche TgH 32006 et l'autre ne présente pas de différence d'expression avec la souche sensible ME-49. Ceci peut s'expliquer par la présence de modifications post-traductionnelles, du « *processing* » des protéines mais aussi de dégradations protéiques.

De façon intéressante, six des 15 protéines uniques identifiées dans cette étude ont précédemment été identifiées en DIGE (Article 2) : GRA2, GRA7, ENO2, hsp 70, Pyruvate kinase et NTPase I (surlignées en gris dans le **Tableau XIII**).

Protéine	Résultats 2-DE	Résultats DIGE		
	TgH 32006	TgA 103001	TgH 32006	TgH 32045
GRA2	↘	X	↗	X
GRA7	↗	X	X	↗↘
hsp70	↘	↘	X	X
NTPase I	↗	X	X	↗
ENO2	↘	↘	X	↘
Pyruvate kinase	↘	↘	X	X

Tableau XIV. Comparaison des résultats obtenus en 2-DE et en DIGE.

Seule GRA2 a été retrouvée différenciellement exprimée dans la souche résistante TgH 32006 en 2-DE et en DIGE. Les cinq autres protéines avaient été identifiées dans les deux autres souches naturellement résistantes TgA 103001 (Type I) et TgH 32045 (Type II variant) (**Tableau XIV**).

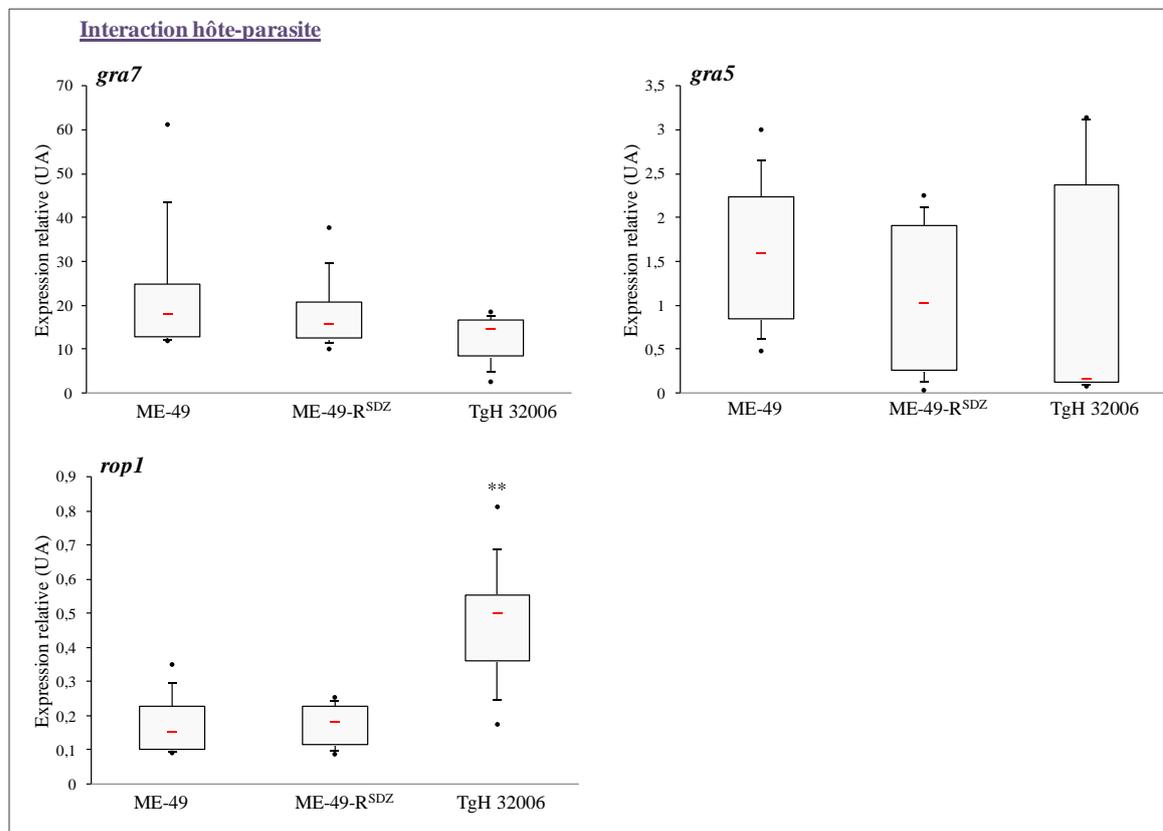
Hsp70, NTPaseI, ENO2 et pyruvate kinase sont régulées de la même façon dans les deux expériences, 2-DE et DIGE (**Tableau XIV**).

GRA2 est sous-exprimée dans la souche TgH 32006 en 2-DE et surexprimée en DIGE, cette variation peut s'expliquer par le fait que l'isoforme de la protéine identifiée est différent entre les deux expériences (**Tableau XIV**).

GRA7 présentait une régulation contradictoire dans la souche résistante TgH 32045 en DIGE et est surexprimée dans la souche résistante TgH 32006 en 2-DE. Cependant il a été montré que le gène *gra7* présente de nombreuses insertions et délétions (Khan et al., 2011). De plus la taille du fragment de *gra7* est de 761 pb pour de nombreuses souches de *T. gondii* à l'exception de la souche résistante TgH 32045 (758 pb). L'alignement des séquences montre 26 sites variables correspondant à 1 délétion de 3 pb et 25 substitutions nucléotidiques. Vingt-trois des 25 substitutions induisent un changement d'acides aminés (les mutations en position 267 et 549 sont silencieuses) (Marle-Plistat, 2005) (**Tableau XIV**).

III. Analyse du niveau d'expression génique par RT-PCR en temps réel

Afin de comparer l'expression relative des gènes codant pour les protéines identifiées en 2-DE, nous avons étudié, sur les trois souches étudiées en 2-DE : ME-49 (sensible), ME-49-R^{SDZ} (résistante induite) et TgH 32006 (résistante naturelle), les niveaux d'expression de différents gènes semblant intéressants de part leur rôle dans l'invasion parasitaire (*gra7*, *gra5*, *rop1*), leur rôle dans le développement et la survie du parasite (*hsp60* et *hsp70*), leur rôle dans l'interaction hôte-parasite (*cyclosporine 18*), leur rôle dans la détoxification (*peroxiredoxine*) et leur rôle dans la réplication du parasite (*NTPase I*) (**Figure 32**).



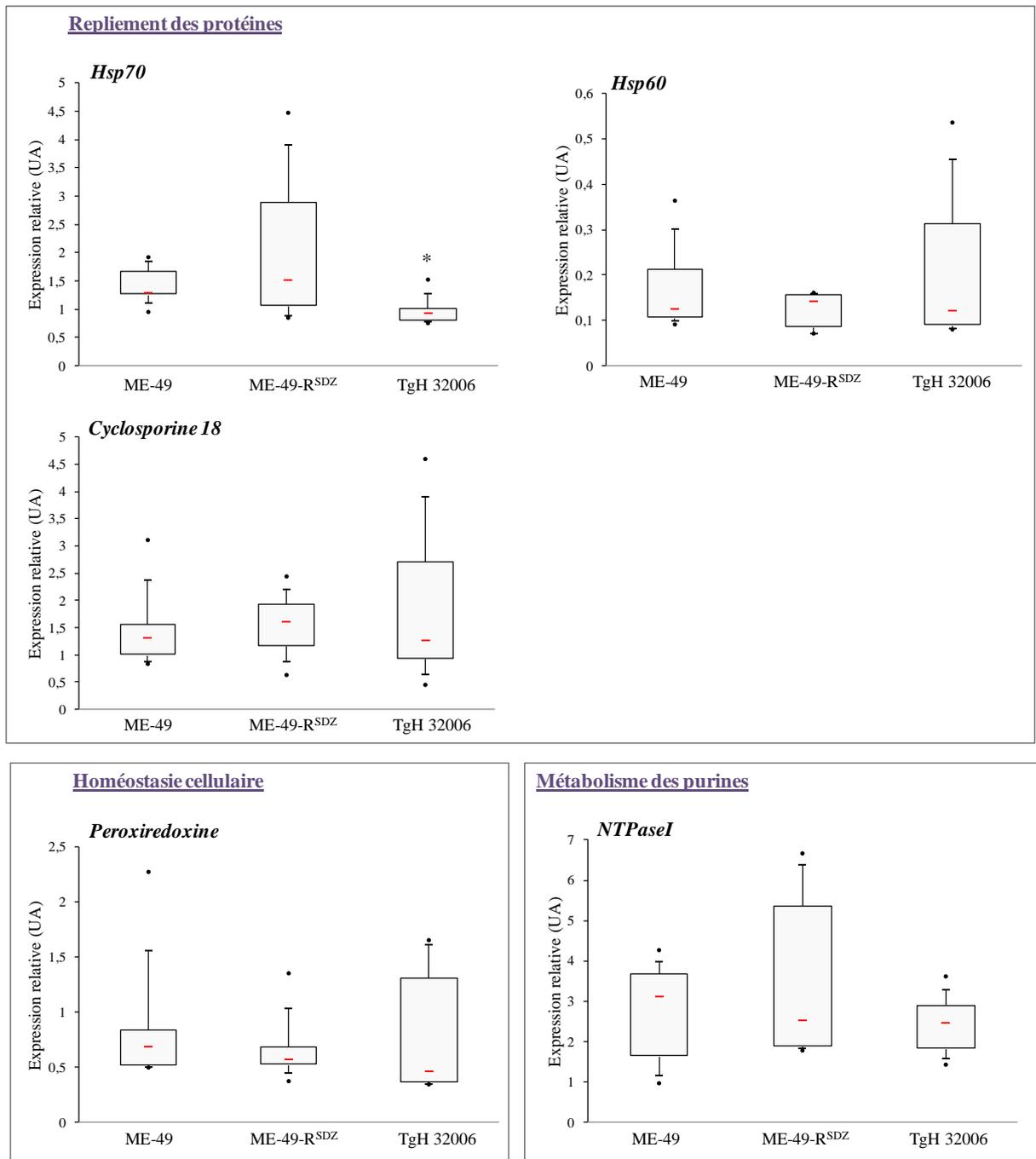


Figure 32. Expression relative des gènes *gra7*, *gra5*, *rop1*, *hsp60*, *cyclosporine 18*, *peroxiredoxine* et *NTPase I* sur la souche sensible ME-49 et sur les souches résistantes ME-49-R^{SDZ} et TgH 32006, normalisée par rapport au gène de la β -tubuline chez *T. gondii*.

Les résultats sont issus de cinq expériences indépendantes réalisées en duplicate et présentés comme une médiane \pm interquartiles. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

L'analyse du niveau d'expression des gènes *gra7*, *gra5*, *hsp60*, *cyclosporine 18*, *peroxiredoxine* et *NTPase I* ne montrent pas de modifications d'expression significative entre les trois souches étudiées (**Figure 32**).

Rop1 est significativement plus exprimé dans la souche naturellement résistante TgH 32006 que pour les deux autres souches. Ce résultat est en parfaite corrélation avec celui obtenu en 2-DE (**Tableau XIII**).

Hsp70 est significativement sous-exprimé dans la souche naturellement résistante TgH 32006 en comparaison aux souches ME-49 et ME-49-R^{SDZ}. Ce résultat est en corrélation avec celui obtenu en 2-DE (**Tableau XIII**).

Hsp70 et ROP1 sont différenciellement exprimées dans la souche naturellement résistante TgH 32006 aussi bien en expression de gènes que de protéines. De manière intéressante, les variations entre souches naturellement résistantes et sensibles sont plus importantes que celles visualisées entre ME-49 et ME-49-R^{SDZ}, permettant d'envisager que le mécanisme de résistance puisse être différent entre les deux souches résistantes ou, comme déjà souligné précédemment, que ces différences ne soient dues qu'aux variations intrinsèques liés aux différences de fond génétique. Nous pouvons également souligner que de nombreuses protéines pourtant différenciellement exprimées n'ont pu être analysées en raison d'une contamination par la kératine.

IV. Discussion sur la protéomique

Nous avons présenté ici, une approche expérimentale par 2-DE afin d'étudier les variations d'expression protéique entre souches sensible et résistantes (naturelle et induite) à la sulfadiazine chez *T. gondii*. Cependant aucune des protéines identifiées n'a permis de mettre en évidence un mécanisme de résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii*. Plusieurs points seront discutés ici.

La protéine étant plus proche de la fonction que le gène, notre protocole expérimental s'est porté, dans un premier temps, sur l'approche protéomique afin d'étudier les mécanismes de résistance. Dans la première partie, nous avons utilisé la technique de DIGE qui est une technique plus sensible et plus reproductible que la 2-DE. Cependant, la DIGE ne permet d'étudier que deux échantillons biologiques à la fois en marquant les protéines par des Cyanines fluorescentes (la troisième Cyanine servant au marquage du standard interne). La technique de DIGE n'ayant pas permis de mettre en évidence l'expression différentielle de protéines déjà connues comme impliquées dans les phénomènes de résistance et devant les difficultés liées à l'appréhension des variations liées aux différences de fond génétique, nous avons fait le choix d'utiliser la technique de 2-DE afin de comparer les protéomes des trois souches étudiées après avoir obtenu une souche résistante par pression médicamenteuse croissante à la sulfadiazine.

Nous avons utilisé pour la coloration de nos gels, le nitrate d'argent qui est à l'heure actuelle, le colorant le plus sensible permettant de détecter jusqu'à 0,5 ng de protéines par spot protéique (Rabilloud, 2012). Cependant cette coloration n'est pas la plus appropriée pour une étude quantitative en raison de sa faible linéarité (1 ordre de grandeur seulement). Depuis quelques années, plusieurs types de colorations fluorescentes se sont développées, telles que le Sypro Ruby[®] (que nous avons utilisé pour la DIGE) ou encore le Deep Purple[™]. Ces méthodes sont basées sur un marquage fluorescent des protéines. Elles offrent ainsi à la fois une bonne sensibilité, de l'ordre du ng, et des gammes de linéarité de 3 à 4 ordres de grandeurs. Par rapport au Sypro Ruby[®], le Deep Purple[™] présente plusieurs avantages : sa gamme de linéarité couvre 4 ordres de grandeur au lieu de 3, il produit très peu de points de

précipitation qui sont des obstacles pour l'analyse quantitative et il offre un meilleur recouvrement de séquence par spectrométrie de masse (Mackintosh et al., 2003).

La méthode de l'électrophorèse bidimensionnelle est, aujourd'hui encore, une méthode de choix lorsque l'on commence une étude protéomique sur un phénomène biologique nouveau. La technique d'électrophorèse bidimensionnelle a prouvé son utilité dans de nombreuses études portant sur la résistance médicamenteuse. Chez *Leishmania*, la 2-DE a permis de montrer la surproduction de la pteridine réductase PTR1 (Drummelsmith et al., 2003) et de l'adénosyle méthionine transférase MAT (Drummelsmith et al., 2004) chez des parasites résistants aux MTX. D'autre part, une analyse protéomique de souches du terrain résistantes à l'antimoine *L. donovani* a révélé l'expression différentielle de deux protéines Hsp83 et SKCRP14.1 (Small Kinetoplastid Calpain-Related Protein) qui semblent être impliquées dans le phénomène de la mort cellulaire programmée (Vergnes et al., 2007).

Cependant la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle présente certaines limites. L'incorporation des protéines dans une électrophorèse 2D est limitée et rend difficile l'accès aux protéines faiblement exprimées par rapport à celles qui sont naturellement très abondantes. De plus, il est très difficile, par cette technique, de détecter les protéines de haut poids moléculaire, les protéines hydrophobes, ainsi que les protéines membranaires ce qui rend difficile la visualisation, par exemple, d'ABC transporteurs (Santoni et al., 2000). Les protéines de pH extrême sont souvent mal résolues comme nous avons pu l'observer lors de l'utilisation de la gamme de pH 7-10.

Aujourd'hui le développement des méthodes hors gel permettent également de réaliser des analyses quantitatives différentielles à partir d'échantillons protéiques. Les méthodes ICATTM (*Isotope-Coded Affinity Tag*) et iTRAQTM (*Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification*) basées sur le marquage isotopique, seraient appropriées pour notre étude. Elles consistent en l'ajout d'un « tag » isotopique sur les cystéines des protéines pour l'ICATTM ou des groupements amines pour l'iTRAQTM. Les différents états isotopiques stables de ces « tags » sont utilisés pour marquer de façon spécifique les échantillons à comparer. La quantification relative de ces « tags » permet de comparer l'abondance de

chacune des protéines marquées dans les différents échantillons. Ces méthodes permettent de comparer quatre échantillons au maximum.

Enfin, un des problèmes majeurs en 2-DE, que nous avons rencontré lors de cette étude, est la contamination des spots protéiques par la kératine. Malgré les précautions prises pour éviter ce problème (port de gants, masques, charlotte, changement de blouse, salle réservée à la 2-DE, etc), plus de 2/3 des spots protéiques piqués n'ont pu être identifiés par spectrométrie de masse. La protéomique est une technique puissante mais qui nécessite une connaissance et un savoir-faire spécifique.

La protéomique, plus précisément l'électrophorèse bidimensionnelle, n'ayant pas permis de répondre à notre problématique, nous avons fait le choix, dans la suite de l'étude, d'utiliser une technique complémentaire dans l'étude des mécanismes de résistance : les puces à ADN ou microarrays.

Summary of Part IV. Comparative proteomic analysis of ME-49, ME-49-R^{SDZ} and TgH 32006 strains.

I. Results

To analyze the resistance mechanisms to sulfadiazine on *T. gondii* by proteomic on strains with same genotype, we developed *in vitro* two strains resistant to sulfadiazine, RH-R^{SDZ} and ME-49-R^{SDZ}. In this section, we compared by 2-DE proteomes of Type II strains, the most representative genotype of the majority of *Toxoplasma* infections in France. Proteomes of strains ME-49 (sensitive strain to sulfadiazine), TgH 32006 (naturally resistant strain to sulfadiazine) and ME-49-R^{SDZ} (induced resistant strain to sulfadiazine) were compared and proteins spots showing changes in intensity were analyzed by mass spectrometry.

On the first hand, we realized a protein mapping of the three strains studied: ME-49, ME-49-R^{SDZ} and TgH 32006. Isoelectrofocalisations were performed using three restrictive pH ranges: pH 3-6, pH 5-8 and pH 7-10. In the Part I., we used DIGE technique to compare proteomes of sensitive and naturally resistant strains using wide range of pH (3-10). The maps obtained were well resolved, however some areas appeared with many proteins. In this part, we therefore decided to use smaller ranges of pH (pH 3-6, pH 5-8, pH 7-10) to improve the resolution in these areas and target more proteins.

Figure 31 shows nine annotated gels representative of the proteomes of the three strains studied (ME-49, ME-49-R^{SDZ} and TgH 32006) on the three selected pH ranges (pH 3-6, pH 5-8 and pH 7-10).

Protein spots which appeared with an intensity variation less than 0.5 fold or more than 2 fold, between the sensitive strain ME-49 and resistant strains ME-49-R^{SDZ} or TgH 32006, were excised for identification by mass spectrometry. From the 101 excised protein spots, only 25 spots were analyzed by nano-LC-MS/MS. Indeed, many proteins could not be identified due to contamination by keratin. The analysis of these 25 protein spots allowed the

identification of 15 unique proteins. Indeed, five proteins (GRA7, GRA2, hsp60, TCP-1 chaperonin family and peroxiredoxin) were found in different gel spots (**Table XIII**).

The 25 proteins identified in this study are implicated in many biological mechanisms such as Host cell interaction (GRA7, GRA5, GRA2 and ROP1), Carbohydrate metabolism (Pyruvate kinase and ENO2), Protein folding (Hsp70, Hsp60, TCP-1/cpn60 family chaperonin, 18 kDa cyclophilin and Hsc70/Hsp90-organizing protein), translation (EF1- β), Purine metabolism (NTPase I), Protein binding (Actin), Cell redox homeostasis (Peroxiredoxin) and four hypothetical proteins.

For the naturally resistant strain TgH 32006, 7 unique proteins identified in 10 protein spots are overexpressed (written in blue in **Table XIII**) and 6 unique proteins identified in 7 protein spots are underexpressed (written in pink in **Table XIII**).

For the induced resistant strain ME-49-R^{SDZ}, 4 unique proteins are overexpressed (written in green in **Table XIII**) and 11 unique proteins identified in 12 protein spots are underexpressed (written in purple in **Table XIII**).

Among the 25 identified proteins, 6 proteins are modulated in the same way between the two resistant strains ME-49-R^{SDZ} and TgH 32006: GRA7 and NTPase I are overexpressed (purple framed in **Table XIII**) and Pyruvate kinase, TCP-1/cpn60 family chaperonin, Hsc70/Hsp90-organizing protein and one hypothetical protein are underexpressed (orange framed in **Table XIII**).

Moreover, three proteins (GRA7, GRA2 and TCP-1/cpn60 family chaperonin) were identified in multiple gel spots and as such are likely to represent different protein isoforms, showed contradictory expression changes in different gel spots. This could be explained by post-translational modifications, proteins processing but also protein degradation.

Interestingly, 6 of the 15 unique proteins identified were previously identified in DIGE (Article 2): GRA2, GRA7, ENO2, Hsp70, Pyruvate kinase and NTPase I (underlined in grey in **Table XIII**).

Only GRA2 was found differentially expressed in the resistant strain TgH 32006 in both 2-DE and DIGE. The other 5 proteins were identified in the other two naturally resistant strains TgA 103001 (Type I) and TgH 32045 (Type II variant) (**Table XIV**). The difference

of regulation between the two studies could be explained by the difference of isoforms identification.

Expression levels of different genes seem interesting because of their role in parasite: invasion (*gra7*, *gra5* and *rop1*), parasite development and survival (*hsp60* and *hsp70*), host-parasite interaction (*cyclosporine 18*), detoxification (*peroxiredoxin*) and in parasite replication (*NTPase I*) were analyzed by qRT-PCR in the three strains studied (**Figure 32**).

No modulations of gene expression were observed for *gra7*, *gra5*, *hsp60*, *cyclosporine 18*, *peroxiredoxin* and *NTPaseI* (**Figure 32**). *Rop1* is significantly overexpressed in TgH 32006 (**Figure 32**) as shown in 2-DE (**Table XIII**) and *hsp70* is significantly underexpressed (**Figure 32**) as shown in 2-DE (**Table XIII**).

Hsp70 and ROP1 are differentially expressed in naturally resistant strain TgH 32006 in both gene expression and proteins. Interestingly, the variation between naturally resistant and sensitive strains are greater than those displayed between ME-49 and ME-49-R^{SDZ}, we can hypothesized that the resistance mechanism may be different between the two resistant strains, as already noted above, these differences are due only to intrinsic variations related to differences in genetic background. We also note that many differentially expressed proteins yet could not be analyzed due to contamination by keratin.

II. Discussion

The method of 2-DE is still a method of choice when you start a proteomic study on a new biological phenomenon. The technique of two-dimensional electrophoresis has proven its usefulness in many studies on drug resistance.

However, 2-DE technique has some limitations. The incorporation of proteins in 2-DE is limited, making it difficult to access weakly expressed proteins compared to those who are naturally very abundant. In addition, it is very difficult with this technique to detect proteins of high molecular weight, hydrophobic proteins, and membrane proteins which makes it difficult to view, for example, ABC transporters (Santoni et al. 2000). Proteins extreme pH are often poorly resolved as we have observed in the use of the pH range 7-10.

Finally, a major problem in 2-DE met in this study, is the contamination of protein spots by keratin. Despite the precautions taken to avoid this problem (gloves, mask, mobcap,

lab-coat changing, room reserved for 2-DE, etc.), more than two thirds of the protein spots could not be identified by mass spectrometry. Proteomics is a powerful technique but requires knowledge and know-how.

Proteomics, and more precisely 2-DE, having failed to respond to our problem, we chose in the following study to use a complementary technique to study resistance mechanisms: microarrays.

Partie V. Analyse transcriptomique comparative des souches ME-49 et ME-49-R^{SDZ}

I. Analyse transcriptomique des souches ME-49 et ME-49-R^{SDZ}

Afin de mettre en évidence l'implication de gènes dans la résistance médicamenteuse chez *T. gondii*, nous avons analysé les transcriptomes des souches ME-49 et ME-49-R^{SDZ} par la technique de microarrays en utilisant la puce spécifique développée chez *T. gondii* (Tgondiaa520372, AffymetrixTM) (**Figure 33**). La technique de microarrays étant une technique coûteuse qui nécessite l'utilisation de nombreuses puces afin d'être reproductible, nous avons seulement étudié deux souches de *T. gondii* : ME-49 et ME-49-R^{SDZ}.

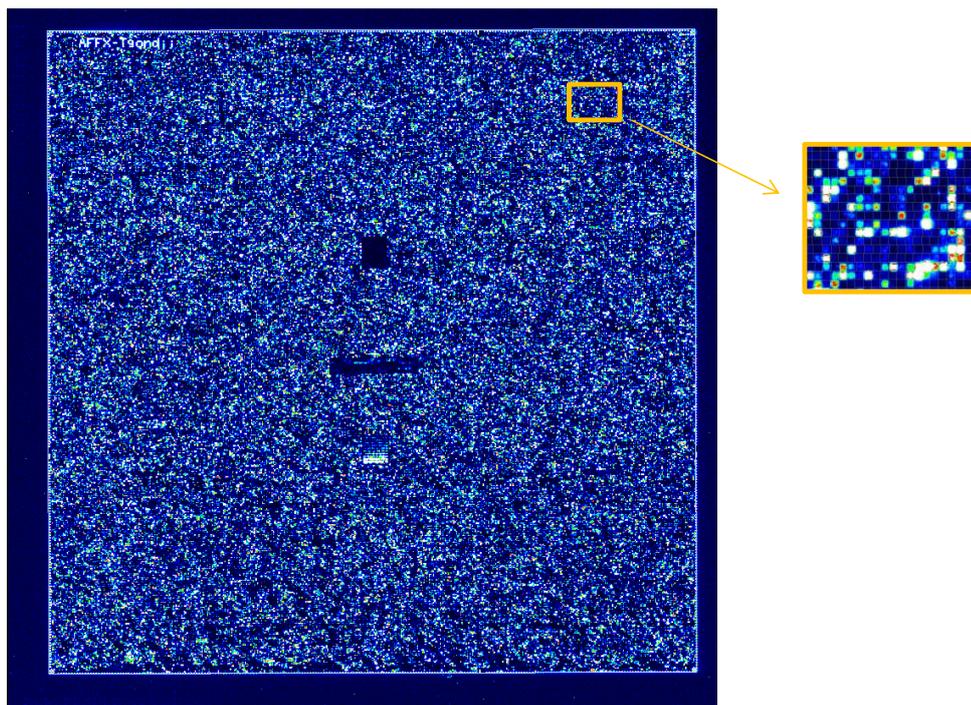


Figure 33. Photographie de la puce Tgondiaa520372 (AffymetrixTM)

L'analyse de l'expression des ARNm de ces deux souches a permis de mettre en évidence, parmi les 8993 gènes qui composent la puce, 165 gènes présentant une variation de leurs niveaux d'expression inférieure à 0,5 fois ou supérieure à 2 fois. Parmi ces 165 gènes,

45 correspondaient à des protéines hypothétiques et 91 correspondaient à des protéines humaines. Les tachyzoïtes étant cultivés sur des cellules Vero (Cellules rénales de Singe Vert d'Afrique), il est envisageable que des ARN de débris cellulaires aient pu être extraits en même temps que les ARN de tachyzoïtes, et se retrouvent donc exprimés dans cette analyse.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence 29 gènes exprimés différemment entre la souche sensible ME-49 et la souche résistante ME-49-R^{SDZ}. Nous avons observé, chez ME-49-R^{SDZ}, une augmentation d'expression de 23 gènes et une diminution d'expression de 6 gènes par comparaison à la souche ME-49 (**Tableau XV**).

N° d'accèsion dans ToxoDB	Expression ME-49-R ^{SDZ} /ME-49	t test de Student	Nom
113.m00800	28,74	1,95221E-11	DNA primase, large subunit, putative
59.m00040	14,76	5,63167E-10	Folypolyglutamate synthase, putative
20.m00387	6,59	7,67124E-06	SUB1 subtilase family serine protease, putative
46.m01710	6,31	1,17628E-07	Zinc finger (C3HC4 RING finger) protein, putative
33.m01394	5,94	1,04391E-07	WD-repeat protein (hussy-07), putative
35.m00027	5,15	4,9629E-07	Ankyrin repeat-containing protein
641.m00008	5,08	9,85385E-08	Ras-related protein RAB11B, putative
76.m01615	4,31	5,65366E-07	TBC domain-containing protein
46.m01710_x	3,81	1,84098E-06	Zinc finger (C3HC4 RING finger) protein, putative
148.m00016	3,50	0,000102153	RNA polymerase Rpb1, domain 5 family protein
641.m02546	3,08	7,09309E-07	GTPase regulator-related
148.m00016_x	2,99	9,7629E-05	RNA polymerase Rpb1, domain 5 family protein
49.m05662	2,79	0,000339455	Junctophilin-like 1 protein-related
148.m00014	2,66	0,001871818	DNA dependent RNA polymerase beta subunit
83.m00010	2,49	2,37279E-07	Polyketide synthase, putative
54.m00004_x	2,48	3,937E-06	Cytochrome oxidase I
80.m05396	2,43	0,000173928	Serine/threonine-protein kinase, putative
46.m03691_x	2,30	1,95948E-05	Cytochrome b, putative
35.m01589	2,18	1,28184E-05	Zinc finger (C3HC4 RING finger) protein, putative
583.m09209	2,15	2,4018E-07	Lysosomal acid phosphatase-related
31.m00879	2,13	5,74866E-05	Dentin sialophosphoprotein-related
46.m01660	2,07	0,000100819	ATPase, AAA family domain-containing protein
57.m00009	2,06	0,002423468	Transmembrane domain-containing protein
162.m00313	0,50	0,000109845	SRS19F GPI-anchored surface antigen, putative
49.m05734	0,46	0,000322065	Trichohyalin, putative
72.m00004	0,41	1,34296E-05	Bradyzoite surface antigen
80.m02311	0,32	4,00981E-06	Glutamic acid-rich protein, putative
42.m03416	0,24	4,56428E-07	Nucleoside-triphosphatase, putative
80.m02212	0,18	2,77491E-07	White protein, putative

Tableau XV. Gènes présentant des variations d'expression entre ME-49 et ME-49-R^{SDZ} par microarrays.

Nous pouvons observer une surexpression de 28 fois de la DNA primase dans la souche résistante ME-49-R^{SDZ} (en vert dans le **Tableau XV**). La DNA primase est une protéine impliquée dans les mécanismes de réplication de l'ADN. Sa surexpression suggère que la synthèse protéique est accélérée pour la souche résistante ME-49-R^{SDZ}.

La SUB1 subtilase family serine protéase est surexprimée 6 fois dans la souche ME-49-R^{SDZ} (en vert dans le **Tableau XV**). TgSUB1 est une subtilysine-like sérine protéase micronémale localisée à la surface cellulaire après la sécrétion des micronèmes (Binder et al., 2008). Les subtilysines pourraient jouer un rôle critique pour la survie du parasite puisque les inhibiteurs de sérine protéases préviennent l'invasion chez *T. gondii* (Conseil et al., 1999), bloquent le développement intracellulaire (Shaw et al., 2002) ainsi que la sortie hors de la cellule hôte (Yeoh et al., 2007).

Le gène codant pour la Zinc finger est retrouvé surexprimé à 3 reprises dans la souche résistante ME-49-R^{SDZ} (en vert dans le **Tableau XV**). Les Zinc finger sont des protéines qui se lient à l'ADN et contrôlent le transfert de l'information génétique à l'ARN.

Nous pouvons également observer une surexpression de 3 fois de la RNA polymérase Rpb1 dans la souche résistante ME-49-R^{SDZ} (en vert dans le **Tableau XV**). Les RNA polymérases catalysent la polymérisation de l'ARN à partir d'une matrice d'ADN lors de la transcription. Les procaryotes contiennent une unique ARN polymérase alors que les eucaryotes en possèdent trois (sans compter les ARN polymérases des mitochondries ou des chloroplastes).

Enfin, la présence de la Folylpolylglutamate synthase (FPGS) surexprimée plus de 14 fois dans la souche résistante ME-49-R^{SDZ} nous apparaît très intéressante (en rose dans le **Tableau XV**) en raison de son rôle dans la voie de synthèse des folates.

II. Analyse du niveau d'expression du gène *fpgs* par RT-PCR en temps réel sur l'ensemble des souches

Nous avons donc vérifié ces résultats en étudiant les niveaux d'expression du gène *fpgs* par PCR en temps réel sur les deux souches étudiées en microarrays, ME-49 et ME-49-R^{SDZ}, mais également sur les souches RH (sensible, Type I) et RH-R^{SDZ} (résistante induite, Type I) et sur les trois souches naturellement résistantes TgA 103001, TgH 32006 et TgH 32045.

L'étude du niveau d'expression du gène *fpgs* pour toutes ces souches permettra de répondre à plusieurs questions :

- ✓ Le gène *fpgs* est-il également surexprimé dans la souche induite RH-R^{SDZ}?
- ✓ Les souches naturellement résistantes présentent-elles aussi une surexpression du gène *fpgs* ?

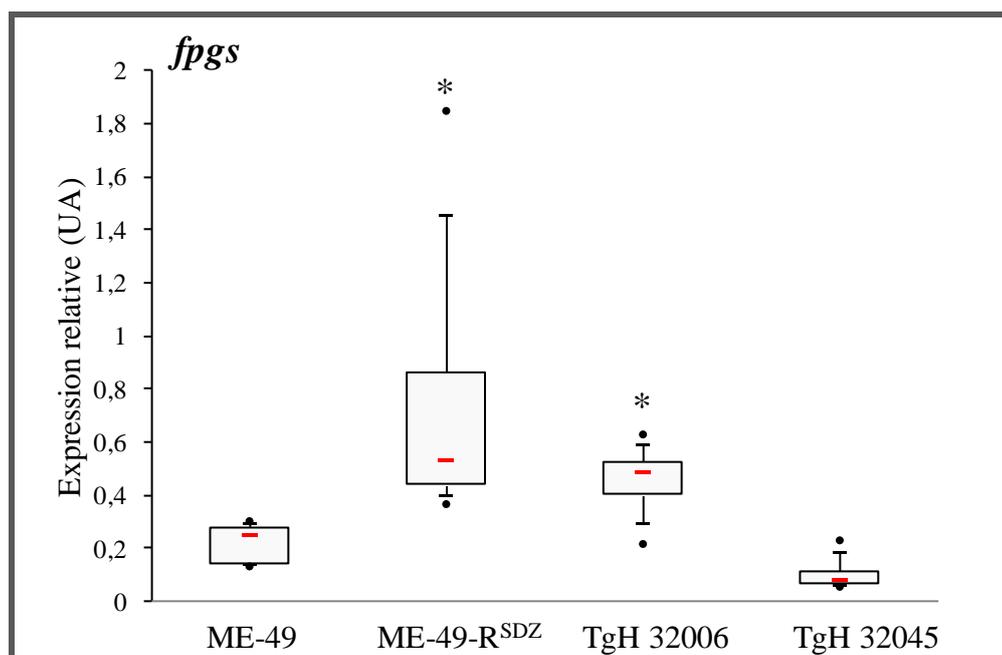


Figure 34. Expression relative du gène *fpgs* sur les souches de génotype II : ME-49 (sensible), ME-49-R^{SDZ} (résistante induite), TgH 32006 et TgH 32045 (résistantes naturelles), normalisée par rapport au gène de la β -tubuline chez *T. gondii*.

Les résultats sont issus d'au moins cinq expériences indépendantes réalisées en duplicate et présentés comme une médiane \pm interquartiles. * $p < 0,05$ (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

L'analyse de l'expression du gène *fpgs* montre une augmentation de plus de 2 fois pour la souche résistante induite ME-49-R^{SDZ} par rapport à la souche sensible ME-49, confirmant ainsi les résultats obtenus en microarrays. Le gène *fpgs* est significativement surexprimé dans la souche résistante naturelle TgH 32006 en comparaison à la souche ME-49. Le gène *fpgs* est sous exprimé dans la souche naturellement résistante TgH 32045 (**Figure 34**).

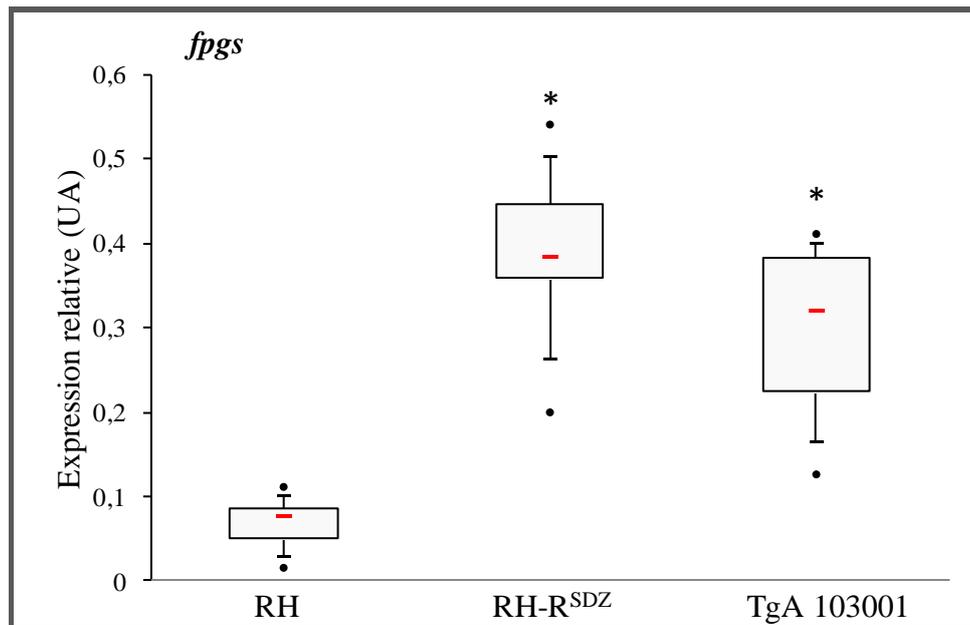


Figure 35. Expression relative du gène *fpgs* sur les souches de génotype I : RH (sensible), RH-R^{SDZ} (résistante induite) et TgA 103001 (résistante naturelle), normalisée par rapport au gène de la β -tubuline chez *T. gondii*.

Les résultats sont issus d'au moins cinq expériences indépendantes réalisées en duplicate et présentés comme une médiane \pm interquartiles. * $p < 0,05$ (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

Pour les souches de génotype I, on observe une surexpression significative du gène de *fpgs* pour les deux souches résistantes : l'expression de *fpgs* est augmentée de plus de 4 fois pour la souche résistante induite RH-R^{SDZ} et de plus de 3 fois pour la souche naturellement résistante TgA 103001 (**Figure 34**).

Ces résultats suggèrent que pour les deux souches résistantes développées *in vitro*, ME-49-R^{SDZ} et RH-R^{SDZ}, le mécanisme ayant rendu ces deux souches résistantes soit similaire et qu'il pourrait impliquer la FPGS. La surexpression du gène *fpgs*, pour les souches naturellement résistante TgH 32006 et TgA 103001, laisse penser que ces souches se comportent de la même façon que ME-49-R^{SDZ} et RH-R^{SDZ}. Cependant pour la souche naturellement résistante TgH 32045, il semblerait que le mécanisme de résistance à la sulfadiazine soit différent.

III. Discussion

Les enzymes impliquées dans la voie de synthèse des folates jouent un rôle essentiel dans la synthèse et le recyclage de l'acide folique. En effet les dérivés du folates sont d'importants cofacteurs cellulaires fournissant les atomes de carbone nécessaires aux principales voies métaboliques comme la biosynthèse de la méthionine mais également des purines et des pyrimidines essentielles à la synthèse de l'ADN. La voie de biosynthèse des folates est donc essentielle à la survie et à la réplication du parasite. Les folates sont composés d'un noyau ptérine, d'un acide para-aminobenzoïque et d'une chaîne glutamate (**Figure 36**), ils sont appelés folylpolyglutamates et sont principalement impliqués dans l'échange de molécule de carbone. En raison de leur importance dans la division cellulaire, la voie des folates s'est avérée être une bonne cible pour les traitements chez les protozoaires comme *T. gondii* et *P. falciparum* : l'inhibition d'une des principales enzymes de cette voie implique une diminution de la synthèse de l'ADN et des protéines, et ainsi la mort des parasites.

1) Généralités sur la Folylpolyglutamate synthase (FPGS)

La FPGS est une enzyme clé dans la voie de synthèse des folates en permettant leur polyglutamylation. En général, la conversion intracellulaire des folates en polyglutamates par cette enzyme est un mécanisme très important pour la rétention intracellulaire des folates. Chez les mammifères et les plantes, plusieurs enzymes dépendantes des folates montrent une affinité plus grande pour les folates polyglutamylés que pour leur équivalent monoglutamylés. Une autre fonction de la polyglutamylation est de prévenir la sortie des folates à travers la membrane cellulaire en augmentant de manière substantielle leurs charges négatives (Wang et al., 2010). Chez certains organismes tels que *E. coli*, *P. falciparum* et *T. gondii*, la FPGS est fusionnée à la DHFS (Dihydrofolate synthase) dans une protéine bifonctionnelle DHFS-FPGS: l'ajout du premier glutamate est réalisé par la DHFS (1) et les suivants sont ajoutés par le FPGS (2) (**Figure 36**). Chez *Escherichia coli* et *Mycobacterium tuberculosis*, les centres actifs des fonctions DHFS et FPGS sont colocalisés au minimum pour l'addition du premier glutamate du THF (Tétrahydrofolate) (Sheng et al., 2008). Les mammifères ne possèdent pas la DHPS et ne peuvent donc pas synthétiser *de novo* les folates. Chez les eucaryotes qui

peuvent synthétiser *de novo* les folates tels les plantes et les Fungi, les deux activités sont présentes mais sont classiquement codées par des gènes différents. Salcedo et al. ont montré pour *P. falciparum* qu'une simple protéine portait à la fois activité DHPS et FPGS montrant ainsi le premier exemple d'une enzyme bifonctionnelle de ce type chez les organismes eucaryotes (Salcedo et al., 2001). L'activité DHFS n'existant pas chez l'Homme suggère la possibilité de cibler la DHFS dans le traitement chez *Plasmodium* (Nzila et al., 2005; Wang et al., 2010) et par analogie probablement chez *T. gondii*. Il est à noter que chez *Plasmodium*, l'activité de la FPGS est en cours de caractérisation (Nzila et al., 2005; Human, 2007; Wang et al., 2010).

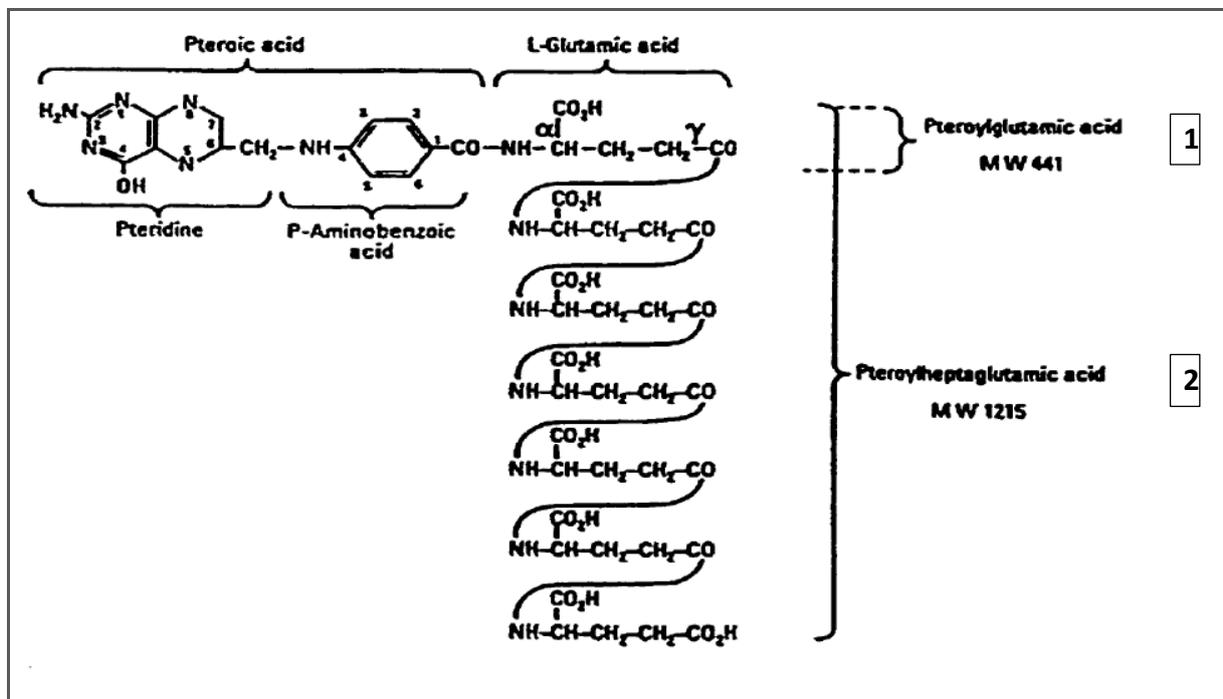


Figure 36. Structure du folylpolyglutamate

2) La FPGS chez *T. gondii*

Chez *T. gondii*, les antifolates forment la base du traitement des infections primaires et secondaires de la toxoplasmose chez l'immunodéprimé mais aussi dans le traitement de référence de la toxoplasmose congénitale. Ces médicaments sont des inhibiteurs des voies métaboliques des folates et utilisent classiquement la combinaison synergique de

sulfonamides, inhibiteurs de la dihydroptéroate synthase (DHPS) qui produit l'acide folique, et de la pyriméthamine, inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (DHFR). Ce traitement agit en inhibant la synthèse folique du parasite mais aussi celle de l'hôte d'où la nécessité d'administrer conjointement de l'acide folinique. Les folates sont essentiels à la survie de *T. gondii* car ils servent de coenzymes dans les réactions de transfert de carbone aux purines et pyrimidines pour la synthèse d'ADN, dans la biosynthèse de méthionine et de sérine, ainsi que dans l'initiation de la synthèse protéique. Les sources de folates sont organismes dépendants : s'il est connu que les plantes synthétisent généralement les folates par une synthèse *de novo*, les cellules de mammifères récupèrent les folates à partir de source exogène. *T. gondii*, comme *P. falciparum*, est capable de synthétiser les folates selon deux voies principales : la synthèse *de novo* et la voie de récupération des folates (Massimine et al., 2005), contrairement aux mammifères ou encore à *Leishmania spp* qui ne possède que la voie de récupération des folates. La FPGS de *T. gondii* est une enzyme clé à l'intersection des ces deux voies d'approvisionnement en folates du parasite. A l'aide de la base de données ToxoDB, nous avons représenté la voie de synthèse des folates chez *T. gondii* (**Figure 37**).

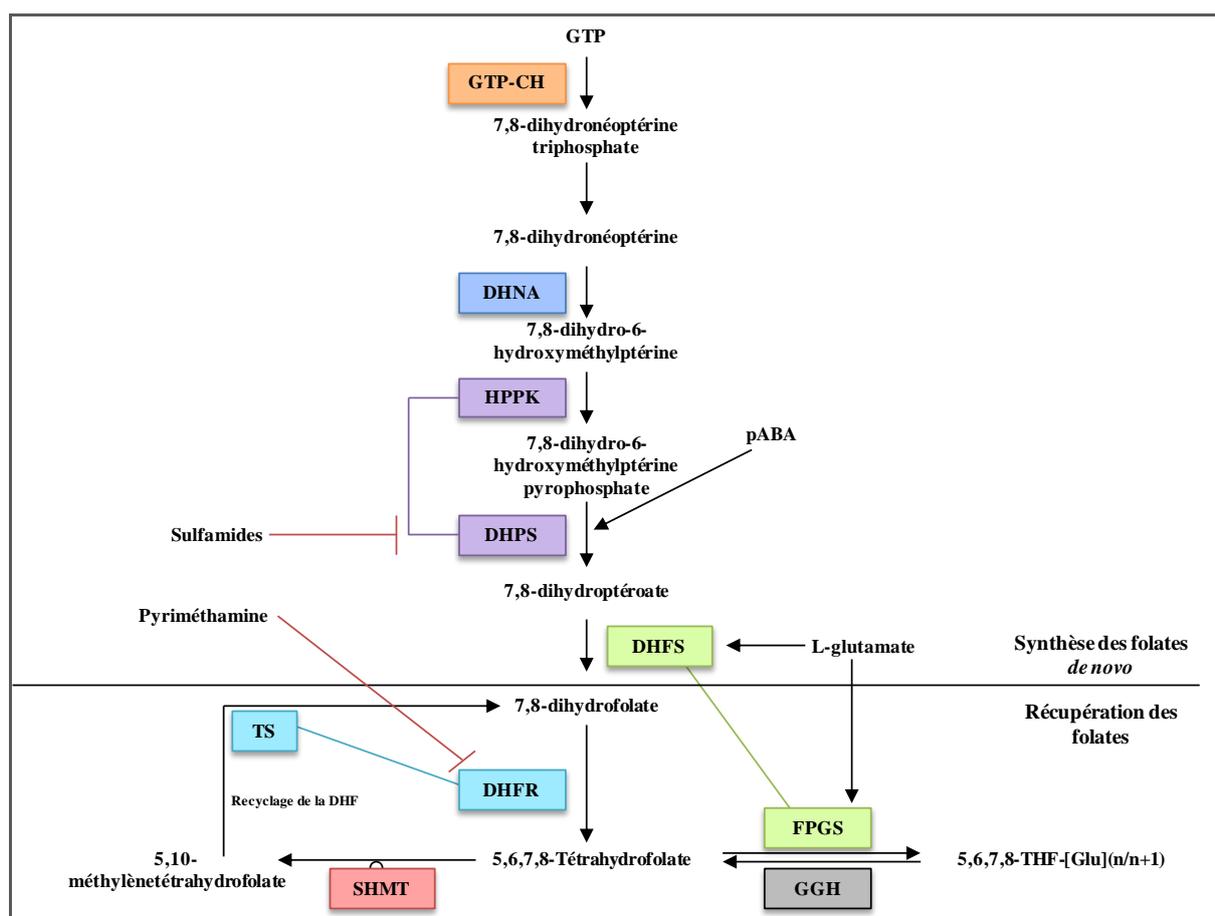


Figure 37. Métabolisme des folates chez *T. gondii*

Les enzymes représentées avec la même couleur indiquent les enzymes bifonctionnelles. GTP-CH : GTP cyclohydrolase; DHNA : dihydrooptérin aldolase; HPPK : hydroxyméthylpyrophosphokinase; DHPS : dihydroptéroate synthase; DHFS : dihydrofolate synthase; DHFR : dihydrofolate réductase; FPGS : folylpolyglutamate synthase; SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase; TS : thymidylate synthase ; GGH : Gamma glutamyl Hydrolase.

La FPGS de *T. gondii* présente de fortes homologies de séquences avec les DHFS-FPGS de *P. falciparum* (accession no. AF161264; K1 isolate) et de *E. coli* (accession no. P08192) qui sont toutes deux bifonctionnelles (**Figure 38**). En effet, les trois régions qui encadrent les résidus critiques dans le domaine N-terminal (région A [P-loop], région B [Ω -loop], et région C) présentent de fortes homologies et nous pouvons également retrouver les quatre acides aminés impliqués dans le site catalytique du côté C-terminal. Les deux régions N- et C-terminales sont liées chez *P. falciparum* et *E. coli* grâce à une région *linker* retrouvée chez *T. gondii*.

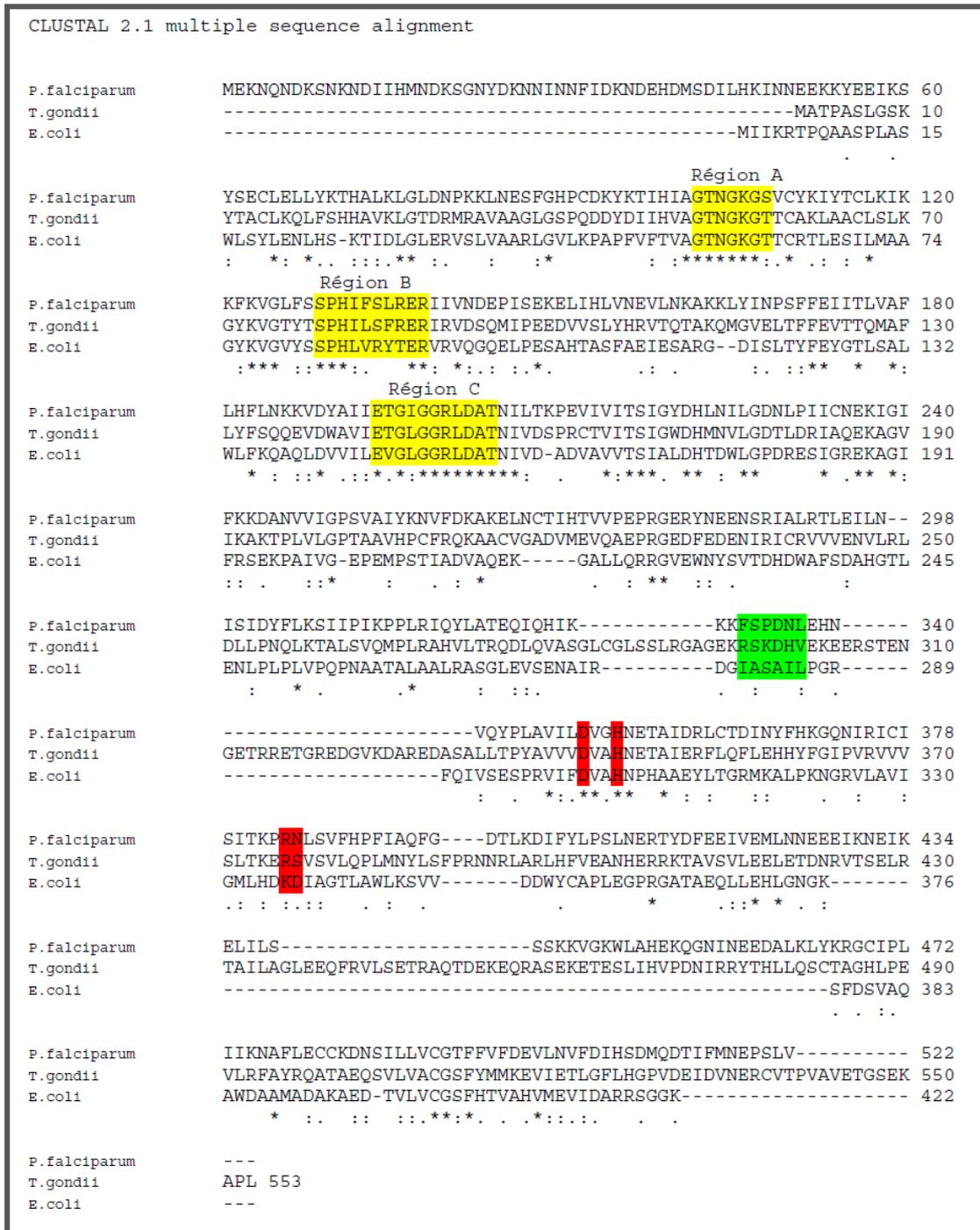


Figure 38. Alignements multiples de la protéine DHFS-FPGS de *T. gondii*.

La protéine putative DHFS-FPGS de *T. gondii* a été alignée avec DHFS-FPGS bifonctionnelle de *E. coli* (accession no. P08192), et la protéine DHFS-FPGS de *P. falciparum* (accession no. AF161264; K1 isolate). Les régions A (P-loop), B (Ω-loop) and C ont été identifiées en tant que régions qui encadrent les résidus critiques dans le domaine N-terminal (jaune), et les résidus colorés en rouge sont impliqués dans le site catalytique du côté C-terminal. Les deux domaines sont liés par un hexapeptide marqué en vert.

Il apparait, par homologie de séquence, que TgDHFS-FPGS ressemble à *P. falciparum* et *E. coli*, c'est-à-dire que les deux activités enzymatiques seraient dépendantes de la même série de résidus d'acides aminés distribués tout au long de sa séquence et donc que la protéine TgDHFS-FPGS serait également bifonctionnelle.

3) Rôle putatif de la FPGS dans la résistance

Dans les cellules de mammifères, une réduction de l'activité de la FPGS est étroitement associée à la résistance au méthotrexate (MTX) (Kim et al., 1993; Longo et al., 1997; McGuire and Russell, 1998). Par contre, chez *Leishmania*, il a été montré qu'une surexpression de la FPGS conférait une résistance au MTX (El-Fadili et al., 2003). Cette opposition pourrait s'expliquer par la différence d'activité ou d'affinité de la FPGS envers différents substrats. En effet, il est possible que contrairement aux cellules cancéreuses, la FPGS chez *Leishmania* possède une affinité très faible pour le MTX et une affinité très élevée pour les folates. La polyglutamylation des folates induit leur rétention intracellulaire et augmente leur affinité avec les enzymes métaboliques de la voie de synthèse des folates. La diminution de l'affinité entre la FPGS et le MTX induit une faible polyglutamylation du MTX facilitant ainsi son expulsion à l'extérieur du parasite et diminuant sa cytotoxicité. Par ailleurs, l'inactivation partielle de la FPGS provoque une sensibilisation du parasite au MTX (El-Fadili et al., 2003).

4) Rôle putatif de la FPGS dans la résistance chez *T. gondii*

Pour les souches résistantes obtenues expérimentalement, nous avons montré que le gène *fpgs* était fortement exprimé dans les souches résistantes ME-49-R^{SDZ} (surexpression de 14 fois en microarrays) et RH-R^{SDZ} (surexpression de 4 fois en RT-PCRq). La FPGS pourrait induire, dans les souches résistantes, une augmentation de la glutamylation des folates disponibles, comme cela a été montré chez El Fadili et al., entraînant des modifications de charges, puis leur rétention dans la cellule permettant la survie du parasite (El-Fadili et al., 2003). De plus, l'affinité des folates polyglutamylés est augmentée pour toutes les enzymes

dépendantes de la voie des folates. Dans notre étude, aucune autre enzyme de la voie de synthèse des folates n'a été retrouvée surexprimée par microarrays, ce qui corrobore nos résultats sur le niveau d'expression des gènes *dhps* et *dhfr* obtenus par RT-PCRq. La quantité de dérivés polyglutamates des folates (et des antifolates) dépend de la balance entre la FPGS et la Gamma Glutamyl Hydrolase (GGH) une peptidase qui clive les résidus glutamates des folylpolyglutamates. Une augmentation de l'activité de la GGH a été rapportée dans les cellules de mammifères résistantes au méthotrexate (Waltham et al., 1997). Cette enzyme est également présente chez *T. gondii* (**Figure 37**) mais dans notre analyse par microarrays, la GGH n'a pas montré de surexpression dans la souche résistante ME-49-R^{SDZ}. Ceci implique donc que les polyglutamates formés par la FPGS ne sont pas clivés, et restent donc disponibles pour le parasite.

Chez *Leishmania*, il a été montré qu'une surexpression de BT1, transporteur de la biopptérine qui est le précurseur des folates, confère la résistance au MTX. Les protéines similaires au BT1 avaient été trouvées exclusivement chez les trypanosomatidae (Ouellette et al., 2002) jusqu'à leur mise en évidence chez *T. gondii* et *P.falciparum* (Massimine et al., 2005). Aucune des protéines de la famille BT1 n'a montré de surexpression dans notre étude.

Une surexpression du gène *fpgs* a également été retrouvée pour les souches naturellement résistantes TgA 103001 (Type I) et TgH 32006 (Type II). De façon intéressante, il est à noter que la souche TgH 32006, isolée à partir d'un placenta, avait donné lieu à un traitement *in utero* par pyriméthamine/sulfadoxine secondairement à un diagnostic anténatal positif pendant 12 semaines. La souche TgA 103001 a été isolée à partir d'un avorton de bovin pour lequel nous n'avons aucune connaissance quant à l'éventualité d'une administration de sulfamides. Cependant, même si les sulfamides ne sont pas administrés dans les cas de toxoplasmoses animales, ils peuvent être administrés, en médecine vétérinaire, dans le traitement des infections respiratoires, digestives et urinaires dues à des germes sensibles à la sulfadiazine (<http://www.ircp.anmv.anses.fr>).

Dans la littérature, la première souche toxoplasmique induite expérimentalement était résistante au sulfométhoxazole. Cette souche a été développée sur des souris ayant reçu pendant une longue période (290 jours) dans leur alimentation 0,5 mg de sulphaméthoxazole par jour (Sander et Midtvedt, 1971). De la même façon, les souches résistantes *in vitro* dans

cette étude, RH-R^{SDZ} et ME-49-R^{SDZ}, ont été obtenues au laboratoire par pression médicamenteuse croissante et élevée de sulfadiazine pendant 8 mois. Ces résultats montrent qu'en présence d'un traitement prolongé de sulfadiazine, il est possible d'obtenir des mutants résistants *in vitro* et *in vivo*.

Au vu de ces résultats nous pouvons nous demander si l'un des mécanismes de résistance à la sulfadiazine ne serait pas dû, aussi bien pour les souches expérimentales que pour la souche TgH 32006, à une exposition prolongée aux sulfamides. Cette hypothèse pourrait être explorée par l'étude de souches cliniques présentes au CRB *Toxoplasma* ayant reçu un traitement par pyriméthamine-sulfadoxine pendant une période prolongée. Cependant, les résultats obtenus dans la Partie I montraient l'existence d'une mutation en position 587 sur le gène de la DHPS pour la souche TgH 32006 mais également une surexpression de *TgABC.C1*. Des études complémentaires seraient nécessaires afin de déterminer leur implication dans les mécanismes de résistance à la sulfadiazine.

Dans le cas de la souche TgH 32045, qui ne présente pas de surexpression du gène *fpgs*, et qui n'a pas donné lieu à un traitement par pyriméthamine-sulfadoxine durant la grossesse, il semblerait que le mécanisme de résistance soit différent et n'impliquerait pas la FPGS. Cependant il est important de noter que la souche TgH 32045 est une souche de type II variant entraînant la mort de la souris après inoculation. De plus, cette souche possède au sein de son génome de nombreuses délétions et recombinaison qui la rendent particulièrement difficile à étudier.

Dans notre étude, les souches mutantes ont été traitées avec de la sulfadiazine pendant 8 mois, or il est possible que les deux souches mutantes, traitées avec des concentrations de sulfadiazine allant jusqu'à 800 µg/mL de sulfadiazine, aient présentées une résistance médicamenteuse bien avant cette dose maximale. La détermination de la CI₅₀ des deux souches mutantes pour chacun des paliers (50, 100, 200 et 400 µg/mL) serait à déterminer afin d'étudier l'expression de la *FPGS* sur différents temps d'exposition aux sulfamides.

Summary of Part V. Comparative transcriptomic analysis of ME-49 and ME-49-R^{SDZ} strains

I. Results

To highlight the involvement of genes in drug resistance in *T. gondii*, we analyzed the transcriptomes of strains ME-49 and ME-49-R^{SDZ} by microarray using the specific chip developed in *T. gondii* (Tgondii520372, AffymetrixTM) (**Figure 33**). Microarray technology is an expensive technique which requires the use of multiple chips to be reproducible, we only studied two strains of *T. gondii* ME-49 and ME-49-R^{SDZ}.

The analysis of mRNA expression of these two strains has highlighted, among 8993 genes in the chip, 165 genes with a variation of their expression levels less than 0.5 fold or greater than 2 fold. Among these 165 genes, 45 corresponded to hypothetical proteins and 91 corresponded to human proteins. Tachyzoites being grown on Vero cells (kidney cells from African Green Monkey), it is conceivable that RNA cellular debris has been extracted along the RNA tachyzoites, and are therefore included in this analysis.

This study allowed identifying 29 genes differentially expressed between the sensitive strain ME-49 and the resistant strain ME-49-R^{SDZ}. We observed in ME-49-R^{SDZ}, an increase of expression of 23 genes and a decrease of expression of 6 genes compared to the ME-49 strain (**Table XV**).

We observed an overexpression of 28 times of DNA primase in the resistant strain ME-49-R^{SDZ} (green in **Table XV**). The DNA primase is a protein involved in the mechanisms of DNA replication. Its overexpression suggests that protein synthesis is accelerated resistant strain ME-49-R^{SDZ}.

Subtilase family of serine protease SUB1 is overexpressed 6 times in strain ME-49-R^{SDZ} (green in **Table XV**). TgSUB1 is a subtilisin-like serine protease localized to the cell surface after secretion of micronemes (Binder et al., 2008). The subtilisins could play a critical role in parasite survival as inhibitors of serine proteases prevent the invasion in *T. gondii* (Council et al., 1999), block intracellular development (Shaw et al., 2002) and exit from the host cell (Yeoh et al., 2007).

The gene encoding the Zinc finger was found 3 times overexpressed in the resistant strain ME-49-R^{SDZ} (green in **Table XV**). Zinc finger are the proteins that bind to DNA and control the transfer of genetic information in RNA.

We can also observe a 3-fold overexpression of RNA polymerase Rpb1 in the resistant strain ME-49-R^{SDZ} (green in **Table XV**). The RNA polymerases catalyze the polymerization of RNA from a DNA template during transcription. Prokaryotes contain a single RNA polymerase whereas eukaryotes possess three (not counting the RNA polymerases of mitochondria or chloroplasts).

Finally, the presence of folylpolyglutamate synthase (FPGS) overexpressed more than 14-fold in the resistant strain ME-49-R^{SDZ} seems very interesting (in pink in **Table XV**) because of its role in the folate synthesis pathway.

We therefore verified these results by studying the levels of *fpgs* gene expression by qRT-PCR on ME-49 and ME-49-R^{SDZ} but also on the strains RH (sensitive, Type I) and RH-R^{SDZ} (resistant induced type I) and the three strains naturally resistant TgA 103001, TgH 32006 and TgH 32045.

Fpgs gene expression shows an increase of more than 2 times for the resistant strain ME-49-R^{SDZ} compared to the sensitive strain ME-49, thus confirming the results obtained by microarrays. *Fpgs* gene is significantly overexpressed in the naturally resistant strain TgH 32006. *Fpgs* gene is underexpressed in the naturally resistant strain TgH 32045 (**Figure 34**).

For Type I strains, we observed a significant overexpression of *fpgs* for the two resistant strains: *fpgs* is increased more than 4 times for the induced resistant strain RH-R^{SDZ} and more than 3 times for the naturally resistant strain TgA 103001 (**Figure 34**).

These results suggest that the two resistant strains developed *in vitro* ME-49-R^{SDZ} and RH-R^{SDZ}, the mechanism that made these strains resistant seems similar and may involve FPGS. *Fpgs* overexpression, in strains naturally resistant TgH 32006 and TgA 103001, suggest that these strains behave the same compartment as ME-49-R^{SDZ} and RH-R^{SDZ}. However, for the naturally resistant strain TgH 32045, it appears that the mechanism of resistance to sulfadiazine is different.

II. Discussion

1) General information about folylpolyglutamate synthase (FPGS)

The FPGS is a key enzyme in the folate synthesis pathway for their polyglutamylation. In general, the intracellular conversion of folate in polyglutamates by the enzyme is a very important mechanism for intracellular retention of folates. Another function of polyglutamylation is to prevent the exit of folate across the cell membrane by increasing significantly their negative charges (Wang et al., 2010). In some organisms such as *E. coli*, *P. falciparum* and *T. gondii*, the FPGS is fused to the DHFS (Dihydrofolate synthase) in a DHFS-FPGS bifunctional protein: the first glutamate is added by DHFS (1) and the others are added by FPGS (2) (**Figure 36**). Mammals do not have the DHPS and therefore can't synthesize folates *de novo*. Eukaryotes that can synthesize *de novo* folate such as plants and Fungi, both activities are present but are typically encoded by different genes. Salcedo et al. showed for *P. falciparum* a single protein related to both DHPS and FPGS activity showing the first example of a bifunctional enzyme of this type in eukaryotic organisms (Salcedo et al., 2001). DHFS activity does not exist in humans suggests the possibility of targeting the DHFS in the treatment of *Plasmodium* (Nzila et al., 2005, Wang et al., 2010) and by analogy probably in *T. gondii*. It should be noted that in *Plasmodium*, FPGS activity is being characterized (Nzila et al., 2005; Human, 2007, Wang et al., 2010).

2) FPGS in *T. gondii*

Folates are essential to the survival of *T. gondii* because they serve as coenzymes in the reactions to transfer carbon to the purine and pyrimidine synthesis of DNA, in the biosynthesis of methionine and serine, and in the initiation of protein synthesis. Sources of folate are dependent organisms: it is known that plants synthesize folates generally by *de novo* synthesis in mammalian cells recover folate from exogenous source. *T. gondii*, like *P. falciparum* can synthesize folates by two main pathways: i) *de novo* synthesis and ii) the pathway of folates salvage (Massimine et al., 2005), unlike mammals or *Leishmania spp* which has only the salvage pathway folates. The FPGS in *T. gondii* is a key enzyme at the

intersection of these two lines of supply of folate parasite. Using the database ToxoDB, we have shown the synthesis pathway of folate in *T. gondii* (**Figure 37**).

The FPGS in *T. gondii* has strong homology with the sequences of DHFS-FPGS of *P. falciparum* (accession no. AF161264; isolate K1) and *E. coli* (accession no. P08192) which are both bifunctional (**Figure 38**). Indeed, the three regions that surround the critical residues in the N-terminal domain (region A [P-loop], region B [Ω -loop], and region C) show strong homologies and we can also find four amino acids involved in the catalytic site of the C-terminal side. The two regions N-and C-terminal are linked in *P. falciparum* and *E. coli* through a linker region found in *T. gondii*. It appears, by sequence homology, that TgDHFS-FPGS seems to be like *P. falciparum* and *E. coli*, that is to say that the two enzymatic activities are dependent the same set of amino acid residues distributed throughout its sequence and therefore the protein TgDHFS-FPGS would also bifunctional.

3) Putative role of FPGS in resistance

In mammalian cells, a reduction in the activity of FPGS is closely associated with resistance to methotrexate (MTX) (Kim et al., 1993, Longo et al., 1997; McGuire and Russell, 1998). In *Leishmania*, it has been shown that FPGS overexpression confers resistance to methotrexate (El-Fadili et al., 2003). This opposition could be explained by the difference in activity or affinity of FPGS to various substrates. Indeed, it is possible that, unlike cancer cells, *Leishmania*'s FPGS has a very low affinity for MTX and a very high affinity for folates. Polyglutamylation of folates induces their intracellular retention and increases their affinity with the metabolic enzymes of the folates synthesis pathway. The decrease in the affinity of FPGS and MTX induced a weak polyglutamylation of MTX facilitating its expulsion outside the parasite and reducing its cytotoxicity. Moreover, the partial inactivation of the FPGS parasite causes sensitization to MTX (El-Fadili et al., 2003).

3) Putative role of FPGS in resistance in *T. gondii*

We have shown that FPGS gene was highly expressed in resistant strains ME-49-R^{SDZ} (14-fold overexpression by microarrays) and RH-R^{SDZ} (4-fold overexpression by qRT-PCR). The FPGS could induce in resistant strains, a glutamylation increase of folates available, as

has been shown by El Fadili et al., causing changes in charges, and their retention in the cell for parasite survival (El -Fadili et al., 2003). In our study, no other enzyme of the folates synthesis pathway was found overexpressed by microarray, which corroborates our findings on the level of expression of the genes *dhfr* and *dhps* obtained by qRT-PCR.

Fpgs gene overexpression was also found for naturally resistant strains TgA 103001 (Type I) and TgH 32006 (Type II). Interestingly, the strain TgH 32006 was isolated from a placenta, after treatment *in utero* by pyrimethamine/sulfadoxine for 12 weeks secondarily a positive prenatal diagnosis. TgA 103001 strain was isolated from a bovine abortion for which we have no knowledge about the possibility of an administration of sulfonamides. However, even if sulfonamides are not administered in cases of toxoplasmosis animal, they can be administered in veterinary medicine in the treatment of respiratory, digestive and urinary tract caused by bacteria susceptible to sulfadiazine.

For TgH 32045, which has not resulted in a pyrimethamine-sulfadoxine treatment during pregnancy, no overexpression of *fpgs* was observed; it seems that the resistance mechanisms is different and not implies the FPGS. However, it is important to note that the strain TgH 32045 is a strain of type II variant killing mice after inoculation. In addition, this strain has within its genome many deletions and recombination that make it particularly difficult to study.

In our study, mutant strains were treated with sulfadiazine for 8 months, or it is possible that the two mutant strains treated with sulfadiazine concentrations up to 800 µg/mL, have shown drug resistance before the maximum dose. The IC₅₀ of the two mutant strains for each level (50, 100, 200 and 400 µg/mL) could be determined in order to study the expression of FPGS on different exposure times to sulfonamides.

Conclusion et Perspectives

Les traitements actifs sur *T. gondii* sont peu nombreux et reposent principalement sur l'association d'un sulfamide et de pyriméthamine agissant en synergie pour bloquer la voie de synthèse des folates du parasite par inhibition de deux enzymes parasitaires : la dihydroptéroate synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR). Ces deux enzymes sont essentielles à la survie du parasite et à sa réplication. La mise en évidence de résistance à la sulfadiazine chez trois souches toxoplasmiques nous a conduits à explorer les mécanismes responsables.

Dans la première partie de notre travail, nous avons démontré que les gènes cibles, *dhps* et *dhfr*, ainsi que les gènes codant pour les ABC transporteurs, *TgABC.B1*, *TgABC.B2* et *TgABC.C2* n'étaient pas surexprimés dans les souches naturellement résistantes à la sulfadiazine. Ces gènes ne semblent pas impliqués dans la résistance médicamenteuse à la sulfadiazine. Nous avons mis en évidence la surexpression du gène *TgABC.C1* dans la souche résistante de type II TgH 32006 ainsi que la présence d'un polymorphisme pour cette souche sur le gène *dhfr*. Des analyses complémentaires seront nécessaires afin de vérifier leurs implications dans la résistance médicamenteuse chez *T. gondii*.

Nous avons ensuite réalisé une comparaison de protéomes des souches sensibles (RH et ME-49) et des trois souches résistantes naturelles (TgA 103001, TgH 32006 et TgH 32045) de *T. gondii* par DIGE. Nous avons identifié 31 protéines exprimées différemment entre les souches de même génotype dont 44 % plus exprimées dans les souches résistantes. Parmi ces 31 protéines, 4 protéines communes à deux expériences de DIGE nous ont semblé intéressantes : ROP2, MIC2, ENO2 et IMC1. Leurs niveaux d'expression ont été analysés par qRT-PCR dans le but de confirmer les résultats obtenus en protéomique. Cependant, ces résultats ne nous ont pas permis de conclure quant à l'implication d'une ou plusieurs de ces protéines dans les mécanismes de résistance à la SDZ chez *T. gondii*.

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons développé deux souches résistantes à la sulfadiazine *in vitro*, RH-R^{SDZ} et ME-49-R^{SDZ}, par pression croissante de sulfadiazine afin d'obtenir des modèles d'étude permettant de comprendre les mécanismes de résistance à la SDZ chez *T. gondii*. Dans la quatrième partie de notre travail, nous avons

comparé par 2-DE les protéomes des souches de génotype II : la souche sensible ME-49, la souche résistante induite ME-49-R^{SDZ} et la souche résistante naturelle TgH 32006. Cependant ce travail ne nous a pas permis de répondre à notre problématique. En effet, les protéines identifiées étaient impliquées dans de nombreux mécanismes biologiques mais aucune ne nous a permis de faire le lien avec la résistance médicamenteuse décrite dans la littérature. De plus, un problème majeur rencontré au cours de cette étude a été la contamination des spots protéiques par la kératine empêchant l'identification de plus de 2/3 des spots protéiques présentant des modulations d'expression protéiques.

Dans la cinquième partie, la souche sensible ME-49 a été comparée à la souche résistante induite ME-49-R^{SDZ} par une approche transcriptomique. L'étude des modulations d'expression génique entre ces deux souches a permis de mettre en évidence 29 gènes exprimés différemment dont le gène codant pour la FPGS, enzyme impliquée dans la voie de synthèse des folates. L'étude par qRT-PCR de l'expression de ce gène dans toutes les souches étudiées laisse à penser que la surexpression de *fpgs* pourrait être responsable de la résistance à la sulfadiazine dans les souches expérimentalement résistantes, mais aussi dans au moins une souche naturellement résistante, TgA 103001. Nos résultats ont également montré qu'en présence de probénécide, la résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii* pouvait être reversée.

Afin de confirmer, l'implication de la FPGS dans la résistance médicamenteuse chez *T. gondii*, il serait nécessaire, dans un premier temps, de confirmer, par l'analyse d'échantillonnages plus grands, les résultats de qRT-PCR. De plus l'analyse d'un plus grand nombre de souches cliniques, ayant ou non reçu un traitement par sulfamide, permettrait de confirmer ces résultats.

Par la suite il serait intéressant d'étudier l'activité protéique de la FPGS dans toutes les souches étudiées par Western Blot d'une part, puis par l'utilisation d'inhibiteur de cette enzyme. La surexpression de la FPGS dans les souches sensibles à la sulfadiazine serait également un moyen de confirmer notre hypothèse.

Il serait également intéressant de caractériser l'activité enzymatique de la FPGS (ses propriétés cinétiques, ses spécificités de substrats par utilisation de substrats radiomarqués, et sa sensibilité aux drogues antifolates).

Ces études permettraient de compléter les travaux déjà réalisés dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii*.

Bibliographie

- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207.
- Afssa, 2005. Toxoplasmose: état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapport du groupe de travail "*Toxoplasma gondii*" de l'Afssa.
- Ahn, H.-J., Kim, S., Nam, H.-W., 2005. Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 614–620.
- Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carne, B., Dardé, M.L., 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34, 1185–1196.
- Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Tibayrenc, M., Dardé, M.L., 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 32, 27–38.
- Ajzenberg, D., Dumètre, A., Dardé, M.-L., 2005. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1940–1943.
- Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., Boothroyd, J.C., 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* 1, e17.
- Andrade, H.M., Murta, S.M.F., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirdé, P., Romanha, A.J., 2008. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J. Proteome Res.* 7, 2357–2367.
- Appleford, P.J., Smith, J.E., 1997. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. *Acta Trop.* 65, 97–104.
- Asai, T., Takeuchi, T., Diffenderfer, J., Sibley, L.D., 2002. Identification of Small-Molecule Inhibitors of Nucleoside Triphosphate Hydrolase in *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2393–2399.

- Aspinall, T.V., Joynson, D.H.M., Guy, E., Hyde, J.E., Sims, P.F.G., 2002. The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 185, 1637–1643.
- Babiker, H.A., Pringle, S.J., Abdel-Muhsin, A., Mackinnon, M., Hunt, P., Walliker, D., 2001. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcr1* and the multidrug resistance Gene *pfmdr1*. *J. Infect. Dis.* 183, 1535–1538.
- Bahl, A., Davis, P.H., Behnke, M., Dzierszynski, F., Jagalur, M., Chen, F., Shanmugam, D., White, M.W., Kulp, D., Roos, D.S., 2010. A novel multifunctional oligonucleotide microarray for *Toxoplasma gondii*. *BMC Genomics* 11, 603.
- Bailey, J.E., 2001. Reflections on the scope and the future of metabolic engineering and its connections to functional genomics and drug discovery. *Metab. Eng.* 3, 111–114.
- Barker, K.S., Crisp, S., Wiederhold, N., Lewis, R.E., Bareither, B., Eckstein, J., Barbuch, R., Bard, M., Rogers, P.D., 2004. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 376–385.
- Barnes, D.A., Foote, S.J., Galatis, D., Kemp, D.J., Cowman, A.F., 1992. Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the *pfmdr1* gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* 11, 3067–3075.
- Barragan, A., Sibley, L.D., 2002. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J. Exp. Med.* 195, 1625–1633.
- Beaumont, V., 2004. Mise en évidence des polymorphismes des gènes *dhfr*, *dhps* et *cyt b* chez *Toxoplasma gondii*. Rapport de DEA.
- Beckers, C.J., Dubremetz, J.F., Mercereau-Puijalon, O., Joiner, K.A., 1994. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* 127, 947–961.

- Beckers, C.J., Roos, D.S., Donald, R.G., Luft, B.J., Schwab, J.C., Cao, Y., Joiner, K.A., 1995. Inhibition of cytoplasmic and organellar protein synthesis in *Toxoplasma gondii*. Implications for the target of macrolide antibiotics. *J. Clin. Invest.* 95, 367–376.
- Berens, R.L., Krug, E.C., Nash, P.B., Curiel, T.J., 1998. Selection and characterization of *Toxoplasma gondii* mutants resistant to artemisinin. *J. Infect. Dis.* 177, 1128–1131.
- Berger, F., Goulet, V., Le Strat, Y., Desenclos, J.-C., 2009. Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. *Rev Epidemiol Sante Publique* 57, 241–248.
- Bhopale, G.M., 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 213–222.
- Binder, E.M., Lagal, V., Kim, K., 2008. The prodomain of *Toxoplasma gondii* GPI-anchored subtilase TgSUB1 mediates its targeting to micronemes. *Traffic* 9, 1485–1496.
- Biyani, N., Singh, A.K., Mandal, S., Chawla, B., Madhubala, R., 2011. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 179, 91–99.
- Blais, J., Tardif, C., Chamberland, S., 1993. Effect of clindamycin on intracellular replication, protein synthesis, and infectivity of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2571–2577.
- Bonhomme, A., Maine, G.T., Beorchia, A., Burlet, H., Aubert, D., Villena, I., Hunt, J., Chovan, L., Howard, L., Brojanac, S., Sheu, M., Tyner, J., Pluot, M., Pinon, J.M., 1998. Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 1411–1422.
- Boothroyd, J.C., Dubremetz, J.-F., 2008. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 79–88.
- Boyse, E.A., Old, L.J., Chouroulinkov, I., 1964. Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Methods Med Res* 10, 39–47.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bradley, P.J., Ward, C., Cheng, S.J., Alexander, D.L., Coller, S., Coombs, G.H., Dunn, J.D., Ferguson, D.J., Sanderson, S.J., Wastling, J.M., Boothroyd, J.C., 2005. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 280, 34245–34258.
- Braun, L., Cannella, D., Pinheiro, A.M., Kieffer, S., Belrhali, H., Garin, J., Hakimi, M.-A., 2009. The small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating system of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39, 81–90.
- Brecht, S., Carruthers, V.B., Ferguson, D.J., Giddings, O.K., Wang, G., Jakle, U., Harper, J.M., Sibley, L.D., Soldati, D., 2001. The *Toxoplasma* micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J. Biol. Chem.* 276, 4119–4127.
- Briolant, S., Almeras, L., Belghazi, M., Boucomont-Chapeaublanc, E., Wurtz, N., Fontaine, A., Granjeaud, S., Fusai, T., Rogier, C., Pradines, B., 2010. *Plasmodium falciparum* proteome changes in response to doxycycline treatment. *Malar. J.* 9, 141.
- Brun, R., Schumacher, R., Schmid, C., Kunz, C., Burri, C., 2001. The phenomenon of treatment failures in Human African Trypanosomiasis. *Trop. Med. Int. Health* 6, 906–914.
- Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P., Boothroyd, J.C., 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1787–1792.
- Butcher, B.A., Fox, B.A., Rommereim, L.M., Kim, S.G., Maurer, K.J., Yarovinsky, F., Herbert, D.R., Bzik, D.J., Denkers, E.Y., 2011. *Toxoplasma gondii* Rhoptry Kinase ROP16 Activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. *PLoS Pathog* 7.
- Camps, M., Arrizabalaga, G., Boothroyd, J., 2002. An rRNA mutation identifies the apicoplast as the target for clindamycin in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 43, 1309–1318.

- Canada, N., Meireles, C.S., Rocha, A., da Costa, J.M.C., Erickson, M.W., Dubey, J.P., 2002. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted bovine fetuses. *J. Parasitol.* 88, 1247–1248.
- Carey, K.L., Jongco, A.M., Kim, K., Ward, G.E., 2004. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. *Eukaryotic Cell* 3, 1320–1330.
- Carne, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Demar, M., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, A.M., Peneau, C., Neron, P., Dardé, M.L., 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4037–4044.
- Carruthers, V.B., 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 81, 111–122.
- Carruthers, V.B., Sibley, L.D., 1997. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 114–123.
- Carruthers, V.B., Sibley, L.D., 1999. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 31, 421–428.
- Castanys-Muñoz, E., Alder-Baerens, N., Pomorski, T., Gamarro, F., Castanys, S., 2007. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol. Microbiol.* 64, 1141–1153.
- Castanys-Muñoz, E., Pérez-Victoria, J.M., Gamarro, F., Castanys, S., 2008. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3573–3579.
- Cazenave, J., Forestier, F., Bessieres, M.H., Broussin, B., Begueret, J., 1992. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat. Diagn.* 12, 119–127.
- Cérède, O., Dubremetz, J.F., Soète, M., Deslée, D., Vial, H., Bout, D., Lebrun, M., 2005. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J. Exp. Med.* 201, 453–463.

- Cesbron-Delauw, M.F., 1994. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 10, 293–296.
- Cha, D.Y., Song, I.K., Lee, G.S., Hwang, O.S., Noh, H.J., Yeo, S.D., Shin, D.W., Lee, Y.H., 2001. Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo*. *Korean J. Parasitol.* 39, 233–240.
- Chawla, B., Jhingran, A., Panigrahi, A., Stuart, K.D., Madhubala, R., 2011. Paromomycin Affects Translation and Vesicle-Mediated Trafficking as Revealed by Proteomics of Paromomycin – Susceptible –Resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One* 6.
- Cohen, A.M., Rumpel, K., Coombs, G.H., Wastling, J.M., 2002. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 32, 39–51.
- Conseil, V., Soète, M., Dubremetz, J.F., 1999. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1358–1361.
- Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C., Joiner, K.A., 2006. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125, 261–274.
- Corvi, M.M., Berthiaume, L.G., De Napoli, M.G., 2011. Protein palmitoylation in protozoan parasites. *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 1067–1079.
- Cowman, A.F., Galatis, D., Thompson, J.K., 1994. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1143–1147.
- Cowman, A.F., Morry, M.J., Biggs, B.A., Cross, G.A., Foote, S.J., 1988. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 9109–9113.
- Cox, J., Mann, M., 2007. Is proteomics the new genomics? *Cell* 130, 395–398.

- Cui, L., Wang, Z., Miao, J., Miao, M., Chandra, R., Jiang, H., Su, X.-Z., Cui, L., 2012. Mechanisms of *in vitro* resistance to dihydroartemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* 86, 111–128.
- Dardé, M.L., 1996. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219, 27–41.
- Dardé, M.L., 2008. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite* 15, 366–371.
- Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M., 1988. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 551–558.
- Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M., 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78, 786–794.
- Derouin, F., 2001. Anti-toxoplasmosis drugs. *Curr Opin Investig Drugs* 2, 1368–1374.
- Desmonts, G., Couvreur, J., 1974. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med.* 290, 1110–1116.
- Desmonts, G., Couvreur, J., Alison, F., Baudelot, J., Gerbeaux, J., Lelong, M., 1965. [Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection]. *Rev Fr Etud Clin Biol* 10, 952–958.
- Douthwaite, S., 1992. Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 20, 4717–4720.
- Drummelsmith, J., Brochu, V., Girard, I., Messier, N., Ouellette, M., 2003. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol. Cell Proteomics* 2, 146–155.
- Drummelsmith, J., Girard, I., Trudel, N., Ouellette, M., 2004. Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J. Biol. Chem.* 279, 33273–33280.
- Dubey, J.P., 1995. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J. Parasitol.* 81, 410–415.

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 267–299.
- Duraisingh, M.T., Jones, P., Sambou, I., von Seidlein, L., Pinder, M., Warhurst, D.C., 2000. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108, 13–23.
- Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M.F., Tomavo, S., 2000. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Mol. Microbiol.* 37, 574–582.
- El Fadili, A., Kündig, C., Roy, G., Ouellette, M., 2004. Inactivation of the *Leishmania tarentolae* pterin transporter (BT1) and reductase (PTR1) genes leads to viable parasites with changes in folate metabolism and hypersensitivity to the antifolate methotrexate. *J. Biol. Chem.* 279, 18575–18582.
- El Fadili, K., Messier, N., Leprohon, P., Roy, G., Guimond, C., Trudel, N., Saravia, N.G., Papadopoulou, B., Légaré, D., Ouellette, M., 2005. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1988–1993.
- El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galéotti, N., Fourmaux, M.N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G., Dubremetz, J.F., 2006. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics* 6, 5773–5784.
- El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S.T., Vial, H., Labesse, G., Dubremetz, J.F., 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 3, e14.

- El-Fadili, A., Richard, D., Kündig, C., Ouellette, M., 2003. Effect of polyglutamylation of methotrexate on its accumulation and the development of resistance in the protozoan parasite *Leishmania*. *Biochem. Pharmacol.* 66, 999–1008.
- Ellis, J.E., 1994. Coenzyme Q homologs in parasitic protozoa as targets for chemotherapeutic attack. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 10, 296–301.
- Fauquenoy, S., Hovasse, A., Sloves, P.-J., Morelle, W., Alayi, T.D., Slomianny, C., Werkmeister, E., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., Tomavo, S., 2011. Unusual N-glycan Structures Required for Trafficking *Toxoplasma gondii* GAP50 to the Inner Membrane Complex Regulate Host Cell Entry Through Parasite Motility. *Mol Cell Proteomics* 10.
- Fauquenoy, S., Morelle, W., Hovasse, A., Bednarczyk, A., Slomianny, C., Schaeffer, C., Dorsselaer, A.V., Tomavo, S., 2008. Proteomics and Glycomics Analyses of N-Glycosylated Structures Involved in *Toxoplasma gondii*-Host Cell Interactions. *Mol Cell Proteomics* 7, 891–910.
- Ferguson, D.J., Hutchison, W.M., 1981. Comparison of the development of avirulent and virulent strains of *Toxoplasma gondii* in the peritoneal exudate of mice. *Ann Trop Med Parasitol* 75, 539–546.
- Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.B., Naudé, B., Deitsch, K.W., Su, X.Z., Wootton, J.C., Roepe, P.D., Wellems, T.E., 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell* 6, 861–871.
- Foote, S.J., Kyle, D.E., Martin, R.K., Oduola, A.M., Forsyth, K., Kemp, D.J., Cowman, A.F., 1990. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 345, 255–258.
- Foote, S.J., Thompson, J.K., Cowman, A.F., Kemp, D.J., 1989. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* 57, 921–930.
- Foucher, A.L., McIntosh, A., Douce, G., Wastling, J., Tait, A., Turner, C.M.R., 2006. A proteomic analysis of arsenical drug resistance in *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* 6, 2726–2732.

- Foulon, W., Villena, I., Stray-Pedersen, B., Decoster, A., Lappalainen, M., Pinon, J.M., Jenum, P.A., Hedman, K., Naessens, A., 1999. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 410–415.
- Foussard, F., Leriche, M.A., Dubremetz, J.F., 1991. Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology* 102 Pt 3, 367–370.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P., Miller, N.L., 1969. *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. *Science* 164, 432–433.
- Frenkel, J.K., Dubey, J.P., Miller, N.L., 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167, 893–896.
- Garcia-Réguet, N., Lebrun, M., Fourmaux, M.N., Mercereau-Puijalon, O., Mann, T., Beckers, C.J., Samyn, B., Van Beeumen, J., Bout, D., Dubremetz, J.F., 2000. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell. Microbiol.* 2, 353–364.
- Gilbert, L.A., Ravindran, S., Turetzky, J.M., Boothroyd, J.C., Bradley, P.J., 2007. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryotic Cell* 6, 73–83.
- Gilbert, R.E., Gras, L., Wallon, M., Peyron, F., Ades, A.E., Dunn, D.T., 2001. Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France. *Int J Epidemiol* 30, 1303–1308.
- Gras, L., Gilbert, R.E., Ades, A.E., Dunn, D.T., 2001. Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis. *Int J Epidemiol* 30, 1309–1313.
- Grigg, M.E., Bonnefoy, S., Hehl, A.B., Suzuki, Y., Boothroyd, J.C., 2001a. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 294, 161–165.
- Grigg, M.E., Ganatra, J., Boothroyd, J.C., Margolis, T.P., 2001b. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 184, 633–639.

- Grimwood, J., Smith, J.E., 1996. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int. J. Parasitol.* 26, 169–173.
- Guimond, C., Trudel, N., Brochu, C., Marquis, N., El Fadili, A., Peytavi, R., Briand, G., Richard, D., Messier, N., Papadopoulou, B., Corbeil, J., Bergeron, M.G., Légaré, D., Ouellette, M., 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 31, 5886–5896.
- Guo, Z.G., Johnson, A.M., 1995. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitology* 111 (Pt 2), 127–132.
- Haas, W., Kaushal, D., Sublett, J., Obert, C., Tuomanen, E.I., 2005. Vancomycin stress response in a sensitive and a tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 187, 8205–8210.
- Håkansson, S., Charron, A.J., Sibley, L.D., 2001. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* 20, 3132–3144.
- Hill, D., Dubey, J.P., 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 634–640.
- Hitziger, N., Dellacasa, I., Albiger, B., Barragan, A., 2005. Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Cell. Microbiol.* 7, 837–848.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30, 69–75.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561–1566.
- Howe, D.K., Summers, B.C., Sibley, L.D., 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 64, 5193–5198.
- Ho-Yen, D.O., Joss, A.W., Chatterton, J.M., 1992. Congenital toxoplasmosis. *BMJ* 305, 651–652.

- Human, E., 2007. Kinetic analysis of recombinantly expressed *Plasmodium falciparum* dihydrofolate synthase - folylpolyglutamate synthase. Thèse d'Université.
- Hutchison, W.M., 1965. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* 206, 961–962.
- Hyde, J.E., 2005. Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop.* 94, 191–206.
- Ibrahim, H.M., Xuan, X., Nishikawa, Y., 2010. *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18 regulates the proliferation and migration of murine macrophages and spleen cells. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 1322–1329.
- Ishikawa, Y., Kozakai, T., Morita, H., Saida, K., Oka, S., Masuo, Y., 2006. Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 42, 63–69.
- James, P., 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q. Rev. Biophys.* 30, 279–331.
- Jung, C., Lee, C.Y.-F., Grigg, M.E., 2004. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int. J. Parasitol.* 34, 285–296.
- Jungblut, P.R., Zimny-Arndt, U., Zeindl-Eberhart, E., Stulik, J., Koupilova, K., Pleissner, K.P., Otto, A., Müller, E.C., Sokolowska-Köhler, W., Grabher, G., Stöffler, G., 1999. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 20, 2100–2110.
- Kasper, L.H., Buzoni-Gatel, D., 1998. Some Opportunistic Parasitic Infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 14, 150–156.
- Kasper, L.H., Ware, P.L., 1985. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J. Clin. Invest.* 75, 1570–1577.
- Kaufman, H.E., Maloney, E.D., 1962. Multiplication of three strains of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *J. Parasitol.* 48, 358–361.

- Kawase, O., Nishikawa, Y., Bannai, H., Zhang, H., Zhang, G., Jin, S., Lee, E.-G., Xuan, X., 2007. Proteomic analysis of calcium-dependent secretion in *Toxoplasma gondii*. *Proteomics* 7, 3718–3725.
- Kazanjian, P., Armstrong, W., Hossler, P.A., Lee, C.H., Huang, L., Beard, C.B., Carter, J., Crane, L., Duchin, J., Burman, W., Richardson, J., Meshnick, S.R., 2001. Pneumocystis carinii cytochrome b mutations are associated with atovaquone exposure in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 183, 819–822.
- Kenyon, G.L., DeMarini, D.M., Fuchs, E., Galas, D.J., Kirsch, J.F., Leyh, T.S., Moos, W.H., Petsko, G.A., Ringe, D., Rubin, G.M., Sheahan, L.C., 2002. Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Mol. Cell Proteomics* 1, 763–780.
- Khan, A., Behnke, M.S., Dunay, I.R., White, M.W., Sibley, L.D., 2009. Phenotypic and gene expression changes among clonal type I strains of *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell* 8, 1828–1836.
- Khan, A., Dubey, J.P., Su, C., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology* 41, 645–655.
- Kim, J.S., Lowe, K.E., Shane, B., 1993. Regulation of folate and one-carbon metabolism in mammalian cells. IV. Role of folylpoly-gamma-glutamate synthetase in methotrexate metabolism and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 268, 21680–21685.
- Kim, J.Y., Ahn, H.-J., Ryu, K.J., Nam, H.-W., 2008. Interaction between parasitophorous vacuolar membrane-associated GRA3 and calcium modulating ligand of host cell endoplasmic reticulum in the parasitism of *Toxoplasma gondii*. *Korean J. Parasitol.* 46, 209–216.
- Klokouzas, A., Tiffert, T., van Schalkwyk, D., Wu, C.-P., van Veen, H.W., Barrand, M.A., Hladky, S.B., 2004. Plasmodium falciparum expresses a multidrug resistance-associated protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 197–201.
- Koncarevic, S., Bogumil, R., Becker, K., 2007. SELDI-TOF-MS analysis of chloroquine resistant and sensitive *Plasmodium falciparum* strains. *Proteomics* 7, 711–721.

- Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C., Sibley, L.D., 1999. Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102, 311–324.
- Lamarque, M.H., Papoin, J., Finizio, A.-L., Lentini, G., Pfaff, A.W., Candolfi, E., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M., 2012. Identification of a new rhoptry neck complex RON9/RON10 in the Apicomplexa parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE* 7, e32457.
- Le Bras, J., Durand, R., 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* 17, 147–153.
- Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P.J., Vial, H., Dubremetz, J.F., 2005. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell. Microbiol.* 7, 1823–1833.
- Leprohon, P., Légaré, D., Girard, I., Papadopoulou, B., Ouellette, M., 2006. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryotic Cell* 5, 1713–1725.
- Leprohon, P., Légaré, D., Ouellette, M., 2011. ABC transporters involved in drug resistance in human parasites. *Essays Biochem.* 50, 121–144.
- Loe, D.W., Deeley, R.G., Cole, S.P., 1996. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur. J. Cancer* 32A, 945–957.
- Longo, G.S., Gorlick, R., Tong, W.P., Lin, S., Steinherz, P., Bertino, J.R., 1997. gamma-Glutamyl hydrolase and folylpolyglutamate synthetase activities predict polyglutamylation of methotrexate in acute leukemias. *Oncol. Res.* 9, 259–263.
- Lopes, D., Rungsihirunrat, K., Nogueira, F., Seugorn, A., Gil, J.P., do Rosário, V.E., Cravo, P., 2002. Molecular characterisation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malar. J.* 1, 12.
- Lottspeich, 1999. Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 2476–2492.

- Luft, B.J., Hafner, R., Korzun, A.H., Leport, C., Antoniskis, D., Bosler, E.M., Bourland, D.D., 3rd, Uttamchandani, R., Fuhrer, J., Jacobson, J., 1993. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. *N. Engl. J. Med.* 329, 995–1000.
- Lynfield, R., Guerina, N.G., 1997. Toxoplasmosis. *Pediatr Rev* 18, 75–83.
- Mackintosh, J.A., Choi, H.-Y., Bae, S.-H., Veal, D.A., Bell, P.J., Ferrari, B.C., Van Dyk, D.D., Verrills, N.M., Paik, Y.-K., Karuso, P., 2003. A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3, 2273–2288.
- Mair, G.R., Braks, J.A.M., Garver, L.S., Wiegant, J.C.A.G., Hall, N., Dirks, R.W., Khan, S.M., Dimopoulos, G., Janse, C.J., Waters, A.P., 2006. Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science* 313, 667–669.
- Manger, I.D., Hehl, A.B., Boothroyd, J.C., 1998. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.* 66, 2237–2244.
- Marle-Plistat, M., 2005. *Toxoplasma gondii*: Réponse immune vis à vis de peptides de SAG1. Thèse d'Université.
- Marouga, R., David, S., Hawkins, E., 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 382, 669–678.
- Marshall, E.S., Elshekiha, H.M., Hakimi, M.-A., Flynn, R.J., 2011. *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin promotes altered macrophage function, caspase-1-dependent IL-1 β secretion enhances parasite replication. *Vet Res* 42, 80.
- Martin, S.K., Oduola, A.M., Milhous, W.K., 1987. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* 235, 899–901.
- Martrou, P., Pestre-Alexandre, M., Loubet, R., Nicolas, J.A., Malinvaud, G., 1965. La toxoplasmose congénitale (note concernant un cas mortel) 3–7.

- Massimine, K.M., Doan, L.T., Atreya, C.A., Stedman, T.T., Anderson, K.S., Joiner, K.A., Coppens, I., 2005. *Toxoplasma gondii* is capable of exogenous folate transport. A likely expansion of the BT1 family of transmembrane proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 144, 44–54.
- Matovu, E., Stewart, M.L., Geiser, F., Brun, R., Mäser, P., Wallace, L.J.M., Burchmore, R.J., Enyaru, J.C.K., Barrett, M.P., Kaminsky, R., Seebeck, T., de Koning, H.P., 2003. Mechanisms of Arsenical and Diamidine Uptake and Resistance in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* 2, 1003–1008.
- Mbongo, N., Loiseau, P.M., Billion, M.A., Robert-Gero, M., 1998. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 352–357.
- McFadden, D.C., Tomavo, S., Berry, E.A., Boothroyd, J.C., 2000. Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q(o) domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108, 1–12.
- McFadden, G.I., 2011. The apicoplast. *Protoplasma* 248, 641–650.
- McGuire, J.J., Russell, C.A., 1998. Folylpolyglutamate synthetase expression in antifolate-sensitive and -resistant human cell lines. *Oncol. Res.* 10, 193–200.
- Meneceur, P., Bouldouyre, M.-A., Aubert, D., Villena, I., Menotti, J., Sauvage, V., Garin, J.-F., Derouin, F., 2008. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1269–1277.
- Mercier, C., Adjogble, K.D.Z., Däubener, W., Delauw, M.-F.-C., 2005. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* 35, 829–849.
- Michelin, A., Bittame, A., Bordat, Y., Travier, L., Mercier, C., Dubremetz, J.-F., Lebrun, M., 2009. GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. *Int. J. Parasitol.* 39, 299–306.

- Mineo, J.R., Kasper, L.H., 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol.* 79, 11–20.
- Mital, J., Meissner, M., Soldati, D., Ward, G.E., 2005. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol. Biol. Cell* 16, 4341–4349.
- Mongodin, E., Finan, J., Climo, M.W., Rosato, A., Gill, S., Archer, G.L., 2003. Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin. *J. Bacteriol.* 185, 4638–4643.
- Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965–1976.
- Moran, R.G., 1999. Roles of folypoly-gamma-glutamate synthetase in therapeutics with tetrahydrofolate antimetabolites: an overview. *Semin. Oncol.* 26, 24–32.
- Murray, C.J., Rosenfeld, L.C., Lim, S.S., Andrews, K.G., Foreman, K.J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., Lopez, A.D., 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet* 379, 413–431.
- Nakaar, V., Ngô, H.M., Aaronson, E.P., Coppens, I., Stedman, T.T., Joiner, K.A., 2003. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rho-try protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 116, 2311–2320.
- Nakaar, V., Samuel, B.U., Ngo, E.O., Joiner, K.A., 1999. Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation. *J. Biol. Chem.* 274, 5083–5087.
- Nam, H.-W., 2009. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J. Parasitol.* 47 Suppl, S29–37.
- Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C., Curiel, T.J., 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J. Immunol.* 160, 1824–1830.
- Nichols, B.A., Chiappino, M.L., O'Connor, G.R., 1983. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 83, 85–98.

- Nicolle, C., Manceaux, L.H., 1909. Sur un protozoaire nouveau du *gondi*. CR Acad Sci. 148: 369.
- Nishi, M., Hu, K., Murray, J.M., Roos, D.S., 2008. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci 121, 1559–1568.
- Nowakowska, D., Colón, I., Remington, J.S., Grigg, M., Golab, E., Wilczynski, J., Sibley, L.D., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multiplex PCR and peptide-based serological testing of samples from infants in Poland diagnosed with congenital toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 44, 1382–1389.
- Nzila, A., Mberu, E., Bray, P., Kokwaro, G., Winstanley, P., Marsh, K., Ward, S., 2003. Chemosensitization of *Plasmodium falciparum* by probenecid *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 2108–2112.
- Nzila, A., Ward, S.A., Marsh, K., Sims, P.F.G., Hyde, J.E., 2005. Comparative folate metabolism in humans and malaria parasites (part I): pointers for malaria treatment from cancer chemotherapy. Trends Parasitol. 21, 292–298.
- Nzila-Mounda, A., Mberu, E.K., Sibley, C.H., Plowe, C.V., Winstanley, P.A., Watkins, W.M., 1998. Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorocycloguanil activity in vitro and point mutations in the dihydrofolate reductase domain. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 164–169.
- Ong, Y.-C., Reese, M.L., Boothroyd, J.C., 2010. *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. J. Biol. Chem. 285, 28731–28740.
- Orozco, E., López, C., Gómez, C., Pérez, D.G., Marchat, L., Bañuelos, C., Delgadillo, D.M., 2002. Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Parasitol. Int. 51, 353–359.
- Ossorio, P.N., Schwartzman, J.D., Boothroyd, J.C., 1992. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. Mol. Biochem. Parasitol. 50, 1–15.

- Ouellette, M., Drummelsmith, J., El-Fadili, A., Kündig, C., Richard, D., Roy, G., 2002. Pterin transport and metabolism in *Leishmania* and related trypanosomatid parasites. *Int. J. Parasitol.* 32, 385–398.
- Paredes-Santos, T.C., de Souza, W., Attias, M., 2012. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Structural Biology* 177, 420–430.
- Patterson, S.D., Aebersold, R.H., 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics* 33, 311–323.
- Peterson, D.S., Walliker, D., Wellems, T.E., 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 9114–9118.
- Pfefferkorn, E.R., Borotz, S.E., Nothnagel, R.F., 1992. *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to sulfonamides. *Exp. Parasitol.* 74, 261–270.
- Pinon, J.M., Chemla, C., Villena, I., Foudrinier, F., Aubert, D., Puygauthier-Toubas, D., Leroux, B., Dupouy, D., Quereux, C., Talmud, M., Trenque, T., Potron, G., Pluot, M., Remy, G., Bonhomme, A., 1996. Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. *J. Clin. Microbiol.* 34, 579–583.
- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A.H., Das, S., Kumar, S., Pandey, K., Ravidas, V., Kumar, M., De, T., Singh, D., Das, P., 2012. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1031–1041.
- Rabilloud, T., 2012. Silver staining of 2D electrophoresis gels. *Methods Mol. Biol.* 893, 61–73.
- Radfar, A., Diez, A., Bautista, J.M., 2008. Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 2034–2042.

- Radke, J.R., Striepen, B., Guerini, M.N., Jerome, M.E., Roos, D.S., White, M.W., 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 165–175.
- Reed, M.B., Saliba, K.J., Caruana, S.R., Kirk, K., Cowman, A.F., 2000. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 403, 906–909.
- Robert-Gangneux, F., Commerce, V., Tourte-Schaefer, C., Dupouy-Camet, J., 1999. Performance of a Western blot assay to compare mother and newborn anti-*Toxoplasma* antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 648–654.
- Romand, S., Chosson, M., Franck, J., Wallon, M., Kieffer, F., Kaiser, K., Dumon, H., Peyron, F., Thulliez, P., Picot, S., 2004. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 797–802.
- Romand, S., Pudney, M., Derouin, F., 1993. *In vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2371–2378.
- Romand, S., Wallon, M., Franck, J., Thulliez, P., Peyron, F., Dumon, H., 2001. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet Gynecol* 97, 296–300.
- Rome, M.E., Beck, J.R., Turetzky, J.M., Webster, P., Bradley, P.J., 2008. Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 76, 4865–4875.
- Saadatnia, G., Haj Ghani, H., Khoo, B.Y., Maimunah, A., Rahmah, N., 2010. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Trop Biomed* 27, 125–130.
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., Coller, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., Boothroyd, J.C., 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314, 1780–1783.

- Saeij, J.P.J., Coller, S., Boyle, J.P., Jerome, M.E., White, M.W., Boothroyd, J.C., 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445, 324–327.
- Saffer, L.D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J.F., Schwartzman, J.D., 1992. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* 39, 526–530.
- Salcedo, E., Cortese, J.F., Plowe, C.V., Sims, P.F., Hyde, J.E., 2001. A bifunctional dihydrofolate synthetase--folylpolyglutamate synthetase in *Plasmodium falciparum* identified by functional complementation in yeast and bacteria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112, 239–252.
- Samarawickrema, N.A., Brown, D.M., Upcroft, J.A., Thammapalerd, N., Upcroft, P., 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 833–840.
- Sanchez, C.P., Dave, A., Stein, W.D., Lanzer, M., 2010. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 40, 1109–1118.
- Sánchez-Cañete, M.P., Carvalho, L., Pérez-Victoria, F.J., Gamarro, F., Castanys, S., 2009. Low Plasma Membrane Expression of the Miltefosine Transport Complex Renders *Leishmania braziliensis* Refractory to the Drug. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1305–1313.
- Sander, J., Midtvedt, T., 1971. Development of sulphonamide resistance in *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 79, 531–533.
- Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud, T., 2000. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 21, 1054–1070.
- Sauvage, V., Aubert, D., Bonhomme, A., Pinon, J.-M., Millot, J.-M., 2004. P-glycoprotein inhibitors modulate accumulation and efflux of xenobiotics in extra and intracellular *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 134, 89–95.

- Sauvage, V., Millot, J.-M., Aubert, D., Visneux, V., Marle-Plistat, M., Pinon, J.-M., Villena, I., 2006. Identification and expression analysis of ABC protein-encoding genes in *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* ATP-binding cassette superfamily. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 177–192.
- Schmid, A., 2008. ABC transporteurs de *Toxoplasma gondii* et résistance médicamenteuse. Caractérisation et approche de la fonctionnalité sur des souches de référence, cliniques et traitées expérimentalement par la sulfadiazine. Thèse d'Université.
- Shahi, S.K., Krauth-Siegel, R.L., Clayton, C.E., 2002. Overexpression of the putative thiol conjugate transporter TbMRPA causes melarsoprol resistance in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 43, 1129–1138.
- Shaw, M.K., Roos, D.S., Tilney, L.G., 2002. Cysteine and serine protease inhibitors block intracellular development and disrupt the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 4, 119–132.
- Sheng, Y., Khanam, N., Tsaksis, Y., Shi, X., Lu, Q., Bognar, A.L., 2008. Mutagenesis of folylpolyglutamate synthetase indicates that dihydropteroate and tetrahydrofolate bind to the same site. *Biochemistry* 47, 2388–2396.
- Shonhai, A., Maier, A.G., Przyborski, J.M., Blatch, G.L., 2011. Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein Pept. Lett.* 18, 143–157.
- Sibley, L.D., Boothroyd, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82–85.
- Sibley, L.D., Mordue, D.G., Su, C., Robben, P.M., Howe, D.K., 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 357, 81–88.
- Sigmund, C.D., Ettayebi, M., Borden, A., Morgan, E.A., 1988. Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* 164, 673–690.

- Sinai, A.P., Joiner, K.A., 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell Biol.* 154, 95–108.
- Sinai, A.P., Webster, P., Joiner, K.A., 1997. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 17), 2117–2128.
- Singh, G., Chavan, H.D., Dey, C.S., 2008. Proteomic analysis of miltefosine-resistant *Leishmania* reveals the possible involvement of eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A). *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 584–586.
- Smith, J.E., 1995. A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 25, 1301–1309.
- Son, E.-S., Song, K.-J., Shin, J.-C., Nam, H.-W., 2001. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol* 39, 133–141.
- Speer, C.A., Dubey, J.P., 1998. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology* 116 (Pt 1), 35–42.
- Splendore, A., 1909. Sopra um nuovo protozoo parasita dei conigli. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 4: 75–79.
- Srivastava, I.K., Morrissey, J.M., Darrouzet, E., Daldal, F., Vaidya, A.B., 1999. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol. Microbiol.* 33, 704–711.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5844–5849.
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S.J., Tang, K., Beatty, W.L., Hajj, H.E., Jerome, M., Behnke, M.S., White, M., Wootton, J.C., Sibley, L.D., 2006. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314, 1776–1780.

- Tenter, A.M., 2009. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104, 364–369.
- Thiébaud, R., Leproust, S., Chêne, G., Gilbert, R., 2007. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. Lancet 369, 115–122.
- Tomavo, S., 2001. The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy. Int. J. Parasitol. 31, 1023–1031.
- Tomavo, S., Fortier, B., Soete, M., Ansel, C., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1991. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun 59, 3750–3753.
- Townson, S.M., Upcroft, J.A., Upcroft, P., 1996. Characterisation and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. Mol. Biochem. Parasitol. 79, 183–193.
- Trenque, T., Simon, N., Villena, I., Chemla, C., Quereux, C., Leroux, B., Jaussaud, R., Rémy, G., Dupouy, D., Millart, H., Pinon, J.-M., Urien, S., 2004. Population pharmacokinetics of pyrimethamine and sulfadoxine in children with congenital toxoplasmosis. Br J Clin Pharmacol 57, 735–741.
- Triglia, T., Wang, P., Sims, P.F., Hyde, J.E., Cowman, A.F., 1998. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. EMBO J. 17, 3807–3815.
- Unlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis 18, 2071–2077.
- Upcroft, J.A., Upcroft, P., 1993. Drug resistance and *Giardia*. Parasitol. Today (Regul. Ed.) 9, 187–190.
- Velge-Roussel, F., Dimier-Poisson, I., Buzoni-Gatel, D., Bout, D., 2001. Anti-SAG1 peptide antibodies inhibit the penetration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into enterocyte cell lines. Parasitology 123, 225–233.

- Verdrager, J., 1986. Epidemiology of emergence and spread of drug-resistant *falciparum* malaria in Southeast Asia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 17, 111–118.
- Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J., Ouellette, M., 2007. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol. Cell Proteomics* 6, 88–101.
- Villena, I., Ancelle, T., Delmas, C., Garcia, P., Brezin, A.P., Thulliez, P., Wallon, M., King, L., Goulet, V., 2010. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Euro Surveill.* 15.
- Villena, I., Aubert, D., Leroux, B., Dupouy, D., Talmud, M., Chemla, C., Trenque, T., Schmit, G., Quereux, C., Guenounou, M., Pluot, M., Bonhomme, A., Pinon, J.M., 1998a. Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group. *Scand. J. Infect. Dis.* 30, 295–300.
- Villena, I., Quereux, C., Pinon, J.M., 1998b. Congenital toxoplasmosis: value of prenatal treatment with pyrimethamine-sulfadoxine combination. *Prenat. Diagn.* 18, 754–756.
- Walker, D.J., Wakefield, A.E., Dohn, M.N., Miller, R.F., Baughman, R.P., Hossler, P.A., Bartlett, M.S., Smith, J.W., Kazanjian, P., Meshnick, S.R., 1998. Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J. Infect. Dis.* 178, 1767–1775.
- Walker, J., Gongora, R., Vasquez, J.-J., Drummelsmith, J., Burchmore, R., Roy, G., Ouellette, M., Gomez, M.A., Saravia, N.G., 2012. Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 183, 166–176.
- Wallon, M., Kodjikian, L., Binquet, C., Garweg, J., Fleury, J., Quantin, C., Peyron, F., 2004. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics* 113, 1567–1572.

- Waltham, M.C., Li, W.W., Gritsman, H., Tong, W.P., Bertino, J.R., 1997. gamma-Glutamyl hydrolase from human sarcoma HT-1080 cells: characterization and inhibition by glutamine antagonists. *Mol. Pharmacol.* 51, 825–832.
- Wang, P., Wang, Q., Yang, Y., Coward, J.K., Nzila, A., Sims, P.F.G., Hyde, J.E., 2010. Characterisation of the bifunctional dihydrofolate synthase-folylpolyglutamate synthase from *Plasmodium falciparum*; a potential novel target for antimalarial antifolate inhibition. *Mol. Biochem. Parasitol.* 172, 41–51.
- Wassmann, C., Hellberg, A., Tannich, E., Bruchhaus, I., 1999. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J. Biol. Chem.* 274, 26051–26056.
- Weiss, L.M., Fiser, A., Angeletti, R.H., Kim, K., 2009. *Toxoplasma gondii* proteomics. *Expert Rev Proteomics* 6, 303–313.
- Wellems, T.E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., do Rosario, V.E., Gwadz, R.W., Walker-Jonah, A., Krogstad, D.J., 1990. Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature* 345, 253–255.
- Wellems, T.E., Walker-Jonah, A., Panton, L.J., 1991. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3382–3386.
- Wilson, C.M., Serrano, A.E., Wasley, A., Bogenschutz, M.P., Shankar, A.H., Wirth, D.F., 1989. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science* 244, 1184–1186.
- Wilson, C.M., Volkman, S.K., Thaithong, S., Martin, R.K., Kyle, D.E., Milhous, W.K., Wirth, D.F., 1993. Amplification of *pfmdr 1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 151–160.
- Wu, Y., Kirkman, L.A., Wellems, T.E., 1996. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1130–1134.

- Xia, D., Sanderson, S.J., Jones, A.R., Prieto, J.H., Yates, J.R., Bromley, E., Tomley, F.M., Lal, K., Sinden, R.E., Brunk, B.P., Roos, D.S., Wastling, J.M., 2008. The proteome of *Toxoplasma gondii*: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. *Genome Biol.* 9, R116.
- Yamamoto, M., Standley, D.M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., Soldati-Favre, D., Takeda, K., 2009. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp. Med.* 206, 2747–2760.
- Yeoh, S., O'Donnell, R.A., Koussis, K., Dluzewski, A.R., Ansell, K.H., Osborne, S.A., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G.H., Bannister, L.H., Bryans, J.S., Kettleborough, C.A., Blackman, M.J., 2007. Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* 131, 1072–1083.

Annexes

Dans cette section, sont répertoriées les compositions des différents tampons utilisés au cours de l'étude et présentés dans la partie Matériel et Méthodes.

Partie I. Cultures cellulaires

Tampon de conjugué	pour 100 mL
Tris/NaCl (pH 7,3) 74,9% (v/v)	74,9 mL
IGEPAL [®] CA-630 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich)	0,1 mL
Ethylmercuriothiol-Benzoésäure Natrium Sals 0,2 mM (Merck Millipore)	10 g
SVF décomplémenté 25 % (v/v) (Biowest)	25 mL
Hexaferriocyanure de potassium 50 mM (Sigma-Aldrich)	1,65 g
Tampon de lavage	pour 100 mL
Chlorure de sodium 140 mM (Merck Millipore)	8 g
Chlorure de Potassium 2,5 mM (Merck Millipore)	0,2 g
Dihydrogène phosphate de sodium 10 mM (Merck Millipore)	1,78 g
Dihydrogène phosphate de potassium 2,5 mM (Merck Millipore)	0,2 g
Ethylmercuriothiol-Benzoésäure Natrium Sals 0,02 mM (Merck Millipore)	0,01 g
Tween 20 0,1 % (v/v) (Merck Millipore)	0,1 mL
Qsp 100 mL H ₂ O MilliQ	
Tampon de substrat	pour 100 mL
Acide citrique 40 mM (Merck Millipore)	0,87 g
Dihydrogène Phosphate de Sodium 120 mM (Merck Millipore)	2 g
Ethylmercuriothiol-Benzoésäure Natrium Sals 0,2 mM (Merck Millipore)	0,01 g
Peroxyde d'hydrogène (30%) 0.02 % (v/v)	70 µL
Qsp 100 mL H ₂ O MilliQ	

Annexe 1. Composition des tampons pour le test ELISA GII9-HRP

Partie II. Biochimie

Tampon de lyse RIPA	Pour 100 mL
Tris/ HCl	785 mg
NaCl	876 mg
NP-40	1 mL
Sodium déoxycholate	500 µL
SDS 10%	1 mL
Triton X-100 1%	1 mL
Qsp 100 mL H ₂ O milliq	

Annexe 2. Composition du tampon de lyse RIPA

Tampon échantillon 4X	Pour 10 mL
Tris 0,5M/HCl (pH6,8)	4,8 mL
SDS 10%	800 µL
Glycérol	2 mL
Bleu de Bromophénol	200 µg
Qsp 10 mL H ₂ O milliq	

Annexe 3. Composition du tampon échantillon 4X

Gel de compression à 4 %		Pour 1 gel
Acrylamide/bisacrylamide 40% (37,5/1)		200 µL
H ₂ O milliQ		1,25 mL
SDS 10 %		20 µL
Tris 0,5 M/ HCl pH6,8		475 µL
TEMED		2 µL
APS 10 %		20 µL
Gel de séparation à 12,5 %		Pour 1 gel
Acrylamide/bisacrylamide 40% (37,5/1)		1,57 mL
H ₂ O milliQ		2,175 mL
SDS 10 %		50 µL
Tris 1,5 M/ HCl pH8,8		1,25 mL
TEMED		2,5 µL
APS 10 %		50 µL

Annexe 4. Composition des solutions de gel SDS-PAGE

Tampon de transfert 10X	
Tris-base	58,2 g
Glycine	29,3 g
Qsp 1 L H ₂ O milliQ, pH9,2	
Tampon de transfert 1X	
Tampon de transfert 10X	100 mL
Méthanol	200 mL
Qsp 1 L H ₂ O milliQ	

Annexe 5. Composition des tampons utilisés pour l'électrotransfert

Tampon TBS 10X (à utiliser 1X)	
Tris-HCl	63,5 g
Tris-base	11,8 g
NaCl	87,75 g
Qsp 1 L H ₂ O milliQ	
Tampon T-TBS (0,05%)	
Tween 20	50 µL
Qsp 100 mL tampon TBS 1X	

Annexe 6. Composition des tampons utilisés pour l'immunomarquage

Partie IV. Protéomique

Tampon de lyse	pour 5 mL
Urée 8 M	2,4 g
CHAPS 4 % (p/v)	0,2 g
Tris-Base 40 mM	0,024 g
Qsp 5 mL H ₂ O milliq	

Annexe 7. Composition du tampon de lyse des échantillons

Tampon échantillon	pour 25 mL
Urée 8 M	12 g
CHAPS 4% (p/v)	1 g
Qsp 25 mL H ₂ O milliq	

Annexe 8. Composition du tampon échantillon

Tampon de réhydratation	pH 3-6	pH 5-8	pH 7-10
Tampon échantillon 2X	5 mL	5 mL	5 mL
DTT	14 mg	14 mg	14 mg
Glycérol 10%	500 µL	500 µL	500 µL
Ampholytes 0,2% (Bio-Rad)	10 µL Bio-Lyte 3-10	10 µL Bio-Lyte 3-10	10 µL Bio-Lyte 7-10

Annexe 9. Composition du tampon de réhydratation pour la 2-DE

Tampon d'équilibration	pour 100 mL
Tris 1,5M/HCl (pH8,8) 75mM	5 mL
Urée 6 M	36 g
Glycérol 30 % (v/v)	35 mL
SDS 2% (p/v)	2 g
Qsp 100 mL H ₂ O milliq	

Annexe 10. Composition du tampon d'équilibration

Gel SDS-PAGE 12,5%	12 gels
Acrylamide/bisacrylamide 40% (37,5/1)	390 mL
Tris 1,5 M/ HCl pH8,8	325 mL
H ₂ O milliQ	565 mL
SDS 10%	13 mL
APS 10 %	13 mL
TEMED	650 µL

Annexe 11. Composition de la solution de gel SDS-PAGE

Tampon de réhydratation	pH 3-10
Tampon échantillon	2,5 mL
DTT	7 mg
Ampholytes 2% (GE Healthcare)	100 µL pH 3-10 NL

Annexe 12. Composition du tampon de réhydratation pour la 2D-DIGE

Solution de Bind Silane	Pour 20 mL
Ethanol 80%	16 mL
Acide acétique glacial 2%	400 µL
Bind Silane 0,1%	20 µL
Qsp 20 mL H ₂ O milliQ	

Annexe 13. Composition de la solution de Bind Silane

Gel SDS-PAGE 12,5%	5 gels
Acrylamide/bisacrylamide 40% (37,5/1)	250 mL
Tris 1,5 M/ HCl pH8,8	150 mL
H ₂ O milliQ	187 mL
SDS 10%	6 mL
APS 10 %	6 mL
TEMED	830 µL

Annexe 14. Composition de la solution de gel SDS-PAGE

Tampon de migration	10 X
Tris-Base 250 mM	60 g
Glycine 2 M	288 g
SDS 2 % (p/v)	40 g
Qsp 2 L H ₂ O milliQ	

Annexe 15. Composition du tampon de migration 10X