n° ordre : 40468

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTE DE LILLE

THESE

Pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR en Biologie et Santé de l'Université de Lille Nord de France

Spécialité : Parasitologie

Présentée par

FAUQUENOY Sylvain

Sous la tutelle du **Docteur TOMAVO Stanislas**

IMPLICATION DE LA *N*-GLYCOSYLATION DANS LES MECANISMES DE MOTILITE ET D'INVASION DES CELLULES HOTES CHEZ *TOXOPLASMA GONDII*

Soutenue le 20 Décembre 2010

Composition du jury :

Monsieur le Docteur MICHALSKI Jean-Claude	**Président**
Monsieur le Docteur LANGSLEY Gordon	**Rapporteur**
Monsieur le Docteur ESTAQUIER Jérome	**Rapporteur**
Monsieur le Docteur HENRISSAT Bernard	**Examinateur**
Madame le Docteur HUET Guillemette	**Examinateur**
Monsieur le Docteur TOMAVO Stanislas	**Directeur de thèse**

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

Unité Mixte de Recherche du CNRS 8204 – Unité INSERM 1019

Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe de Monsieur le Docteur Stanislas TOMAVO, dans l'équipe 1 Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Toxoplasme, du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille UMR CNRS 8204 – Unité INSERM 1019, à l'Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59000 LILLE.

Implication de la *N*-glycosylation dans les mécanismes de motilité et d'invasion des cellules hôtes chez *Toxoplasma gondii*

RESUME

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire unicellulaire qui se développe à l'intérieur d'une cellule hôte. Chez les parasites Apicomplexa, peu de chose sont connues sur la *N*-glycosylation. Nous avons mis en évidence la présence de *N*-glycannes parasitaires totaux et démontré que ces *N*-glycannes sont de type riche en mannose. En utilisant une lectine, nous avons purifié de nombreuses *N*-glycoprotéines parasitaires intervenant majoritairement dans les mécanismes de motilité, d'invasion et de trafic intracellulaire. Nous avons démontré qu'un traitement par une drogue inhibant la synthèse des *N*-glycannes perturbe plusieurs processus biologiques. Nous avons étudié les fonctions biologiques des *N*-glycannes de TgGAP50 qui appartient au glidéosome, un moteur impliqué dans la motilité du parasite. Nous avons déterminé que TgGAP50 porte des *N*-glycannes hétérogènes riches en mannoses. Nous avons montré que la *N*-glycosylation de TgGAP50 est impliquée dans le trafic de la protéine et dans l'interaction avec les partenaires du glidéosome. Nos travaux démontrent que *T. gondii* est capable de synthétiser des *N*-glycoprotéines et que les *N*-glycannes sont potentiellement impliqués dans le trafic des protéines et dans les interactions moléculaires importantes pour la motilité et l'invasion des cellules hôtes par le parasite.

MOTS CLEFS : parasitologie, *Toxoplasma gondii*, biologie cellulaire et moléculaire, *N*-glycosylation, *N*-glycannes, motilité, invasion, trafic intracellulaire, mutation

Deciphering *N*-glycosylation Structures and Functions in *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* penetrates virtually any kind of mammalian cell using proteins released from late secretory organelles and a unique form of gliding motility. How *T. gondii* glycosylated proteins mediate host-parasite interactions remains elusive. Here, we report comprehensive proteomics and glycomics analyses showing that several key components required for interactions between *T. gondii and* host cells are *N*-glycosylated. Detailed structural characterization confirmed that *N*-glycans from *T. gondii* total protein extracts consist of oligomannosidic and paucimannosidic sugars, which are rarely present on mature eukaryotic glycoproteins. *In situ* fluorescence using concanavalin A and *Pisum sativum* agglutinin predominantly stained the entire parasite body. Visualization of *Toxoplasma* glycoproteins purified by affinity chromatography identified components involved in gliding motility, moving junction, and other additional functions. Importantly, tunicamycin-treated parasites were considerably reduced in motility, host cell invasion, and growth. In addition, we show that all three potential *N*-glycosylated sites of GAP50 are occupied by unusual *N*-glycan structures with terminal glucoses. Using site-directed mutagenesis, we demonstrate that *N*-glycosylation is a prerequisite for GAP50 transport into the inner membrane complex. Assembly of key partners into gliding complex by unglycosylated GAP50 and parasite motility are severely impaired. Collectively, these results provide the first molecular description of *T. gondii N*-glycosylation functions that are vital for parasite motility and host cell entry.

KEY WORDS : parasitology, *Toxoplasma gondii*, cellular and molecular biology, *N*-glycosylation, *N*-glycans, motility, invasion, intracellular traffic, mutation

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Toxoplasme de *Monsieur le Docteur Stanislas Tomavo*, Directeur de Recherches du CNRS à l'UMR 8204, sous son encadrement, au sein du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, dirigé par *Monsieur le Docteur Camille Locht*, à l'Institut Pasteur de Lille, dirigé par *Monsieur le Docteur Philippe Amouyel*.

Je tiens également à remercier *Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski* pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF UMR 8576 CNRS) dans l'équipe de Parasitologie Moléculaire du Toxoplasme de *Monsieur le Docteur Stanislas Tomavo*, durant la première moitié de ces trois années de thèse. Je tiens tout autant à le remercier d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Monsieur le Docteur Stanislas Tomavo m'a accueilli dans son équipe lors d'un stage en juin 2006, avant de préparer dans son laboratoire mon Master II Recherche, il y a plus de quatre années déjà. Je le remercie de m'avoir offert l'opportunité de découvrir le monde de la recherche en parasitologie, grâce à ces travaux menés sur un micro-organisme aussi captivant qu'est le toxoplasme. Ces quatre années ont été pleines d'enseignements, sur le plan scientifique bien évidemment, mais également sur le plan humain et professionnel. Je tiens ici à la lui exprimer toute ma reconnaissance.

Monsieur le Docteur Gordon Langsley et *Monsieur le Docteur Jérome Estaquier* ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, et *Monsieur le Docteur Bernard Henrissat* et *Madame le Docteur Guillemette Huez* ont accepté d'examiner ce mémoire : qu'ils reçoivent ici mes plus sincères remerciements.

Un grand merci à *Messieurs les Docteurs Christian Slomianny* et *Willy Morelle*, pour leur aide précieuse en matière de microscopie confocale et de biochimie analytique des glycannes. Je les remercie tous deux pour les nombreux conseils et les connaissances qu'ils ont su m'inculquer.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de l'équipe de protéomique du *Docteur Alain Van Doresselaer*, de l'Université de Strasbourg, *Agnès Hovasse* et le *Docteur Christine Schaeffer* qui ont largement contribué à ces travaux grâce à leur maitrise des analyses protéomiques.

Depuis mes débuts dans la recherche jusqu'à aujourd'hui, j'ai eu le plaisir de travailler avec de nombreuses personnes au sein du labo toxo du C9. La première, *Gabrielle Oria*, qui m'a cordialement céder son bureau alors qu'elle était en pleine rédaction de la sa thèse le jour où je suis

arrivé au C9. Merci pour ce petit geste et le quelques conseils que tu as pu me donner. La deuxième, *Marlène Mortuaire*, qui a su me transmettre son savoir technique et sa bonne humeur. Ensuite les deux Edwige, *Edwige Meurice*, qui m'a cédé le « bureau des thésards » et *Edwige Madec* qui m'a conseillé sur de nombreux points techniques. Merci à toutes les deux. Et enfin un grand merci à tous les anciens du C9 étudiants et statutaires qui m'ont également apportés leur aide lors de ces travaux.

Je terminerai ici par les collègues de paillasse que j'ai eu la chance de côtoyer au C9 puis à l'Institut Pasteur de Lille pendant deux ans pour certains et trois pour d'autres. Ce sont devenu des amis désormais. Pour ne pas faire de jaloux, je commencerai par les ainés, *Mathieu Gissot* et *Sara Hardy*, qui ont su me conseiller de très nombreuses fois à la paillasse, *Stéphane Delhaye* et *Thomas Mouveaux*, nos deux ingénieurs grâce auxquels la bonne humeur était présente chaque jour au labo et qui ont su me donner des coups de mains lorsque j'en avais besoin. Un grand merci à *Robert Walker*, notre post-doc australien, grâce à qui mon anglais s'est un peu enrichi. Et enfin, pour terminer *Pierre Julien Sloves*, le thésard suivant dans le labo, je le remercie pour tous les jours où nous sommes restés tard au labo et où nous nous sommes soutenus mutuellement. Je lui souhaite toute la réussite possible pour les manips et la continuité de sa thèse, de même pour *Adelma Escobar*, merci à vous tous et bonne continuation.

Pardon à tous ceux que je n'aurai pas cité ici…

Je remercie également tous les membres des unités voisines du 3ème étage Guérin pour leur sympathie et leurs petits conseils.

Pour terminer, j'exprime ici toute la reconnaissance méritée à mes parents, mon petit frère, ma famille et à Marine, sans qui les moments durs auraient été bien plus difficiles à surmonter…

COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES ET PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

COMMUNICATIONS ECRITES

✓ Présentation d'un poster au 10th International Congress on Toxoplasmosis à KERKRADE au Pays Bas du 19 au 23 juin 2009

Deciphering *N*-glycans functions of *Toxoplasma gondii* AMA1 and GAP50

Sylvain Fauquenoy et Stanislas Tomavo

✓ Présentation d'un poster à la 9ème Journée André Verbert organisée par l'Ecole Doctorale de Biologie et Santé de Lille en septembre 2009

Etude de la fonction des *N*-glycannes de deux N-glycoprotéines chez *Toxoplasma gondii*, TgAMA1 and TgGAP50.

Sylvain Fauquenoy et Stanislas Tomavo

COMMUNICATION ORALES

✓ Présentation orale à la réunion du Club Toxo à l'Institut Cochin de Paris en juin 2008

Analyses Protéomiques et Glycomiques des structures *N*-glycosylées impliquées dans l'interaction hôte-parasite chez *Toxoplasma gondii*

Sylvain Fauquenoy et Stanislas Tomavo

✓ Présentation orale à la réunion du Club Toxo à l'Institut Cochin de Paris en juin 2010

La mutation des sites de *N*-glycosylation interfère sur la localisation subcellulaire et l'interaction de la glycoprotéine GAP50 avec ses partenaires chez *Toxoplasma gondii*

Sylvain Fauquenoy et Stanislas Tomavo

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

✓ Daher, W., Oria, G., **Fauquenoy, S**., Cailliau, K., Browaeys, E., Tomavo, S., and Khalife, J. (2007). A *Toxoplasma gondii* leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity. Eukaryot Cell *6*, 1606-1617.

✓ **Fauquenoy, S**., Morelle, W., Hovasse, A., Bednarczyk, A., Slomianny, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Tomavo, S. (2008). Proteomics and glycomics analyses of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*--host cell interactions. Mol Cell Proteomics *7*, 891-910.

✓ Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.F., **Fauquenoy, S.**, Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., Lebrun, M. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in the moving junction-dependent invasion by Apicomplexa parasites, article soumis à Cell Host & Microbe

✓ **Fauquenoy, S.**, Hovasse, A., Morelle, W., Tchilabalo-Alayi, E., Slomianny, C., Schaeffer, C., Van Dorsselear, A., and Tomavo, S. *N*-glycosylation is essential for trafficking of *Toxoplasma gondii* GAP50 to the inner membrane complex and binding to key gliding factors, article soumis à Molecular Biology of the Cell

ABBREVIATIONS

A, Asn : Asparagine
AC : Apical Conoïde
ADF : Actin Depolymerizing Factor
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNg : Acide Désoxyribonucléique génomique
AGL : Archaeal Glycosylation
ALD : Aldolase
ALG : Asparagin-Linked Glycosylation
ALP : Actin-Like Protein
AMA : Apical Membrane Antigen
AP : Adaptin-Potein
ARNm : Acide Ribonucléique messager
ARF : ADP Ribosylation Factor
ARP : Actin Related Protein
ASP : Aspartyl Protease
Asp : acide aspartique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BET : Bromure d'Ethidium
BiP : Binding Protein
BIC : Basal Inner Collar
BSR : Bradyzoïte SAG1-Related sequence
CAM : Calcium binding proteins
Cc : Centrocone
Ce : Centriole
CDPK : Calcium Dependant Protein Kinase
CCL : C-C chemokine Ligand
CCR : C-C chemokine Receptor
CD : Cluster of Differentiation
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMI : Complexe Membranaire Interne
CNX : Calnexine
Co : Conoïde
Con A : Concanavaline A
COP : Coated Protein
CRT : Calréticuline
DBR : Daughter Basal Ring
DG : Dense Granule
DHFR : Dihydrofolate réductase
DIMC : Daughter Inner Membrane Complex
DLC : Dynein Light Chain
DMEM : Dulbecco Minimum Essential Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde
Dol-P : Dolichol Phosphate
DPBS : Dulbecco Phosphate Buffered Saline
Drp : Dynamin-related protein
DTT: Dithiothréitol
EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétate
EGF : Epidermal Growth Factor
EDEM : ER-Degradation Enhancing-Mannosidase-like protein
ER : Endoplasmic Reticulum
ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation
ERD : Endoplasmic reticulum Retention Defective
ERGIC : ER-Golgi intermediate compartment
FITC : Fluoresceine Iso Thio Cyanate
FLAG : épitope drapeau
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching
G : appareil de Golgi
GAP : Glideosome Associated Protein
GAPM : Glideosome Associated Protein with Multiple-membrane spans
GlcNAc : N-Acétylglucosamine
Glc : Glucose
Glu : acide glutamique
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
GRA : Granule dense
GRAs : Granule dense proteins
GRASP : Golgi Reassembly Stacking Protein
GT : Glucose-Transporter
GTP : Guanidine TriPhosphate
HA : Hémagglutinine
HC : Host Cell
HDEL : Histidine-acide Aspartique-acide Glutamique-Leucine
HFF : Human Foreskin Fibroblast
HOSTs : Host Organelle Sequestring Tubulo structures
HPM : Host Plasma Membrane
HSP : Heat Shock Protein
ICAM : Inter-Cellular Adhesion Molecule
ICMAP1 : Intra-Conoïd Microtubule Associated Protein
IFN : Interféron
Ig : immunoglobuline
IL : Interleukine
IMC : Inner Membrane Complex
IMPs : Inner Membrane Particules
ISPs : Inner membrane complex Sub-compartments Proteins
JAS : Jasplakinolide
JM : Jonction Mobile

Kb : Kilobase
kDa : KiloDalton
KRP : Kreb's Ringer phosphate
LDH : Lactate Déshydrogénase
LPG : Lipophospoglycanne
LXA4 : Lipoxine A4
M2AP : MIC2 Associated Protein
M : Mitochondrie
Man : Mannose
MAP : Microtubules Associated Proteins
MAPK : Mitogen Associated Protein Kinase
Mb : mégabase
MBR : Mother Basal Ring
MIC : Micronème
MICs : Microneme proteins
MIM&P : Mother Inner Membrane complex and plasmalemma
MJ : Moving Junction
MLC : Myosin Light Chain
MM : méthyl-D-mannoside
MORN : Membrane Occupation and Recognition Nexus
MPP : Microneme Protein Protease
MT : Microtubule
MTIP : Myosin-Tail Interacting Protein
MTOC : Microtubule Organizing Center
MyD88 : Myeloid Differenciation factor 88
MyoA : Myosine A
N : Noyau
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydroxyl
NFκB : Nuclear Factor κB
NK : Natural Killer
NTP : Nucléotide TriPhosphate
ORF : Open Reading Frame
OST : Oligosaccharyl Transférase
P, Pro : Proline
PAF : Paraformaldéhyde
Pb : paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGL : Protein Glycosylation
PhIL : Photosensitized INA-Labeled protein
PM : Plasma Membrane
PMSF : Paraméthylsulfoxyde
PRP : Parafusin-Related Protein
PSA : Pisum Sativum Agglutinin

PV : Parasitophorous Vacuole
PVM : Parasitophorous Vacuole Membrane
RE : Réticulum Endoplasmique
RFT : Requiring Fifty-Three
RNG : Ring protein
ROMs : Rhomboïd proteins
RON : coup des rhoptries
RONs : Rhoptry Neck proteins
ROP : Rhoptries
ROPs : Rhoptry proteins
RT-PCR : reverse transcriptase-PCR
S, Ser : Sérine
SAG : Surface AntiGene
SAR : Secretion-associated and Ras-related
SDS-PAGE : Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SPATR : Secreted Protein with an Altered Thrombospondin Repeat
SRS : SAG1-related sequence
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
SUB : Subtilisine
SUSA : SAG-Unrelated Surface Antigen
SVF : Sérum de Veau Fœtal
T, Thr : Thréonine
TAE : Tris Acétate EDTA
TEMED : N,N,N', N' –tétraméthyléthylénediamine
TLR : Toll Like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNT : Tris NaCl Tween 20
TRAP : Thrombospondin-Related Anonymous Protein
TRIS : Tri(hydroxyméthyl)aminométhane
UGGT : UDP-Glucose : Glycoprotéine glucosyltransférase
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP : Vacuole Parasitophore
VSG : Variant Surface Glycoprotein
W : tryptophane

TABLE DES MATIERES

RESUME 2
ABSTRACT 3
REMERCIEMENTS 4
COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES ET PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES 6
ABBREVIATIONS 7
TABLE DES MATIERES 11
INTRODUCTION 16
GENERALITES 20
***Toxoplasma gondii* et la toxoplasmose** 20
I. Historique 20
II. Taxonomie du parasite 21
III. Cycle de vie complexe du parasite 21
A. La phase sexuée chez l'hôte définitif 22
B. La phase asexuée chez les hôtes intermédiaires 23
IV. Morphologie des différents stades de T. gondii 23
V. La toxoplasmose 25
A. Prévalence 25
B. Phases de la maladie 26
C. Symptômes 26
D. Risques infectieux 27
E. Génotype et pathogénicité 27
F. Diagnostic et pathogenèse de la toxoplasmose 28
1. Chez la femme enceinte 28
2. Chez le fœtus et le nouveau né 28
3. Chez les patients immunodéprimés 29
VI. La réponse immunitaire de l'hôte 29
A. L'immunité innée contre la toxoplasmose 30
B. L'immunité adaptative contre la toxoplasmose 31
C. Manipulation de la réponse innée par *T. gondii* 32
VII. L'invasion active des cellules hôtes 33
VIII. La réplication parasitaire et la sortie des parasites 36
Ultrastructure de *Toxoplasma gondii* 39
I. Les organites spécifiques des cellules Eucaryotes 39
II. La pellicule du parasite 40
A. La membrane plasmique 41
B. Le complexe membranaire interne 42
III. Le glidéosome et la motilité parasitaire 45
A. Les composants du glidéosome 47
1. Glideosome Associated Protein 50 47
2. Glideosome Associated Protein 45 49
3. Myosin Light Chain 1 50
4. Myosine A 50
B. Les autres composants de l'appareil moteur 51
1. Actine 51
2. Aldolase 52

3. MIC2-M2AP 53
C. La motilité parasitaire 54
D. Le mécanisme du « gliding » 56
IV. La jonction mobile et l'invasion 57
A. Apical Membrane Antigen 1 58
B. Les RONs 59
V. La vacuole parasitophore 59
VI. Les organites spécifiques des Apicomplexa 62
A. Les micronèmes 62
B. Les rhoptries 64
C. L'apicoplaste 65
D. Les granules denses 66
VII. Le cytosquelette cortical 67
A. Le conoïde et le complexe apical 67
B. Les microtubules 69
C. Le complexe basal 71
D. Le réseau filamenteux sous-pelliculaire 72
VIII. La biogenèse des cellules filles 74
IX. Trafic intracellulaire 75
A. L'appareil sécrétoire 76
B. Les protéines dans le réticulum endoplasmique 77
C. Du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi 77
D. Le tri des protéines dans l'appareil de Golgi 77
E. Le réseau trans-golgien et l'adressage vers les pré-organites 78
F. Trafic des protéines des organites apicaux à travers l'appareil sécrétoire 78
***Toxoplasma gondii* et *N*-glycosylation** 80
I. Synthèse des *N*-glycoprotéines chez les Eucaryotes 80
A. Synthèse d'une structure *N*-glycannique 81
B. Transfert du *N*-glycanne sur la protéine en cours de synthèse 82
C. Première étape de maturation de la *N*-glycoprotéine 83
D. Maturation du *N*-glycanne des *N*-glycoprotéines dans l'appareil de Golgi 83
E. Contrôle qualité des *N*-glycoprotéines dans le RE 84
II. Nature des précurseurs glycolipidiques de la *N*-glycosylation chez les Eucaryotes inférieurs 85
A. Structure des *N*-glycannes 86
B. Le complexe OST 86
C. Le contrôle qualité 88
D. La maturation de la *N*-glycoprotéine 89
III. Les *N*-glycoprotéines des Eucaryotes inférieurs 89
A. Chez les Trypanosomatidae 89
1. Chez *Trypanosoma brucei* 90
2. Chez *Tryponasoma cruzi* 90
B. Chez les Leishmaniae 91
C. Chez *Giardia lamblia* 91
D. Chez *Dictyostelium discoideum* 92
E. Chez *Tetrahymena thermophila* 92
IV. La *N*-glycosylation chez les Archae et les Bactéries 92
V. La *N*-glycosylation chez les Apicomplexa et chez *Toxoplasma gondii* 94
A. Chez *Cryptosporidium parvum* 94
B. Chez *Neospora caninum* 94
C. Chez *Plasmodium falciparum* 94

D. Chez *Toxoplasma gondii* 95
PROBLEMATIQUE 97
RESULTATS 99
Analyses protéomiques et glycomiques des structures *N*-glycosylées impliquées dans les interactions cellules hôtes-*Toxoplasma gondii* 99
I. Analyses glycomiques des *N*-glycannes totaux de *T. gondii* 99
II. Expression des gènes de la voie de synthèse des *N*-glycannes chez *T. gondii* 100
III. Localisation subcellulaire des *N*-glycoprotéines de *T. gondii* 101
IV. Nature des *N*-glycoprotéines de *T. gondii* 102
V. Implication de la *N*-glycosylation de *T. gondii* dans l'invasion des cellules hôtes 104
ARTICLE 1 106
Elucidation des fonctions biologiques des *N*-glycannes de TgGAP50 et TgAMA1 chez *Toxoplasma gondii* 107
I. Implications des *N*-glycannes de TgGAP50 dans sa localisation subcellulaire 107
II. Implications des *N*-glycannes de TgAMA1 dans sa localisation subcellulaire 109
III. Effet de la surexpression des différentes versions glycosylées de TgGAP50 chez *T. gondii* exprimant les protéines de manière stable ou transitoire 110
IV. Caractérisation biochimique des *N*-glycannes portés par TgGAP50 112
V. Implications des *N*-glycannes de TgGAP50 dans les interactions avec les partenaires du glidéosome 112
VI. Effets différentiels de la tunicamycine sur les parasites sur-exprimant TgGAP50 sauvage et le triple mutant TgGAP50 N_101_136_228-AAA 113
VII. Détermination de la structure des *N*-glycannes de TgGAP50 114
VIII. Identification des partenaires de TgGAP50 sauvage et déglycosylée 115
ARTICLE 2 116
DISCUSSION ET CONCLUSIONS 171
PERSPECTIVES 188
MATERIELS ET METHODES 191
I. Culture cellulaire 191
A. Culture des fibroblastes humains 191
B. Entretien des parasites 191
C. Purification des parasites 191
II. Biologie moléculaire 192
A. RT-PCR semi quantitative 192
1. Extraction des ARNm 192
2. Synthèse des ADNc par rétro-transcription 193
3. RT-PCR comparative entre les ADNc des tachyzoïtes et bradyzoïtes 193
4. Extraction de l'ADN génomique des parasites tachyzoïtes 194
B. Construction des plasmides pMAH14-TgAMA1-HAFLAG et pMAH14-TgGAP50-HAFLAG 195
1. Amplification des différents ORFs 195
2. Digestion des inserts et du vecteur pMAH14 196
3. Déphosphorylation des plasmides pMAH14 digérés 196
4. Ligation des plasmides pMAH14 préparés avec les inserts 196
5. Transformation des bactéries compétentes Top10F' 196
6. Criblage des colonies par PCR 197
7. Extraction plasmidique et séquençage 197
8. Transfection transitoire des parasites tachyzoïtes *T. gondii* 198

C. Mutagenèse dirigée sur les plasmides pMAH14-TgAMA1-HAFLAG et pMAH14-TgGAP50-HAFLAG 198
D. Clonage des promoteurs endogènes de *TgAMA1* dans les plasmides pMAH14-TgAMA1-HAFLAG sauvage et mutés et de *TgGAP50* dans les plasmides pMAH14-TgGAP50-HAFLAG sauvage et mutés 200
E. Clonage de la cassette de résistance à la bléomycine dans les différents plasmides contenant l'ORF de *TgGAP50* 201
III. Obtention des parasites stables résistant à la phléomycine exprimant les différentes versions sauvage ou mutés de TgGAP50 202
IV. Biochimie 203
A. Double immunofluorescence indirecte sur parasites fixés 203
1. Immunofluorescence sur parasites extracellulaires 203
2. Immunofluorescence sur parasites intracellulaires 203
B. « Cross-linking » des parasites extracellulaires. 204
C. Chromatographie d'affinité sur lectine ConA (Concanavaline A) 204
D. Immunoprécipitation des différentes versions sauvage ou mutés des protéines TgGAP50-HAFLAG, par une colonne d'affinité anti-FLAG 205
E. Traitement aux endoglycosidases PNGaseF et EndoH des lysats parasitaires. 206
F. Séparation des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide. 206
G. Electrotransfert et Immuno-empreinte (« Western Blot »). 207
V. Biologie cellulaire 208
A. Traitement des parasites à la tunicamycine 208
B. Test d'invasion et de prolifération 208
C. Test de « gliding » 208
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 210

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le parasite *Toxoplasma gondii* est responsable d'une antropozoonose cosmopolite très largement répandue dans le monde, la toxoplasmose. Les traitements immunosuppresseurs dans la prise en charge médicale de maladies comme le cancer, le SIDA ou même les greffes, ont conduit à une recrudescence accrue de cette parasitose au cours des dernières décennies. Cette maladie opportuniste majeure est bénigne et généralement asymptomatique, mais peut se révéler fatale en l'absence de traitement, dans le cas où les patients ont un système immunitaire déjà affaibli (cancer, SIDA, greffe). La principale forme clinique de la maladie est la toxoplasmose encéphalique, développée par 20 à 50% des patients et qui est due à une réactivation d'une ancienne infection (Luft et Remington, 1992). La forme congénitale de la maladie, lors d'une primo-infection chez la femme enceinte, reste un risque mortel chez le fœtus au cours du développement. La toxoplasmose oculaire causant des rétinopathies, peut à la fois être conséquente à une toxoplasmose congénitale ou à une réactivation des parasites chez les sidéens principalement. Le diagnostic des différentes formes de toxoplasmose fait intervenir des observations cliniques, l'imagerie et plusieurs types de techniques biologiques : sérologies, cultures cellulaires et biologie moléculaire. Les protocoles de traitement sont différents selon les tableaux cliniques de la maladie, même si les médicaments disponibles sont peu nombreux.

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire unicellulaire, intracellulaire obligatoire, appartenant au phylum des Apicomplexa. Les parasites Apicomplexa sont responsables également du paludisme, causé par *Plasmodium falciparum,* de cryptosporidioses chez l'Homme, causé par *Cryptosporidium parvum*, ainsi que d'autres parasitoses chez l'Homme et le bétail. Ces Eucaryotes unicellulaires sont capables de se protéger contre la réponse immune de leurs hôtes infectés, tout en détournant à leur insu leurs différentes sources de nutriments nécessaires à leur prolifération.

Le cycle hétéroxène de *T. gondii* peut se décomposer en deux parties : la phase sexuée qui se déroule chez un hôte définitif appartenant aux Félidés, et la phase asexuée se développant chez un hôte intermédiaire homéotherme, tel que l'Homme. On retrouve deux formes parasitaires chez les hôtes intermédiaires, tachyzoïtes et bradyzoïtes. La forme tachyzoïte est la forme virulente cytolytique à multiplication rapide, spécifique de la forme aigüe de la maladie. La forme bradyzoïte est la forme dormante du parasite à multiplication lente, résultant de l'enkystement de la forme tachyzoïte dans le cerveau et les muscles sous la pression du système immunitaire de l'hôte infecté. La toxoplasmose encéphalique est le résultat de la re-différenciation de la forme bradyzoïte vers la forme tachyzoïte chez les patients qui ont une défaillance du système immunitaire. La prophylaxie

actuellement en place dans le traitement de cette parasitose ne permet de cibler que la forme tachyzoïte, et traite uniquement la phase aigüe de la maladie. La forme enkystée, résistante aux médicaments utilisés, reste un obstacle majeur à l'élaboration d'un traitement curatif. Ces traitements prophylactiques chez les patients immunodéprimés sont bien souvent mal tolérés et peuvent très souvent provoquer des allergies.

Toxoplasma gondii est capable d'infecter une très large variété de cellules nucléées chez de nombreux hôtes. A la suite d'un contact avec une cellule hôte appropriée, ces parasites peuvent l'envahir en l'espace de quelques secondes, en causant des perturbations minimales quasiment indétectables.

La structure hautement polarisée et compartimentée du parasite en fait un excellent modèle d'étude. *T. gondii* possède les principaux organites communs aux cellules Eucaryotes, mais renferme également des organites spécifiques impliqués dans la motilité, l'invasion de l'hôte, la réplication et le développement intracellulaire.

L'invasion active des cellules hôtes par les tachyzoïtes est le résultat de la combinaison de plusieurs mécanismes propres à la plupart des Apicomplexa. Dans un premier temps, le parasite va se déplacer (« gliding ») jusqu'à la surface d'une cellule hôte. Ensuite, le parasite va reconnaître la cellule hôte grâce à ses propres protéines de surface (SAG, Surface AntiGene). Suite à la sécrétion séquentielle des protéines parasitaires contenues dans les organites apicaux, micronèmes puis rhoptries, le tachyzoïte va former un anneau contractile (jonction mobile) et utiliser son cytosquelette pour pénétrer activement à l'intérieur de la cellule hôte. En entrant dans la cellule, le parasite va s'entourer d'une vacuole dite vacuole parasitophore. Une fois définitivement fermée, la vacuole parasitophore va subir une maturation grâce à la sécrétion des protéines parasitaires contenues dans les granules denses. Cette niche intracellulaire permettra au parasite de se multiplier et de contourner le système de défense de la cellule hôte (lysosome), ainsi que de recruter tous les éléments subcellulaires et nutriments nécessaires à la multiplication rapide des tachyzoïtes. Le mode de division par endodyogénie permet de former deux cellules filles identiques à l'intérieure même de la cellule mère qui reste viable durant la quasi totalité du cycle de division. Le cycle cellulaire et sa régulation chez ce parasite sont largement étudiés, ces études visant principalement à caractériser les facteurs impliqués ainsi que les points de contrôles spécifiques.

L'unique mode de motilité connu à ce jour des parasites tachyzoïtes est appelé « gliding », un mouvement de glissement (Hakansson *et al*., 1999). Il peut être décomposé en trois sous-mouvements qui associés, permettent aux tachyzoïtes de se déplacer à la surface des cellules hôtes, mais également de traverser de part en part certains types cellulaires. Ces trois mouvements sont :

- le glissement circulaire, caractérisé par un mouvement circulaire du parasite sur lui-même dans le sens inverse des aiguilles d'une montre
- le tournoiement, dans lequel le parasite se positionne de manière verticale et tourne sur lui-même dans le sens des aiguilles d'une montre
- la rotation hélicoïdale, qui correspond à l'étape ou le parasite roule sur lui-même.

Mes travaux de thèse de doctorat visent à identifier les *N*-glycoprotéines parasitaires, parmi lesquels se trouvent des facteurs impliqués dans la motilité du parasite. En effet, il existe encore à l'heure actuelle une controverse sur la *N*-glycosylation chez *T. gondii*. Cette modification des protéines avait d'ores et déjà était étudié par le passé sans pour autant démontrer la nature de ces *N*-glycoprotéines (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993). L'un des rôles de la *N*-glycosylation chez les Eucaryotes supérieurs étant d'exporter les *N*-glycoprotéines vers la surface des cellules, les approches initiales ont tenté d'identifier des *N*-glycannes sur les protéines membranaires. Ces études ont conclu que les protéines de surface sont effectivement glycosylées, non pas par ajout de *N*-glycannes, mais grâce à un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Tomavo *et al*., 1989, 1992b, 1993).

Au cours de la thèse, nous avons abordé l'étude de la *N*-glycosylation chez *T. gondii* par la caractérisation globale des *N*-glycoprotéines potentielles, ainsi que de la structure des *N*-glycannes portés par ces protéines. Nous avons démontré l'importance biologique de la *N*-glycosylation dans des mécanismes cellulaires tels que le trafic et les interactions protéines-protéines chez *Toxoplasma gondii*.

GENERALITE

GENERALITES

Toxoplasma gondii et la toxoplasmose

I. Historique

Le parasite *Toxoplasma gondii*, initialement décrit en 1907 par Charles Nicolle à l'Institut Pasteur de Tunis, a été isolé pour la première fois chez le rongeur africain *Ctenodactylus gondii* par Nicolle et Manceaux en 1908. Les premières études pour classer le parasite au sein de l'arbre taxonomique ont décrit *T. gondii* comme *Piroplasma quadrigeminum* (Nicolle, 1907). Cependant, après des observations plus approfondies, Nicolle et Monceaux observèrent des analogies entre *T. gondii* et les Leishmaniae, proposant ainsi le nom de *Leishmania gondii* (Nicolle et Monceaux, 1908). Finalement, en 1909, et après de nombreuses analyses de tissus infectés par microscopie et quelques études expérimentales d'infections, Nicolle et Monceaux proposent de désigner ce genre nouveau au nom de *Toxoplasma* (de τοξον, arc) du rongeur Gondii, donc *Toxoplasma gondii*.

Dans les 50 années suivantes, de nombreux isolats de *T. gondii* ont pu être découvert chez de nombreux autres animaux. Aucune étude sur le mode d'infection du parasite n'avait pu être menée puisque le constat d'une toxoplasmose chez les animaux infectés ne pouvait se faire que post-mortem. Il faut attendre 1948, pour que les premiers cas de toxoplasmose humaine soient diagnostiqués grâce aux travaux d'Albert Sabin et Harry Feldman. L'avènement de la microscopie électronique au début des années 1950 a permis d'établir les premières images de l'ultrastructure du parasite (Gustafson *et al.* 1954) et de décrire les organites apicaux rhoptries et micronèmes. Avant les années 1960, le mode de transmission congénitale chez l'Homme a été décrit lors de l'avortement prématuré. A partir des années 1960, la consommation d'aliments contaminés non cuits a été décrite comme une voie autre importante d'infection par *T. gondii*. A cette époque, près de 80% de la population parisienne est infectée par le parasite, sans pour autant développer de symptômes graves. Au cours de cette décennie, les oocystes présents dans les fèces des chats sont décrits pour la première fois (Hutchison, 1965). Grâce à la découverte du cycle de vie du parasite en 1970 par Frenkel et Hutchison, le chat est déterminé comme réservoir et hôte définitif du parasite *T. gondii.* Ensuite, le cycle sexué dans l'intestin du chat et le cycle asexué chez les hôtes intermédiaires homéothermes ont été décrit pour la première fois (Dubey et Frenkel, 1972 ; Frenkel, 1973).

Depuis ces années, la transmission génétique du parasite a été décrite, ainsi que le mode de défense du système immunitaire de l'hôte (Pfefferkorn *et al.* 1980). Les outils de génétique développés au cours des années 1990 ont permis d'élucider les fonctions biologiques des protéines et de certains organites spécifiques du parasite.

II. Taxonomie du parasite

T. gondii est un micro-organisme eucaryote unicellulaire à parasitisme intracellulaire obligatoire, qui a le chat ou les Félidés comme hôte définitif, et tous les animaux homéothermes comme hôtes intermédiaires. Il appartient au règne des protozoaires, et sa taxonomie est la suivante :

Phylum : Apicomplexa ; Levine 1970

Classe : Sporozoea ; Leukart, 1879

Sous-classe : Coccidia ; Leukart, 1879

Ordre : Eucoccidia ; Léger et Dubosc, 1910

Sous-ordre : Eimeriina ; Léger, 1911

Famille : Sarcocystidae

Genre : *Toxoplasma* ; Nicolle et Manceaux, 1909

Espèce : *gondii* ; Nicolle et Manceaux, 1908

Toxoplasma gondii est le seul représentant actuel du genre *Toxoplasma*.

III. Cycle de vie complexe du parasite

Le cycle de vie du parasite est un cycle hétéroxène court, comportant une phase sexuée se déroulant chez l'hôte définitif uniquement (chat et autres Félidés), et une phase de multiplication asexuée développée chez les hôtes intermédiaires (tous vertébrés homéothermes) ainsi que chez l'hôte définitif (figure 1). Les différents hôtes du parasite sont contaminés en règle générale par ingestion d'aliments ou d'eau souillés par des oocystes. Chez l'Homme, l'infection est très souvent causée par la consommation de viandes crues, et de fruits et légumes non épluchés.

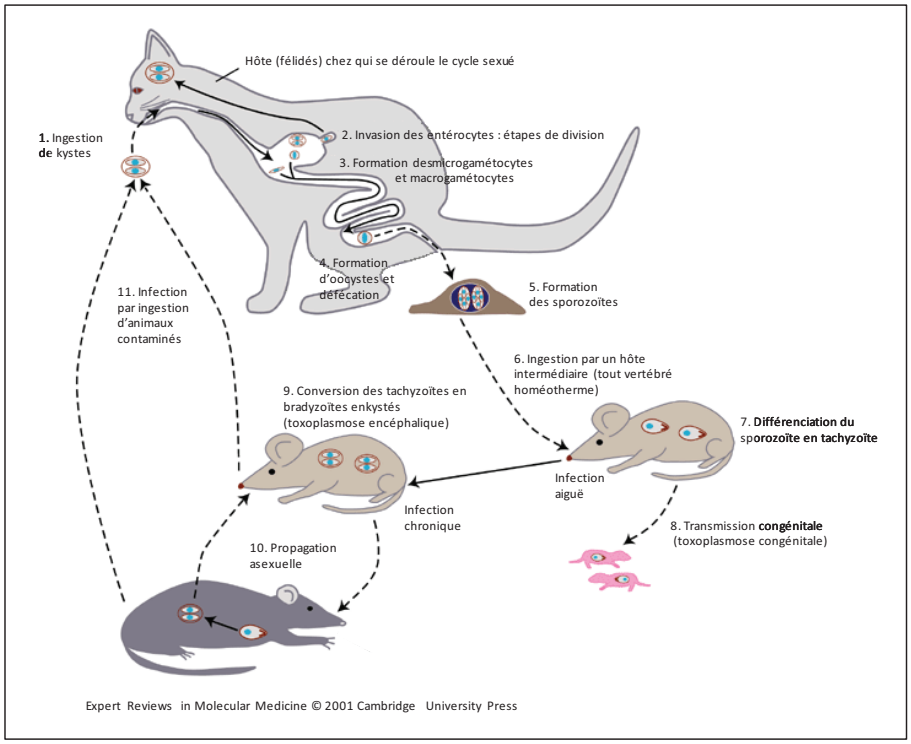


Figure 1 : Le cycle évolutif de *Toxoplasma gondii*. Les flèches pleines indiquent la différenciation parasitaire et les flèches en tiret, le mode de transmission (d'après Frenkel, 1973).

A. La phase sexuée chez l'hôte définitif

Les chats domestiques, mais également la majeure partie des Félidés sont les hôtes définitifs de *Toxoplasma gondii*. Après l'ingestion par le chat de tissus contenant des kystes toxoplasmiques ou d'aliments contaminés par des oocystes, la paroi du kyste ou de l'oocyste est lysée par les enzymes protéolytiques contenues dans l'estomac et le petit intestin. Les bradyzoïtes ou sporozoïtes ainsi libérés vont alors pénétrer les cellules épithéliales du petit intestin et commencer à se multiplier activement par schizogonie. Ce mode de division permet de former des schizontes contenant une grande quantité de matériel cytoplasmique et de noyaux. Après individualisation des mérozoïtes dans les schizontes par fragmentation du cytoplasme, un nouveau cycle d'invasion des cellules épithéliales intestinales peut être initié. Dans certains cas, le parasite peut initier la formation de gamètes, et débuter le cycle sexué, environ deux jours après l'ingestion de kystes ou d'oocystes. Ces mérozoïtes se différencient alors en gamontes mâles et femelles. Les microgamontes mâles vont diviser leur noyau en 10 à 20 noyaux, qui vont alors s'individualiser pour former des microgamètes contenant le matériel nucléaire et deux longs flagelles qui assurent leur motilité. Les macrogamontes femelles différenciées vont alors fusionner avec les microgamètes mâles, et ainsi former les zygotes. Après la fécondation, une paroi va se former autour de l'oocyste immature, qui va ensuite être éliminé avec les fèces du chat. Les chats peuvent éliminer des millions d'oocystes dans leurs fèces en l'espace de quelques jours. Au bout de cinq jours suivant leur libération dans les fèces du chat, les

oocystes vont sporuler pour devenir infectieux. La sporulation est le résultat d'une méiose suivie de deux divisions asexuées, formant ainsi huit sporozoïtes haploïdes infectieux par oocystes sporulés. Ces oocystes peuvent survivre pendant une période allant jusqu'à 18 mois selon les conditions environnementales (Dubey et Frenkel, 1972).

B. La phase asexuée chez les hôtes intermédiaires

Le cycle de vie du parasite chez les hôtes intermédiaires a principalement été étudié chez la souris (Dubey *et al.*, 1997). Suite à l'ingestion d'oocystes sporulés ou de kystes toxoplasmiques, les sporozoïtes ou bradyzoïtes vont être libérés et infecter les entérocytes ainsi que les cellules de l'épithélium intestinale. Ces formes parasitaires se différencient en tachyzoïtes, formes virulentes à multiplication rapide, à l'origine de la phase aigüe de la maladie. Ces tachyzoïtes sont capables de pénétrer toutes les cellules de l'hôte, mais ne peuvent se diviser que dans les cellules nucléées. La division par endodyogénie permet de former deux cellules filles rigoureusement identiques à l'intérieur même de la cellule mère (Vivier et Petitprez, 1969). Les deux cellules filles vont alors sortir de la cellule mère et engager un second cycle de division rapide. Ce sont ces formes parasitaires qui vont se disséminer à travers l'organisme via les appareils circulatoires sanguins et lymphatiques, mais aussi par contamination des cellules de proche en proche (cycle de lyse/infection). L'hôte immunocompétent va très rapidement mettre en place une défense immunitaire qui permettra d'éliminer la majeure partie des formes tachyzoïtes. Toutefois, une faible proportion va réussir à échapper au contrôle du système immunitaire en formant des kystes dans des organes spécifiques, comme le cerveau et les muscles. Aucune information précise n'est encore disponible pour déterminer les raisons pour lesquelles le parasite a choisi ces deux organes pour établir une persistance sous la forme de kystes durant toute la vie de l'hôte infecté. Les bradyzoïtes, formes latentes du parasite, à multiplication lente, contenu dans les kystes toxoplasmique s'entourent d'une paroi kystique. Dans le cas où le système immunitaire de l'hôte est compromis, la pression immune sur les kystes étant amoindrie, les bradyzoïtes vont alors être libérer et se redifférencier en tachyzoïtes, ce qui va induire un nouveau cycle asexué d'invasion et multiplication rapide. La réactivation des kystes est à l'origine de la toxoplasmose encéphalique.

IV. Morphologie des différents stades de T. gondii

Le tachyzoïte désigne la forme virulente asexuée invasive du parasite, qui se multiplie très rapidement à l'intérieur d'une vacuole parasitophore dans les cellules de l'hôte intermédiaire (figure 2A et 2C). C'est une cellule de forme arquée de 6 à 8 µm de longueur et de 2 à 3 µm de largeur. L'extrémité apicale du tachyzoïte est plus effilée que l'extrémité basale et le noyau occupe une position centrale dans le parasite (Fortier et Dubremetz, 1993).

Le bradyzoïte désigne la forme latente asexuée du parasite, qui se multiplie très lentement chez l'hôte intermédiaire (figure 2B). On retrouve les formes bradyzoïtes dans les structures kystiques. La morphologie du bradyzoïte ressemble beaucoup à celle du tachyzoïte mais le noyau est plus excentré vers le pôle basal. Le bradyzoïte est plus effilée et contient beaucoup plus de micronèmes et de grains d'amylopectines, réserve énergétique sous forme de polymères de glucose (Fortier et Dubremetz, 1993).

Le kyste toxoplasmique peut renfermer plusieurs centaines de bradyzoïtes (figure 2C). On retrouve ces kystes à la fois chez l'hôte définitif et chez l'hôte intermédiaire dans le cerveau et les muscles. Le kyste est sphérique et possède une taille qui est comprise entre 5 et 50 µm de diamètre.

Le sporozoïte est une forme infectieuse asexuée issue de la sporulation des oocystes immatures. Cette forme possède une morphologie similaire à celle du tachyzoïte, mais avec un contenu cytoplasmique plus riche en micronèmes. Les rhoptries sont également plus importantes.

L'oocyste non sporulé, qui est le résultat de la fécondation durant le cycle sexué du parasite, est sphérique et mesure de 10 à 12 µm de diamètre. Il est entouré d'une double couche formant une paroi. La forme sporulée de l'oocyste est de forme ellipsoïdale et mesure 11 sur 13 µm de diamètre (figure 2E). L'oocyste sporulé est composé de deux sporocystes, chaque sporocyste contenant quatre sporozoïtes.

Les gamontes sont les seules formes sexuées du parasite. Les microgamontes, ou gamontes mâles immatures se différencient en microgamètes matures qui sont de très petites cellules possédant deux ou trois flagelles. L'extrémité apicale est organisée autour d'un corps basal cytoplasmique. Les macrogamontes femelles sont de plus grosses cellules. Ces formes parasitaires sont retrouvées dans l'intestin du chat

Les mérozoïtes sont de petites cellules ovoïdes issues de la schizogonie d'un bradyzoïte ou d'un sporozoïte dans l'intestin de l'hôte définitif.

Les schizontes sont de grosses cellules possédant de nombreux noyaux qui sont formés par la différenciation des mérozoïtes.

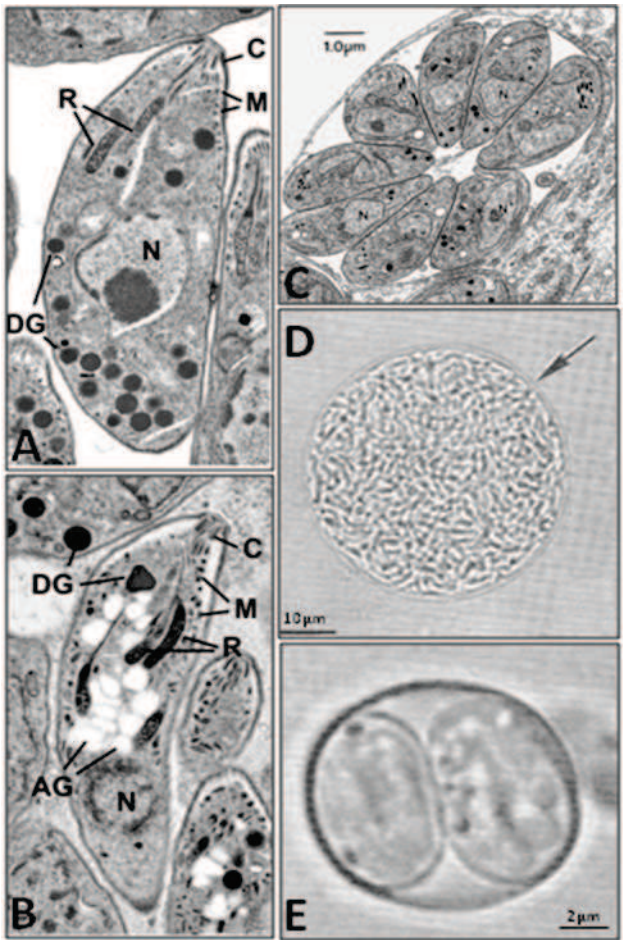


Figure 2A : Ultrastructure d'un tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* (d'après Coppin *et al*., 2003) ; C : conoïde, M : micronème, R : rhoptrie, DG : granule dense, N : noyau.
Figure 2B : Ultrastructure d'un bradyzoïte de *Toxoplasma gondii* (d'après Coppin *et al.,* 2003) ; C : conoïde, M : micronème, R : rhoptrie, DG : granule dense, N : noyau, AG : grain d'amylopectine.
Figure 2C : Vacuole parasitophore contenant huit tachyzoïtes (d'après Shaw *et al*., 2001).
Figure 2D : Kyste toxoplasmique contenant des bradyzoïtes (d'après Dubey, 2007.).
Figure 2E : Oocyste contenant des sporozoïtes (d'après Dubey, 2007).

V. La toxoplasmose

La pathogenèse de la toxoplasmose est liée à l'invasion des tachyzoïtes, à leur prolifération et leur capacité à moduler la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

A. Prévalence

La toxoplasmose est une antropozoonose cosmopolite répandu sur toute la surface du globe. La prévalence de la maladie est liée aux habitudes nutritionnelles (consommation de viandes crues ou insuffisamment cuites, et crudités) et socio-culturelles. En Europe, la séroprévalence est de 54% (80% en France) et touche toutes les populations.

B. Phases de la maladie

La maladie peut se décomposer en deux phases successives. La toxoplasmose aigüe, qui est la première phase de la maladie au cours de laquelle les parasites contenus dans les oocystes ou les kystes vont être libérés dans l'intestin de l'hôte infecté. Ces formes latentes sporozoïtes ou bradyzoïtes vont alors se différencier en tachyzoïtes, qui vont se disséminer partout dans l'organisme de manière active, en traversant les épithéliums, avant de se retrouver dans des organes cibles tels que les muscles, le cœur ou les poumons, ou de manière passive, en détournant les cellules effectrices du système immunitaire de l'hôte, pour ainsi rejoindre des organes moins accessibles, comme le cerveau.

Sous la pression du système immunitaire chez les hôtes immunocompétents, les parasites vont alors se différencier en bradyzoïtes et s'enkyster. Ces kystes toxoplasmiques vont perdurer durant toute la vie de l'hôte principalement dans le cerveau et les muscles, ce qui constitue la phase d'infection chronique à long terme. Les bradyzoïtes contenus dans les kystes sont insensibles aux médicaments traitant la phase aigüe de l'infection (sulfonamide et pyrimethamine), de même le système immunitaire de l'hôte est incapable de s'en débarrasser définitivement.

C. Symptômes

Cette parasitose se révèle dans la plupart des cas bénigne. Ces symptômes ne persistent que quelques jours à quelques semaines avant de disparaitre chez les sujets immunocompétents. Cependant, lorsque le système immunitaire de l'hôte infecté est affaibli, la maladie devient bien souvent létale. En effet, les patients qui ont subi des greffes ou sous traitements immunosuppresseurs pour toutes autres raisons médicales, ainsi que les sidéens, décèdent dans 10% des cas d'une toxoplasmose encéphalique si le diagnostic et le traitement ne sont pas mis en place suffisamment tôt. Les kystes cérébraux vont libérés des bradyzoïtes qui vont se différencier en tachyzoïtes et envahir les cellules du système nerveux central, conduisant à une toxoplasmose encéphalique (figure 3). Le traitement ne permet pas d'éliminer définitivement les kystes cérébraux, c'est pourquoi il perdure généralement durant toute la vie du patient.



Figure 3 : Scanner cérébrale d'un patient atteint d'une toxoplasmose encéphalique, les flèches indiquent les kystes toxoplasmiques (d'après Carruthers, 2001).

D. Risques infectieux

Le risque infectieux provient majoritairement de la présence d'oocystes infectieux dans les sols et les eaux souillés par les déjections des hôtes définitifs. Les oocystes peuvent perdurer dans les sols pendant plus d'un an selon les conditions environnementales. Il a été démontré que la toxoplasmose peut être contracté par contact avec de la terre souillée lors de jardinage, ou de travaux d'agriculture. Ces mêmes oocystes peuvent être véhiculé jusqu'à l'Homme par le biais de chats contaminés. La présence de kystes toxoplasmiques dans les muscles de bétails peut également conduire à une infection, dans les cas ou les viandes sont consommées crues ou pas suffisamment cuites, ainsi que sur les fruits et légumes qui sont consommés crus, non lavés et non épluchés, ou insuffisamment cuits (Kapperud *et al*., 1996).

E. Génotype et pathogénicité

Les trois génotypes (I, II et III) de souche de *T. gondii* permettent de classer les souches parasitaires selon leur virulence (Sibley *et al*, 1991). Quelques études épidémiologiques ont permis de déterminer que les différents génotypes du *T. gondii* sont à l'origine des différentes pathogénicités observées lors de l'infection. Chez la souris, un seul parasite de souche de type I est suffisant pour entrainer la mort de l'animal, tandis que pour les souches de type II et III, la dose létale est bien plus élevée (Boothroyd et Grigg, 2002). Une étude a démontré que chez les patients atteints de toxoplasmose oculaire, on ne retrouve que des souches de type I et III (Vallochi *et al*., 2005). Deux études, dont une en France, ont également permis de déterminer que la toxoplasmose congénitale semble être due à une infection par un parasite de génotype II (Howe *et al*, 1997 ; Ajzenberg *et al*., 2002). D'autres études ont également permis d'établir le génotypage des souches isolées chez différents patients à travers le monde, et de mettre ainsi en place la distribution géographique des génotypes associés aux différents niveaux de pathogénicités.

F. Diagnostic et pathogenèse de la toxoplasmose

L'infection toxoplasmique n'induit pas une immunité permettant d'éradiquer le parasite de l'organisme, mais un état de chronicité lié à la persistance de kystes dans l'organisme. *T. gondii* possède des antigènes ubiquitaires reconnus par des anticorps présents dans l'organisme en dehors de toute infection toxoplasmique (IgM naturelles) et des antigènes propres (membranaires, cytoplasmiques, excrétés, sécrétés) induisant la synthèse d'anticorps spécifiques au cours d'une infection. Le prélèvement de sang veineux est le moyen le plus utilisé pour diagnostiquer la maladie. Les formes les plus graves, existant chez les patients immunodéprimés et chez la femme enceinte qui risque de contaminer son enfant par voie transplacentaire, sont essentiellement les deux types de situations nécessitant un diagnostic sérologique, effectué par recherche et dosage des anticorps spécifiques anti-*T. gondii*.

1. Chez la femme enceinte

Chez toute femme enceinte, le diagnostic sérologique est réalisé en début de grossesse afin de savoir si elle est protégée ou non contre la toxoplasmose. En cas d'absence d'immunité, des précautions doivent être prises pour ne pas contracter la maladie durant la grossesse, et une surveillance sérologique est effectuée tous les mois jusqu'à la fin de la grossesse. En France, et ce malgré les tests prénuptiaux et prénataux obligatoires, on recense encore 700 à 3000 cas de toxoplasmose congénitale.

Les anticorps de type IgG apparaissent juste après les IgM et persistent indéfiniment à un taux assez faible. Actuellement, le diagnostic est basé sur la cinétique des IgG précoces et tardifs. Leur détection à un taux relativement faible et stable après au moins deux prélèvements, sans IgM ou à un taux extrêmement faible, indique une immunité ancienne probable de plus de deux mois.

En cas de séroconversion, un traitement par la spiramycine est immédiatement prescrit en attendant la réalisation d'un diagnostic. Actuellement, le taux de séroconversion chez une femme enceinte non prémunie est de 1 à 2 %.

2. Chez le fœtus et le nouveau né

Le parasite est capable de passer la barrière hémato-placentaire, et peut ainsi se retrouver dans le placenta et plus tard dans le système circulatoire du fœtus. Les risques pour le fœtus sont élevés : hydrocéphalie, retard mental, calcification intracrânienne, choriorétinite, ictère et parfois atteinte de tous les organes. Dans certains cas un avortement tardif ou une mort fœtale *in utero* sont possibles. Mais il peut arriver que chez l'enfant la maladie soit inapparente.

La transmission parasitaire du placenta au fœtus est plus fréquente en fin de grossesse. Dans le cas d'une primo-infection maternelle en cours de grossesse, la contamination fœtale n'est observée que dans 30 à 40% des cas.

La sévérité de l'infection fœtale dépend du nombre et de la virulence des parasites, de l'immaturité immunitaire du fœtus, de l'état du système immunitaire de la mère ainsi que de l'intégrité du placenta (Fricker-Hidalgo *et al*., 1996). Plus *T. gondii* est transmis tard, moins les lésions sont graves. Les enfants doivent toutefois être traités (pyrimethamine, adiazine, acide folinique) car ces formes stationnaires d'infection peuvent se réactiver plusieurs années plus tard.

Une des méthodes de diagnostic de la toxoplasmose congénitale est basée sur l'échographie qui peut révéler une ascite, une augmentation de volume du foie ou une dilatation des ventricules cérébraux. L'examen du liquide amniotique et surtout du sang du cordon permet un diagnostic plus précoce. Après une grossesse marquée par une suspicion de toxoplasmose, différents examens et traitements sont pratiqués chez l'enfant. La surveillance sérologique s'étend généralement jusqu'au premier anniversaire de l'enfant.

3. Chez les patients immunodéprimés

Chez les patients séropositifs immunodéprimés suite à un traitement médicamenteux ou une infection, la toxoplasmose peut se révéler fatale en l'absence de traitement. Des encéphalites liées à une infection toxoplasmique ont été rapportés quelques temps après l'arrivée de l'épidémie de SIDA dans les années 1980. Chez les patients séropositifs pour le VIH, l'avènement de la trithérapie a permis de réduire la mortalité jusque 10 à 20%, et 30% pour les séquelles neurologiques. Les lésions principales sont retrouvées dans le système nerveux central.

La toxoplasmose peut aussi être contractée lors de la greffe d'un organe déjà infecté. Seulement 10% des sujets contractant la toxoplasmose lors de la greffe vont développer la maladie (Gallino *et al*., 1996). Un traitement est alors proposé.

VI. La réponse immunitaire de l'hôte

La toxoplasmose est une des maladies opportunistes chez les patient ayant un défaut en lymphocytes T, suite à une infection immunosuppressive ou à un traitement immunosuppresseur. L'hôte immunocompétent va mettre en place un mécanisme d'immunité innée puis adaptatif pour contrôler cette infection. La réponse immune à médiation cellulaire est la plus importante dans cette parasitose. La forme tachyzoïte nécessite une forte réponse innée très rapide permettant de contrôler l'infection et de limiter la propagation du parasite. De plus, du fait de la formation de kystes renfermant les formes latentes du parasite, le système immunitaire doit mettre en place un

mécanisme de contrôle sur le long terme. De nombreuses études ont permis de déterminer le rôle de l'IL-12 et de l'interféron γ (IFN γ) dans la résistance au parasite.

A. L'immunité innée contre la toxoplasmose

L'infection provoque l'induction de régulateurs intracellulaires de la différenciation Th1 tels que STAT1, STAT4 et l'activation ultérieure de cellules T et de lymphocytes T CD8+ sécrétant de l'IFNγ, manifestant une activité cytolytique contre les cellules infectées (Cai *et al*., 2000 ; Gavrilescu et Denkers, 2003). La production d'IFN γ par les cellules Natural Killer (NK) et les lymphocytes T a un rôle majeur dans les mécanismes de résistance au parasite (Gazzinelli *et al*., 1992 ; Sher *et al*., 1993 ; Hunter *et al*., 1994 ; Fukao *et al*., 2001). Des études ont démontré que les macrophages sont la source principale d'IL-12 durant la toxoplasmose (Gazzinelli *et al*., 1993). La présence seule d'antigènes solubles du parasite permet d'induire la production d'IL-12 par les macrophages (Aliberti *et al*., 2000). D'autres travaux ont déterminé que les polynucléaires neutrophiles déchargent également de l'IL-12 (Bliss *et al*., 1999).

Des études ont mis en évidence une cyclophiline parasitaire, la cyclophiline-18 liant un récepteur à chimiokine CCR5, qui déclenche la production d'IL-12 par les cellules dendritiques. Ces récepteurs CCR5 sont également impliqués dans le recrutement et dans la migration des cellules T CD8+ au site de l'infection (Luangsay *et al,* 2003). L'autre voie de production d'IL-12 implique la reconnaissance de *T. gondii* par les Toll Like Receptors (TLRs). Certaines études ont déterminé que MyD88, un facteur essentiel dans la transduction du signal suite à l'activation des TLRs, et TRAF6, un effecteur en aval de MyD88, sont essentiels chez la souris pour produire l'IL-12 (Scanga *et al*, 2002 ; Mason *et al*., 2004 ; Hitziger *et al,* 2005). L'identification de la profiline comme ligand pour le TLR11 murin, et la sensibilité à la toxoplasmose chez des souris déficientes pour ce récepteur tendent à prouver que ce TLR particulier jouerait un rôle dans l'immunité innée contre la toxoplasmose (Yarovinsky *et al*., 2005). De même, les ancres-GPI sont des ligands d'un complexe formé par l'association du TLR2 et du TLR1 ou TLR6 (Yarovinsky et Sher 2006). Cette association induit la production de la chimiokine CCL2. Il a également été démontré que la virulence de la souche parasitaire influe sur la production du NF-κB, les souches avirulentes ayant la capacité d'activer la production de faible taux de NF-κB (Robben *et al*., 2004). De plus, de nombreuses études ont permis de déterminer que la voie des MAP kinases est la plus utilisée pour la production d'IL-12 en grande quantité (Butcher *et al*., 2001 ; Valere *et al*., 2003 ; Mason *et al*., 2004 ; Kim *et al*., 2005).

D'autres études ont pu établir que les lymphocytes NKs, n'ayant pas de récepteurs antigéniques spécifiques mais étant capable de lyser des cellules infectées, produisent également de l'IFN γ suite à leur stimulation par l'IL-12 (Johnson *et al*., 1992 ; Gazzinelli *et al*., 1993 ; Hunter *et al*.,

1993). D'autres cofacteurs tels que l'IL-1, l'IL-15, l'IL-18, le TNF α et CD28 agissent en synergie avec l'IL-12 pour permettre la production d'IFN γ par les NKs.

L'hôte infecté met aussi en place une défense grâce à la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène, de leucotriènes et d'oxyde nitrique par les macrophages (Murray, 1985 ; Yong *et al*., 1994 ; Gavrilescu et Denkers, 2003) stimulés par l'action de l'IFN γ et du TNF α (Sibley, 1991).

B. L'immunité adaptative contre la toxoplasmose

Au cours de la toxoplasmose, l'hôte va produire des taux élevés d'IgM et d'IgG grâce à la prolifération des lymphocytes B activés lors de la phase innée (Montoya et Liesenfeld, 2004). Ces anticorps sont utilisés pour distinguer la phase aigüe de la phase chronique de la maladie. Comme pour de nombreux pathogènes, la réponse à médiation humorale est caractérisée par un mode d'action « classique » de ces anticorps, opsonisation de parasites extracellulaires suivi de leur phagocytose par les macrophages, ainsi que l'action des molécules du complément conduisant à la lyse des parasites extracellulaires (Sibley *et al*., 1985). En effet, des souris déficientes en lymphocytes B survivent à la phase aigüe de l'infection mais meurent lors de la mise en place de la phase chronique, 3 à 4 semaines après cette infection (Kang *et al*., 2000).

En ce qui concerne les lymphocytes T, les premières données sont apparues dans des études menées chez des patients sidéens, déficients en lymphocytes T CD4+, présentant des symptômes de toxoplasmose encéphalique suite à une réactivation des kystes cérébraux (Israelski *et al*., 1993). Des études menées chez la souris ont déterminé que cette réponse à long terme est dépendante de la production d'IFN γ en grande quantité par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ pour contrôler la réplication des parasites au sein des kystes (Gazzinelli *et al.,* 1992 ; Johnson, 1992 ; Beaman *et al*., 1994). Ces lymphocytes T CD4+ sont activés grâce à l'expression du CMH de classe II présent chez les cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Les macrophages permettent d'activer par le CMH de classe II les premiers lymphocytes T CD4+. Cependant, les cellules dendritiques et les lymphocytes B activés vont migrer jusqu'aux tissus lymphoïdes et activer une grande population de lymphocytes T naïfs. Les macrophages vont rester principalement sur le site de l'infection pour contrôler la prolifération des parasites (Reis e Sousa *et al*., 1997 ; Straw *et al*., 2003). Ces nouveaux lymphocytes T activés vont produire des anticorps mais ils ont également un rôle cytolytique pour les cellules infectées. L'activation de ces cellules T met également en jeu des molécules co-stimulatrices comme le CD28 et ICOS (Inducible COStimulator) qui sont nécessaires à la seconde stimulation des cellules T pour produire de l'IL-12 indispensable à leur prolifération (Villegas *et al*., 1999 et 2002). D'autres cytokines, l'IL-7 et l'IL-15, impliqués dans la croissance des lymphocytes T sont également des facteurs impliqués dans l'immunité à long terme contre la toxoplasmose.

C. Manipulation de la réponse innée par *T. gondii*

Au cours des premières 24 heures post-infection, les macrophages ne produisent pas de TNF α et leur production en IL-12 est nulle bien que la stimulation de ces cellules par la cyclophiline-18 ou les ligands GPI des TLRs ait lieu. Il a été décrit que des cellules infectées par *T. gondii*, contrairement à des cellules non infectées, ne produisent pas de TNF α ni d'IL-12 après une stimulation par le LPS (Butcher et Denkers, 2002), ce qui indique clairement un mécanisme inhibiteur entièrement orchestré par le parasite, et qui semble être dirigé par l'inhibition de la translocation nucléaire de NF-κB dans les cellules infectées.

Après 24 heures, les cellules infectées et les cellules non infectées stimulées par la cyclophiline-18 produisent de l'IL-12 tandis que les macrophages ne produisent pas encore de TNF α, suggérant deux mécanismes d'inhibition différents (Butcher et Denkers, 2002). Cette inhibition de production d'IL-12 serait également conséquente à la production de LXA4 (lipoxine A4) par le parasite au début de l'infection, ce qui permet de diminuer l'expression du récepteur CCR5 à la surface des cellules dendritiques (Aliberti *et al*., 2002). La lipoxine A4 induit également la production d'IL-10 ayant un effet inhibiteur sur la synthèse d'IL-12.

Il semblerait donc qu'au début de l'infection le parasite se protège de la réponse innée du système immunitaire en inhibant les différentes voies de signalisation conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires. Par la suite, *T. gondii* adopte un comportement totalement opposé en levant l'inhibition sur la production d'IL-12. Il a été démontré que le parasite est capable de détourner le système immunitaire de l'hôte grâce à son activité chemokine-like, par la cyclophiline-18, lui permettant de recruter les cellules dendritiques immatures (Diana *et al.*, 2005). De plus, les entérocytes contribuent à la production de chimiokines de l'infection sur le site de l'infection (Luangsay *et al*., 2003). Ces facteurs recrutent des cellules inflammatoires qui produisent également des chimiokines (Bennouna *et al*., 2003 ; Roben *et al*., 2005). Les cellules dendritiques et les monocytes ainsi recrutés sur le site de l'infection sont parasités et vont pouvoir disséminer l'infection vers des organes plus distants comme le cerveau (Courret *et al*., 2006). Le parasite assure ainsi sa survie à long terme dans l'organisme infecté en incitant le système immunitaire à produire des molécules induisant la différenciation en bradyzoïte, lors de la phase adaptative de la réponse immune.

Le parasite inhibe également la translocation nucléaire du facteur de transcription STAT1, empêchant ainsi l'expression des molécules du CMH de classe I et II à la surface des macrophages infectés (Luder *et al*., 1998). TgROP16 est une kinase parasitaire phosphorylant les facteurs de transcription STAT3 et STAT6, inhibant ainsi la production d'IL-12 (Saeij *et al.*, 2007 ; Ong *et al*., 2010). Le parasite est aussi capable d'inhiber l'apoptose des cellules infectées en produisant des molécules ciblant les facteurs pro-apoptotiques produit lors de l'infection. Cette inhibition permet alors de poursuivre son développement intracellulaire (Nash *et al*., 1998).

VII. L'invasion active des cellules hôtes

T. gondii est virtuellement capable d'envahir et de se développer dans tous les types de cellules nucléées d'animaux homéothermes, dont l'Homme. Au sein du phylum Apicomplexa, d'autres parasites tels que *Plasmodium falciparum* et *Eimeria tenella* utilisent le même mode d'invasion que *T. gondii*. Ce mécanisme d'invasion est indépendant de l'endocytose et de la phagocytose induite par la cellule hôte.

Ce mode d'invasion polarisé est entièrement orchestré par le parasite dont le cytosquelette est requis de manière active (Nichols et Chiappino, 1987 ; Dobrowolski et Sibley, 1996 ; Morisaki *et al.,* 1995). Le parasite tire profit de la rigidité de son cytosquelette durant la migration et l'invasion. L'invasion est associée à des forces significatives exercées sur le cytosquelette du parasite. Des études ont récemment permis d'établir le rôle important du cytosquelette d'actine de la cellule hôte dans l'entrée du parasite (Gonzalez *et al*., 2009 ; Sweeney *et al*., 2010), contrairement à ce qui avait été annoncé plusieurs années auparavant (Dobrowolski et Sibley, 1996).

L'invasion est le résultat de la décharge des protéines contenues dans les organites apicaux en trois étapes successives, micronèmes puis rhoptries et enfin granules denses (Carruthers et Sibley, 1997). La décharge de ces protéines au pôle apical du parasite va permettre la formation d'un complexe protéique nécessaire à la formation d'une jonction, nommée jonction mobile, entre les membranes plasmiques du parasite d'une part et de la cellule hôte d'autre part. Ces protéines sécrétées vont également intervenir dans la formation de la vacuole parasitophore. La décharge des organites apicaux est liée à des modifications de la concentration calcique dans le cytoplasme du parasite (Carruthers et Sibley, 1999 ; Lovett *et al*., 2002). Le stimulus de cet influx calcique est probablement généré lors de l'attachement initial des parasites à la surface des cellules hôtes.

L'invasion active du parasite est basée sur la présence d'un complexe moteur actine-myosine permettant la translocation du pôle apical vers le pôle basal, d'adhésines de surface de type TRAP (Thrombospondin-Related Anonymous Protein) sécrétées par les micronèmes lors de l'attachement initial (Opitz et Soldati, 2002). Ce moteur est ancré dans le complexe membranaire interne du parasite (Gaskins *et al*., 2004). Il a été démontré en utilisant des drogues agissant sur la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules, que l'invasion du parasite n'est pas dépendante de cette dynamique microtubulaire mais que les microtubules jouent plutôt un rôle de stabilisation de la structure du parasite durant la motilité parasitaire et l'invasion (Russell et Sinden, 1981). Ce mouvement par glissement est dépendant de la polymérisation des filaments d'actines parasitaires (Dobrowolski et Sibley, 1996, Sibley *et al*., 1998, Poupel et Tardieux, 1999) avec lesquels interagissent les molécules de myosines (Dobrowolski *et al*., 1997a). L'invasion se compose de plusieurs étapes (figure 4) :

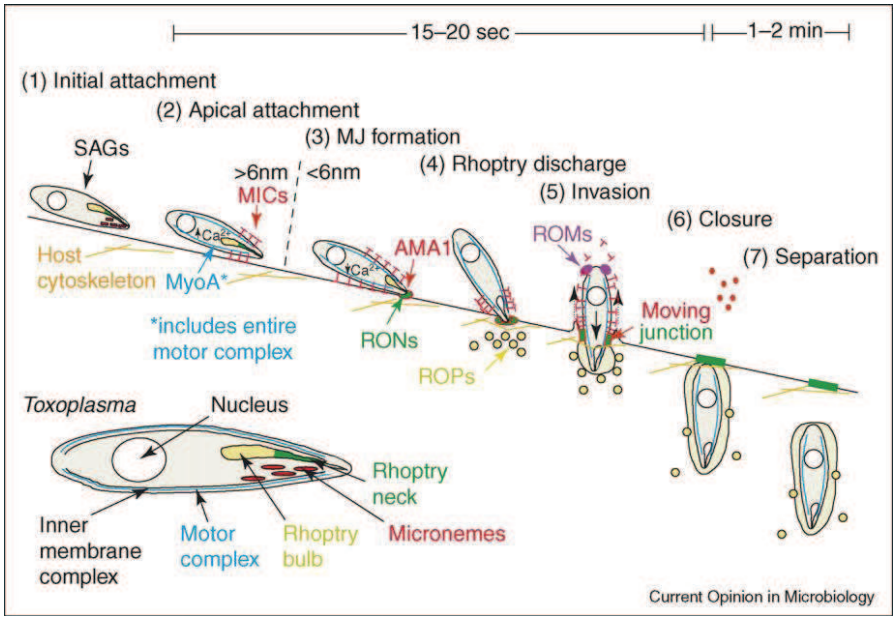


Figure 4 : Schéma récapitulatif des différentes de l'invasion d'un tachyzoïte par *Toxoplasma gondii* (d'après Carruthers et Boothroyd, 2007) ; SAGs : protéines de surface, MyoA : Myosine A, MICs : protéines de micronèmes, RONs : protéines du cou des rhoptries, AMA1 : Apical Membrane Antigen 1, ROPs : protéines du corps des rhoptries, ROMs : protéines rhomboïdes.

✓ **Déplacement des parasites par glissement**

Le parasite se déplace grâce à son système moteur, appelé glidéosome, jusqu'au contact avec la surface d'une cellule hôte.

✓ **Contact initial**

La membrane plasmique du parasite entre en contact avec celle de la cellule hôte (figure 4 étape 1). Cette étape constitue la reconnaissance de la cellule hôte et déclenche à sa suite le reste du processus d'invasion. Les protéines de surface TgSAGs du parasite sont à l'origine de l'attachement initial en liant des protéoglycannes héparanes sulfatés présents à la surface des cellules hôtes (Mineo et Kasper, 1994 ; Ortega-Barria et Boothroyd, 1999 ; Carruthers *et al.*, 2000a ; Dzierszinski *et al.*, 2000).

✓ **Retournement et redressement du parasite**

Le parasite se repositionne et présente son pôle apical à la surface de la cellule hôte, établissant ainsi un contact étroit avec la membrane plasmique de la cellule hôte (figure 4 étape 2). Les protéines de micronèmes et du cou des rhoptries sont alors sécrétées grâce à l'extrusion du conoïde, par fusion avec la membrane plasmique au niveau apical du parasite (Carruthers *et al.*,

1999 ; Soldati *et al*., 2001). Ces protéines permettent d'attacher plus fortement le parasite à la surface de la cellule hôte, grâce à leurs domaines adhésines.

La sécrétion des micronèmes semble être contrôlée par une voie de transduction du signal impliquant le calcium intracellulaire du parasite (Carruthers et Sibley, 1999 ; Carruthers *et al*., 1999). Plusieurs facteurs intervenant dans la décharge des micronèmes ont été identifiés, des protéines kinases dépendantes du calcium (TgCDPK1 à TgCDPK4 ; Kieschnick *et al*., 2001 ; Tzen *et al*., 2007 ; Sugi *et al*., 2010), une protéine sensible au calcium apparenté à la parafusine (TgPRP1, Parafusin-Related Protein 1 ; Coppens et Joiner, 2003 ; Matthiesen *et al*., 2003) et le cholestérol de la cellule hôte. La sécrétion des micronèmes a également été observée chez d'autres parasites Apicomplexa comme *Sarcocystis muris* (Entzeroth *et al*., 1992) *, Eimeria tenella* (Tomley *et al*., 1996) et *Plasmodium berghei* (Spaccapelo *et al*., 1997). La sécrétion des protéines du cou des rhoptries (les TgRONs) a lieu de manière concomitante à celle des micronèmes. Les premières protéines sécrétées par les rhoptries (TgRON2, TgRON4, TgRON5 et TgRON8) vont s'associer à la protéine de micronème (TgAMA1) pour former la jonction mobile (figure 4 étape 3 ; Alexander *et al*., 2005 ; Lebrun *et al*., 2005 ; Straub *et al*., 2009).

- ✓ **Entrée du parasite dans la cellule hôte**

Grâce à la jonction mobile, le parasite entre dans la cellule hôte. Cette étape dure de 5 à 10 secondes. La jonction mobile va coulisser du pôle antérieur vers le pôle postérieur du parasite, permettant au parasite de se glisser à l'intérieur de la cellule hôte (Keeley et Soldati, 2004 ; Sibley, 2004). Ce glissement est conséquent à la translocation des protéines de micronèmes présentes à la surface apicale du parasite, du pôle apical au pôle basal du parasite grâce au moteur moléculaire actine/myosine. La jonction mobile est impliquée dans le tri et la dégradation des protéines de surface de la cellule hôte et du parasite. Cette étape de tri des protéines est également observée chez *Plasmodium falciparum* lors de l'invasion des globules rouges.

En entrant, le parasite s'entoure d'une vacuole parasitophore (figure 4 étapes 4 et 5) dont la membrane est constituée de la membrane plasmique de la cellule hôte (Sus-Tobey *et al*. 1996). Cette vacuole s'agrandit au fur et à mesure que le parasite entre dans la cellule hôte. L'exocytose de la protéine ROP1 marque la formation précoce de la vacuole parasitophore (Carruthers et Sibley, 1997). Certaines protéines ROP (ROP16 par exemple), libérées dans le cytoplasme, auraient un rôle dans la modification de l'activité biologique de la cellule hôte (Saeij *et al.*, 2007).

- ✓ **Fin du processus d'invasion**

Le parasite va dégrader les protéines de micronèmes de la surface au niveau du pôle basal par protéolyse grâce à des protéines telles que TgMPP1, TgMPP2 (Opitz *et al*., 2002) et des protéases de type rhomboïdes TgROM4 et TgROM5 (figure 4 étape 5 ; Brossier *et al*., 2005 ; Dowse *et al*., 2005).

Ce processus représente une étape clef dans l'invasion durant laquelle les complexes entre les récepteurs de la cellule hôte et les adhésines parasitaires sont formés *de novo* et dissociés lorsque le parasite entre dans la cellule hôte et forme la vacuole parasitophore. La vacuole parasitophore va ainsi se fermer pour entourer entièrement le parasite (figure 4 étapes 6 et 7). Les protéines des granules denses (GRAs) sont alors sécrétées et permettent d'établir le réseau membranaire et la maturation de la vacuole parasitophore (Leriche et Dubremetz, 1990 ; Carruthers et Sibley, 1997).

Encore aujourd'hui, aucun lien protéique n'a pu être formellement mis en évidence *in vivo*, chez un parasite Apicomplexa, entre le glidéosome et la jonction mobile. Cependant, les hypothèses précédemment émises découplant ces deux complexes protéiques ne semblent plus être valable. En effet, il a été observé que TgMIC2 semble s'accumuler juste derrière la jonction mobile (Carruthers *et al*., 1999). Probablement qu'une quantité plus importante de MIC2 est requise dans cette zone de contact étroit pour permettre au moteur actine-myosine de fonctionner plus efficacement.

Il n'est pas exclu que d'autres protéines interviennent dans ces interactions entre le glidéosome et la jonction mobile. Cependant, cette interaction ne devrait être mise en place que lors de la phase d'entrée du parasite dans la cellule hôte. Il faudrait donc isoler suffisamment de complexe jonction mobile/appareil moteur à partir de parasite entrant dans des cellules hôtes durant cette courte période, ce qui semble très compliqué à l'heure actuelle mais d'autres outils tels que la génétique inverse pourraient permettre de répondre à cette question.

En plus de TgMIC2/TgM2AP, *T. gondii* possède d'autres complexes constitués de protéines à domaines adhésines contenus dans les micronèmes, impliquées dans l'invasion (Reiss *et al*., 2001 ; Cérède *et al*., 2002). A l'heure actuelle, une seule étude a démontré l'implication d'une autre protéine transmembranaire de micronèmes dans l'invasion, TgMIC6 (Zheng *et al*., 2009).

VIII. La réplication parasitaire et la sortie des parasites

Le mode de division du parasite dans la vacuole parasitophore se fait par endodyogénie. La réplication des parasites est entièrement dépendante de l'assemblage correct du cytosquelette des cellules filles. Ce processus de réplication est différent de la division cellulaire de la plupart des autres cellules Eucaryotes et permet de former *de novo* deux cellules filles identiques, à l'intérieur même du cytoplasme de la cellule mère (figure 5A). Au sein d'une même vacuole, la réplication de plusieurs parasites est synchronisée.

Lors de la génération des cellules filles, la cellule mère reste intacte, correctement polarisée et capable d'accomplir toutes ou une portion significative de ses activités biologiques. Ce mode de réplication n'est pas dépendant de la polymérisation de filaments d'actine et de tubuline (Gavin, 1997), mais se base uniquement sur la polymérisation des microtubules sous-pelliculaires (Shaw *et*

al., 2000). Ces microtubules corticaux servent d'échafaudage à la formation du corps du parasite et jouent un rôle dans l'organellogenèse et la distribution des organites dans les cellules filles (Nishi *et al*., 2008). On observe une duplication de l'appareil de Golgi, de l'apicoplaste, du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie. Les organites et structures spécifiques du parasite sont synthétisés *de novo* dans le corps des cellules filles (figure 5B).

La karyokinèse et la cytokinèse de *T. gondii* sont indépendantes l'une de l'autre (Shaw *et al*., 2001), contrairement aux cellules Eucaryotes. Le cycle complet dure de cinq à six heures selon les souches. A la fin du cycle de division, les parasites filles sortent de la cellule mère (figure 5C), dont les débris cytoplasmiques sont stockés dans le corps résiduel, et entament à leur tour un second cycle de réplication.

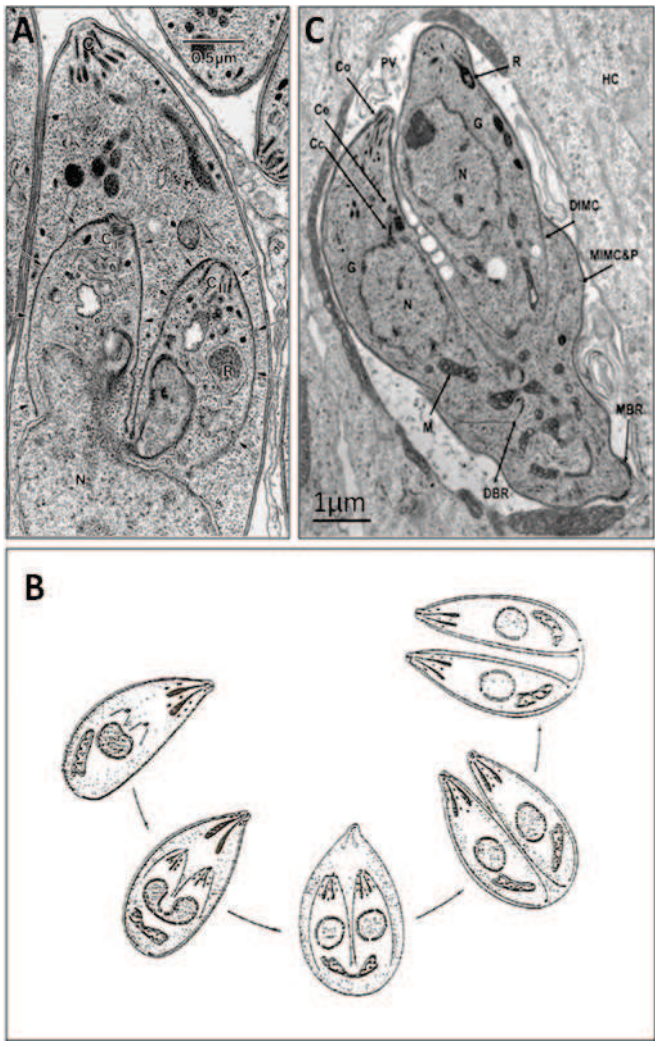


Figure 5A : Formation de deux cellules filles à l'intérieur d'un tachyzoïte par endodyogénie (d'après Shaw *et al*., 2001) ; C : conoïde, R : rhoptrie, N : Noyau. Les flèches indiquent le complexe membranaire interne des cellules filles.

Figure 5B : Endodyogénie chez *Toxoplasma gondii* (d'après Pfefferkorn, 1986).

Figure 5C : Sortie des cellules filles de la cellule mère à la fin du cycle de division (d'après Santos *et al*., 2009) ; Co : conoïde, Ce : centriole ; Cc : centrocone, PV : vacuole parasitophore, R : rhoptrie, G : appareil de Golgi ; N :

noyau, HC : cellule hôte, DIMC : complexe membranaire interne d'une cellules fille, MIMC&P : complexe membranaire interne et membrane plasmique de la cellule mère, M : mitochondrie, DBR : anneau basal d'une cellule fille, MBR : anneau basal de la cellule mère.

Deux à trois jours après l'invasion du tachyzoïte initial, les 64 à 256 parasites formés dans la vacuole parasitophore vont sortir de la cellule hôte et envahir les cellules avoisinantes. La sortie des parasites de cette vacuole est un processus actif, rapide, et asynchrone entre les parasites se développant dans différentes cellules hôtes, au cours duquel la cellule hôte va être lysée (Moudy *et al*., 2001). Le parasite est capable de percevoir l'état physiologique de la cellule hôte et d'en sortir si cet état est défavorable. La sortie naturelle des parasites est précédée par une reprise des mouvements des parasites qui traversent la vacuole parasitophore, le cytoplasme et la membrane plasmique de la cellule hôte. La sortie des parasites semble être liée à des modifications de la concentration calcique et potassique du cytoplasme de la cellule hôte, captées au niveau de la vacuole parasitophore et qui induit une augmentation de la concentration calcique intra-parasitaire (Moudy *et al*., 2001 ; Caldas *et al*., 2007)

Ultrastructure de *Toxoplasma gondii*

Le tachyzoïte de *T. gondii* est une cellule hautement polarisée et très structurée (figure 6). Sa forme caractéristique en arc de cercle est due à un cytosquelette composé de microtubules extrêmement stables soutenant différents éléments associés au réseau de microtubules. Ces structures sont le réseau filamenteux sous-pelliculaire accolé au complexe membranaire interne se trouvant sous la membrane plasmique. La pellicule du parasite englobe le complexe membranaire interne ainsi que la membrane plasmique. L'intégrité structurale et fonctionnelle de cette architecture spécifique est requise lors de l'invasion des cellules hôtes, ainsi que lors de la réplication parasitaire.

Le parasite *T. gondii* possède certains des organites sub-cellulaires communs aux Eucaryotes supérieurs (noyau, réticulum endoplasmique et ribosomes associés, appareil de Golgi et mitochondrie). En plus de ces organites, *T. gondii* partage avec les autres parasites du phylum Apicomplexa, des organites spécifiques (rhoptries, micronèmes, granules denses, apicoplaste).
T. gondii étant un parasite à multiplication asexuée intracellulaire obligatoire, son cycle cellulaire se déroule à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte, dans une vacuole que l'on appelle la vacuole parasitophore (figure 2C).

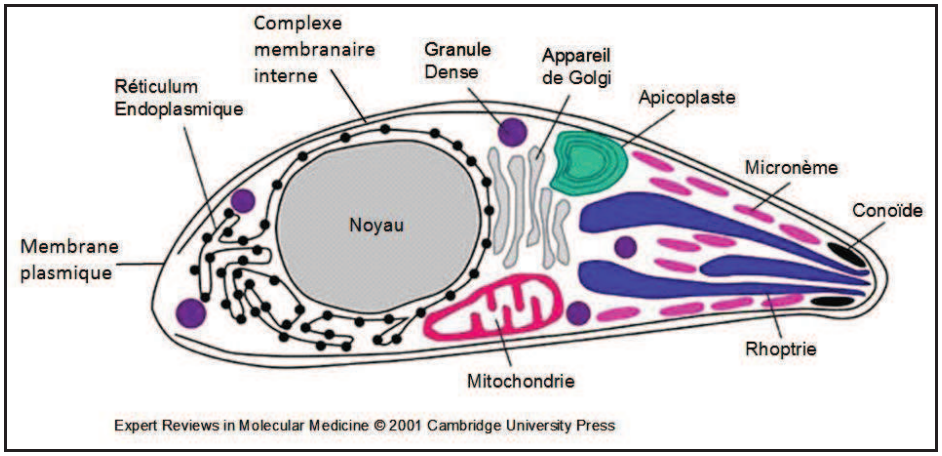


Figure 6 : Schéma de l'ultrastructure du tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* (d'après Molecular Medicine, 2001).

I. Les organites spécifiques des cellules Eucaryotes

Toxoplasma gondii étant un micro-organisme unicellulaire Eucaryote, il possède tous les organites classiques:

- Un noyau sphérique de 1 à 2 µm de diamètre contenant le génome haploïde de 80 Mbs réparti sur 11 chromosomes de taille variant de 2 à 6 Mbs.

- Une mitochondrie unique et ramifiée, parcourant l'ensemble du cytoplasme du parasite.
- Un réticulum endoplasmique entourant le noyau et ramifié au pôle basal.
- Un appareil de Golgi sous forme de trois à quatre saccules superposés, suivi d'un réseau trans-golgien orienté vers le pôle apical.
- De nombreux ribosomes accolés au réticulum endoplasmique.
- Une membrane plasmique constituée d'une bicouche lipidique et contenant de nombreuses protéines membranaires, délimitant la surface du parasite.

II. La pellicule du parasite

T. gondii se déforme de manière drastique durant l'invasion des cellules hôtes, et dans le but de maintenir son intégrité structurale dans ces conditions, *T. gondii* requiert une source de solidité mécanique. Cette stabilité dans la forme du parasite, nécessaire à l'accomplissement des différents processus biologiques comme la motilité, l'invasion et la réplication, est maintenue grâce aux associations entre les différentes structures du cytosquelette parasitaire. Ces structures sont le complexe membranaire interne, le réseau filamenteux sous-pelliculaire et les microtubules sous-pelliculaires.

La pellicule du parasite est composée d'une superposition de trois membranes d'environ 60nm d'épaisseur: une membrane externe, une membrane intermédiaire, et une membrane interne (figure 7 ; Sheffield et Melton, 1968 ; Vivier et Petitprez, 1969). Les différents stades infectieux du parasite sont délimités par cette pellicule (Nichols et Chiappino, 1987). La membrane externe constitue la membrane plasmique parasitaire. Le complexe membranaire interne (CMI) est formé par les membranes intermédiaire et interne qui sont proches et forment des saccules membranaires plats. Le réseau filamenteux sous-pelliculaire adjacent au CMI est composé de plusieurs protéines tels que les TgIMCs (Mann et Beckers, 2001 ; Gubbels *et al.*, 2004, Hu *et al.*, 2006 ; Anderson-White *et al*., 2010) et PhiL1 (Gilk *et al.*, 2006).

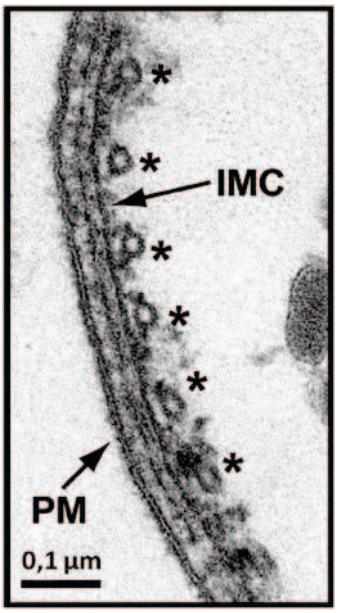


Figure 7 : Fragment isolé de pellicule de *Toxoplasma gondii* (d'après Johnson *et al.*, 2007) ; IMC : Complexe Membranaire interne ; PM : Membrane Plasmique ; les astérisques marquent les microtubules sous-pelliculaires.

A. La membrane plasmique

La membrane plasmique parasitaire est constitué d'une bicouche lipidique classique à laquelle sont associées des protéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) à la fois chez le tachyzoïte et le bradyzoïte (Nagel et Boothroyd, 1989 ; Tomavo *et al.,* 1989). La composition protéique de cette membrane externe est hétérogène, comme la plupart des membranes des organismes Eucaryotes (Foussard *et al.*, 1990). Cette membrane plasmique occupe toute la surface du parasite et recouvre au pôle apical le conoïde, au pôle basal le complexe basal et le long du corps du parasite le complexe membranaire interne.

La caractérisation de nombreuses protéines membranaires à ancre GPI dénommées SAGs (Surface AntiGens) et apparentées SAGs (SRSs, BSRs et SUSAs) indiquent que ces protéines sont impliquées dans l'adhésion initiale du parasite à la surface de la cellule hôte, dans la modulation de la réponse immune, dans la virulence de la souche parasitaire et dans la protection du parasite en milieu extracellulaire (Manger *et al.*, 1998 ; Dzierszinski *et al.*, 2000 ; Lekutis *et al.*, 2001 ; He *et al.*, 2002). La plupart de ces protéines font partie des familles SAG1 ou SAG2 (Boothroyd *et al.,* 1998 ; Manger *et al.,* 1998 ; Dzierszinski *et al.*, 2000 ; Lekutis *et al.,* 2001 ; He *et al.*, 2002). D'autres protéines de surface ont été découvertes par homologie avec la protéine TgSAG1, les SAG-Related Sequence (SRS), dont certaines sont spécifiques du bradyzoïte, TgSRS9 par exemple (Ajioka *et al.,* 1998 ; Manger *et al.,* 1998 ; Jung *et al.*, 2004 ; Kim et Boothroyd, 2005). Une étude plus récente à également découvert un nouveau groupe de protéines de surface hautement polymorphique, les SUSA (SAG-Unrelated Surface Antigen ; Pollard *et al.*, 2008). Des orthologues de certaines de ces

protéines de surface existent chez *Neospora caninum* (Hemphill *et al.,* 1997a et b ; Howe *et al.,* 1998) et les *Sarcocystis* (Mencke *et al.,* 1991 ; Eschenbacher *et al*., 1992). Des études génomiques ont caractérisé des protéines de surface spécifique du bradyzoïte, les BSRs (Bradyzoïte-Specific Recombinant ; Knoll et Boothroyd, 1998). En plus des différences dans la composition protéique de la membrane plasmique dépendant du stade parasitaire, il existe également une variation allélique au sein des protéines SAGs entre les différents génotypes de souches (Howe et Sibley, 1995).

La protéine la plus représentée à la surface du parasite est la protéine TgSAG1 qui est impliquée dans l'attachement initiale du parasite à la surface de la cellule hôte (Mineo et Kasper, 1994). De même, la protéine TgSAG3 est également nécessaire à cet attachement initial (Grimwood et Smith, 1996 ; Dzierzinski *et al*., 2000) et lie spécifiquement les protéoglycannes héparanes sulfates (Jacquet *et al*., 2001).

B. Le complexe membranaire interne

Les saccules du CMI sont organisés en plaques longitudinales qui sont connectées par des sutures et convergent vers l'extrémité postérieure selon un tracé spiralé, constituant un système endomembranaire. Ces vésicules ou alvéoles sont des structures à double membranes situées juste sous la membrane plasmique. Elles constituent un des éléments du squelette membranaire du parasite et jouent un rôle primordial dans la ségrégation des organelles lors de la réplication parasitaire. Les caractéristiques morphologiques du CMI sont communes aux ciliés, aux dinoflagellés et aux apicomplexes, rassemblés sous le groupe taxonomique « Alveolata ». Chez les parasites Apicomplexa, ces saccules membranaires jouent un rôle important dans les processus de réplication, de motilité et d'invasion. En effet, le CMI avec le réseau sous-pelliculaire et les microtubules sous-pelliculaires servent d'échafaudage à la formation du corps des cellules filles lors de la réplication du *T. gondii*.

La forme en saccules plats du CMI permet de visualiser en microscopie électronique deux membranes très proche l'une de l'autre. La membrane externe, située du côté membrane plasmique, est située à une distance relativement fixe de 18,5 nm de la membrane plasmique (Gaskins *et al*., 2004). Au pôle apical du parasite, un trou visible dans le CMI est comblé par la présence du conoïde. Au pôle basal, une ouverture est également présente et elle est comblée par le complexe basal. Un dernier orifice est visible au niveau du micropore, formant une invagination circulaire et latérale de la membrane plasmique et il pourrait être impliqué dans les processus d'endocytose (Nichols *et al.*, 1994). La membrane tournée vers le cytoplasme du parasite est en interaction avec les 22 microtubules sous-pelliculaires par l'intermédiaire du réseau filamenteux sous-pelliculaire et des IMPs. La face du CMI tournée vers la membrane plasmique permet d'ancrer les éléments du système moteur ou glidéosome par le biais de TgGAP50 et TgGAP45 (Gaskins *et al*., 2004).

Chez les Protistes, l'organisation uniforme de protéines associées aux microtubules sous-pelliculaires est liée à la présence d'un réseau de particules intra-membranaires dans la membrane plasmique (les IMPs ou Inner Membrane Particules ; Hogan et Patton, 1976 ; Lefort-Tran *et al*., 1980 ; Murray, 1981). Des études de cryo-fractures chez *T. gondii* ont révélé un arrangement sophistiqué d'IMPs au niveau des membranes du complexe membranaire interne (Morrissette *et al*., 1997 ; Porchet et Torpier, 1977). Ces IMPs sont situées dans la face cytoplasmique des membranes interne et externe du CMI (figure 8). Ces IMPs sont réparties de manière uniforme, structurée et régulière sur toute la longueur du CMI selon un réseau très particulier (Morrissette *et al.*, 1997) formant alternativement des simples et doubles rangées spiralées. Entre chacune de ces doubles rangées spiralées sont retrouvées les simples rangées d'IMPs. La continuité de ces simples et doubles rangés spiralées est conservé entre deux saccules successifs du CMI. Au sein des simples et doubles rangées spiralées, la distance entre chaque IMP est de 32 nm selon l'axe longitudinal du CMI. Les simples rangés d'IMPs seraient en association avec le réseau filamenteux sous-pelliculaire et les doubles rangés de microtubules sous-pelliculaires.

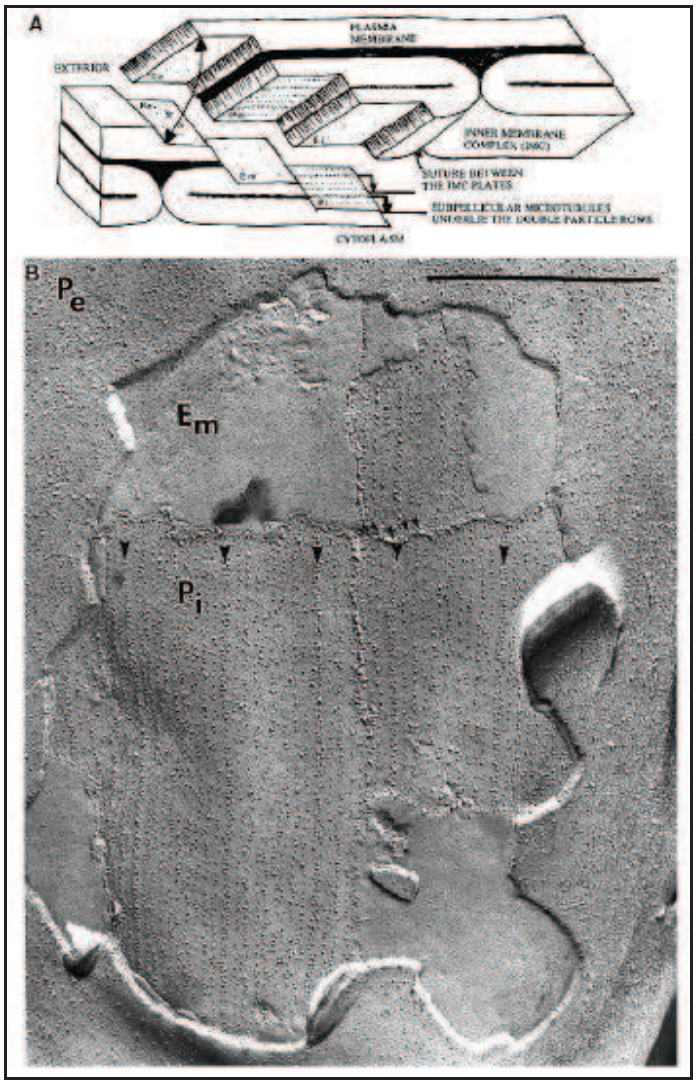


Figure 8 : Cryo-fracture de la pellicule de *Toxoplasma gondii* (d'après Morrissette *et al.*, 1997) ; **A.** Représentation schématique de la localisation des IntraMembranous Particules (IMPs) dans la pellicule de *T. gondii*. **B.** Image de microscopie électronique sur des cryo-fractures de pellicule de *T. gondii* montrant les rangées d'IMPs dans les membranes du complexe membranaire interne. Les flèches larges indiquent les doubles rangées et les flèches étroites indiquent les sutures entre les différents saccules du complexe membranaire interne. Pe : face externe de la membrane plasmique ; Em : face externe du complexe membranaire interne ; Pi : face médiane du complexe membranaire interne. Barre d'échelle 0,5 µm.

Une étude portant sur l'identification de ces IMPs chez *Plasmodium falciparum* a mis en évidence la présence d'une nouvelle famille de protéines possédant six domaines transmembranaires, résidante du CMI (Bullen *et al.*, 2009). Cette famille regroupe deux GAPMs (Glideosome-Associated Protein with Multiple-membrane spans) chez *P. falciparum* et six homologues sont présents dans le génome de *T. gondii* (TgGAPM1a, TgGAPM1b, TgGAPM2a, TgGAPM2b et TgGAPM3). Ces protéines sont très conservées et spécifiques des Apicomplexa. Chez ces deux parasites, les GAPMs sont localisées dans le CMI et forment des complexes oligomériques stables très résistants aux détergents (figure 9). De ce fait, ces protéines transmembranaires pourraient faire partie des simples ou des doubles rangés d'IMPs décrites ci-dessus. Ces protéines semblent interagir avec les protéines du réseau filamenteux sous-pelliculaire.

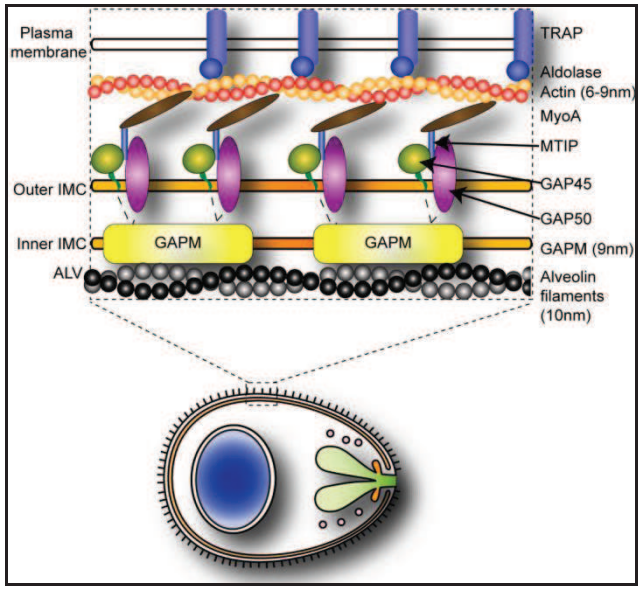


Figure 9 : Schéma représentatif des interactions des protéines GAPM avec le reste du glidéosome chez *P. falciparum* (d'après Bullen *et al.*, 2009) ; TRAP : Thrombospondin-Related Anonymous Protein, MyoA : Myosine A, MTIP : Myosin A-Tail Interacting Protein, GAP : Glideosome Associated Protein, GAPM, Glideosome Associated Protein with Multiple-membrane spans, IMC : complexe membranaire interne, ALV : filaments d'alvéoline.

Trois nouvelles protéines du CMI, les ISPs (Inner membrane complex Sub-compartments Proteins) ont été identifiées (Beck *et al.*, 2010). La compartimentation de ces ISPs est bien délimitée

dans le CMI du parasite. Ainsi, TgISP1 est uniquement localisée dans le compartiment du CMI le plus apical, situé dans la même zone que la coiffe apicale délimitée par l'anneau périphérique de Tgcentrine2 (Hu *et al*., 2006). Dans cette coiffe sont également retrouvées les protéines du cytosquelette TgDLC1 (Hu *et al*., 2006) et TgPhIL1 (Gilk *et al*., 2006). La localisation de TgISP2 et TgISP3 a permis de mettre en évidence la présence de deux nouveaux sous-compartiments du CMI, un compartiment central marqué par la protéine TgISP2 et TgISP3 et un compartiment basal marqué par la protéine TgISP3. L'exclusion de TgISP2 au pôle basal et apical du parasite, ainsi que la localisation exclusive de TgISP1 au pôle apical reflète l'extrême complexité dans l'organisation hiérarchique de la pellicule du parasite. Ces trois protéines ne possèdent pas de domaine transmembranaire mais sont ancrés dans le CMI grâce à deux modifications, la palmitoylation et la N-myristoylation.

III. Le glidéosome et la motilité parasitaire

Le glidéosome est un complexe protéique impliqué dans la motilité et l'invasion parasitaire (Opitz et Soldati, 2002). Ce complexe est composé de plusieurs protéines dont TgGAP50, TgGAP45, TgMLC1 et TgMyoA présentes à un ratio 1 : 1 : 1 : 1 (figure 10 ; Herm-Gotz *et al*., 2002 ; Gaskins *et al*., 2004). De nombreuses études ont décrit les mécanismes moteurs impliquant TgMyoA et la chaine légère TgMLC1. Les protéines TgGAP50 et TgGAP45 sont à l'heure actuelle les deux seules protéines qui ancrent le glidéosome dans la membrane externe du CMI. Le glidéosome permet de faire le lien entre le cytosquelette du parasite (ancrage dans le CMI) et les adhésines de surface par le biais des filaments d'actines et de l'aldolase, une enzyme glycolytique.

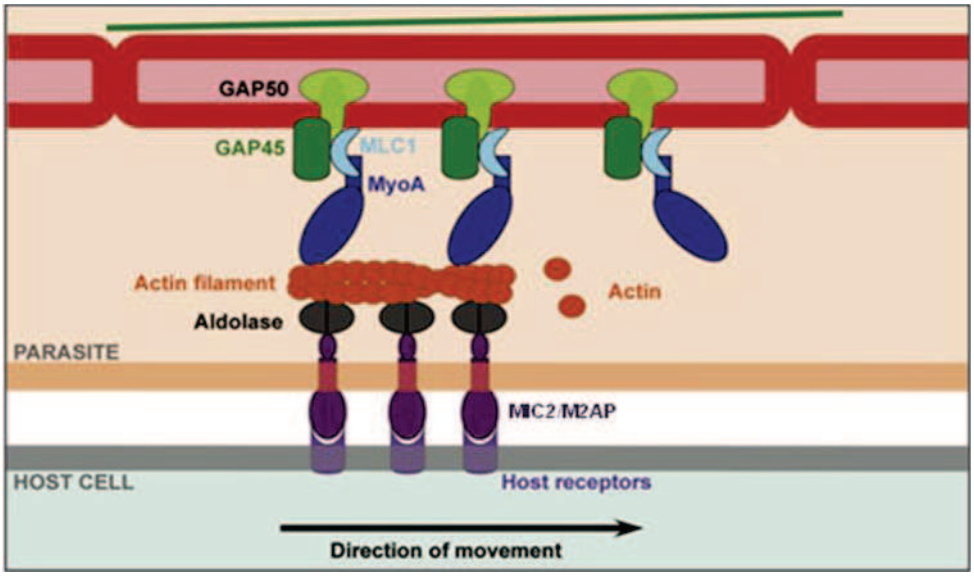


Figure 10 : Le glidéosome de *Toxoplasma gondii*, schéma du système moteur actine-myosine impliqué dans la motilité parasitaire (d'après Frénal et Soldati, 2009) ; GAP50 : Glideosome Associated Protein 50 ; GAP45 : Glideosome Associated Protein 45 ; MLC1 : chaîne légère de la myosine A ; MyoA : myosine A ; MIC2/M2AP :

complexe MIC2 (micronème protéine 2), M2AP (protéine associée à MIC2). Les saccules rouges représentent le complexe membranaire interne et le trait vert au dessus, les microtubules sous-pelliculaires.

Dans un système acellulaire, TgMyoA et TgMLC1 sont capables d'interagir, en revanche ni TgGAP50, ni TgGAP45 sont capables d'interagir avec les autres protéines du glidéosome dans ces conditions, ce qui suggère que ces protéines subissent probablement des modifications spécifiques dans le parasite.

La formation du glidéosome est un processus en deux étapes selon lequel un pré-complexe TgMyoA/TgMLC1/TgGAP45, le proto-glidéosome, est préalablement formé dans l'appareil de Golgi ou le cytoplasme durant la réplication intracellulaire des parasites (Gaskins *et al*., 2004). Par la suite, lors des dernières étapes de l'endodyogénie, les vésicules post-golgiennes pourraient amener également le pré-complexe vers le CMI mature, par le biais de la protéine TgRab11A (figure 11 ; Agop-Nersesian *et al*., 2010). L'association avec d'autres protéines déjà présentes dans la membrane externe du CMI, dont TgGAP50, permettrait d'ancrer le glidéosome dans la pellicule du parasite. De plus, étant donné que le glidéosome est composé de protéines provenant de diverses origines sub-cellulaires (CMI pour TgGAP50; appareil de Golgi et cytoplasme pour le proto-glidéosome, l'aldolase et l'actine; sécrétion des micronèmes pour TgMIC2/TgM2AP), la construction de cette architecture sophistiquée doit probablement être orchestrée et régulée de manière précise. Récemment il a été décrit que l'état de phosphorylation de certains éléments du glidéosome jouerait un rôle lors de l'invasion, notamment au niveau de TgGAP45 et TgALD, et PfMTIP qui est l'homologue de TgMLC1 (Green *et al*., 2008 ; Gilk *et al*., 2009 ; Jones *et al*., 2009 ; Sugi *et al*., 2009).

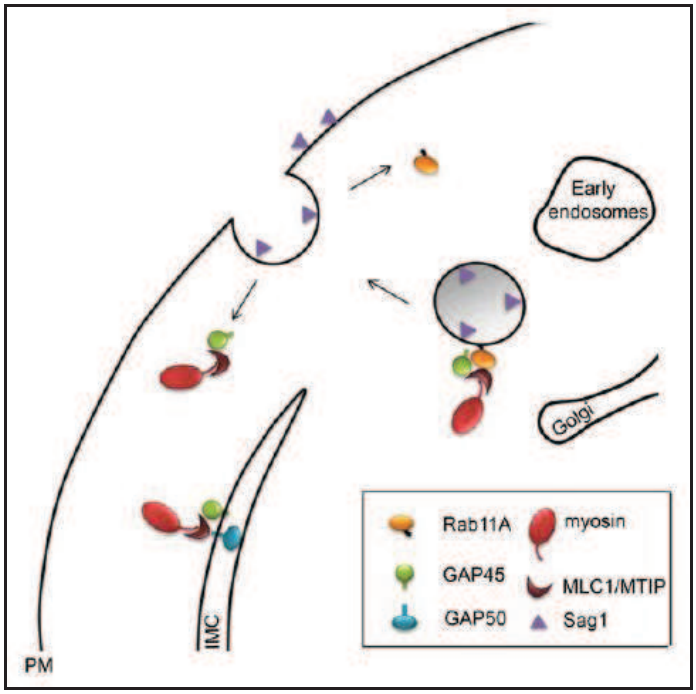


Figure 11 : Transport des composants du proto-glidéosome par Rab11A vers le complexe membranaire interne de *Toxoplasma gondii* lors des dernières étapes de l'endodyogénie (d'après Agop-Nersesian, 2009) ; GAP50 : Glideosome Associated Protein 50 ; GAP45 : Glideosome Associated Protein 45 ; MLC1/MTIP : chaîne légère de la myosine A ; myosin : myosine A ; Sag1 : protéine de surface 1 ; Rab11A : GTPase Rab 11A ; IMC : complexe membranaire interne ; PM : membrane plasmique.

Ces protéines du glidéosome sont restreintes et très conservées chez le phylum Apicomplexa, suggérant qu'elles puissent devenir des cibles utiles pour des inhibiteurs bloquant la locomotion parasitaire. En effet, une équipe a criblé de nombreuses molécules chimiques et a identifié plusieurs petites molécules ayant un effet sur l'invasion sans effet cytotoxique sur la cellule hôte (Carey *et al*., 2004b). Ces inhibiteurs de l'invasion ont révélé différents effets sur la motilité, l'extrusion du conoïde ou la sécrétion des micronèmes. L'étude plus détaillée de chacun de ces inhibiteurs permettrait de découvrir de nouveaux constituants du glidéosome et d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

A. Les composants du glidéosome

1. Glideosome Associated Protein 50

TgGAP50 est une *N*-glycoprotéine transmembranaire qui est ancrée dans le CMI (Gaskins *et al*., 2004 ; Luk *et al*., 2008). Lors de la réplication des parasites, TgGAP50 permet de distinguer le CMI des cellules filles par une colocalisation avec TgIMC1, qui est une protéine localisée dans le réseau filamenteux sous-pelliculaire. TgGAP50, ainsi que TgMLC1 et TgMyoA, sont immunoprécipitées par un anticorps dirigé contre TgGAP45, qui a été localisé en microscopie électronique entre la membrane plasmique et la membrane externe du CMI.

TgGAP50 est immobilisé dans le CMI des parasites matures probablement par la richesse en cholestérol du CMI (Johnson *et al*., 2007). Toutefois, il n'est pas encore établi si TgGAP50 interagit directement avec le cholestérol ou si l'abondance de TgGAP50 permet de former des polymères dans le CMI qui seraient stabilisés par le cholestérol. Des expériences de FRAP ont démontré qu'il n'y a pas de recyclage de cette protéine chez les parasites matures intracellulaires et extracellulaires (Johnson *et al*., 2007). La combinaison de différents traitements par des agents pontants et différentes techniques de lyse n'a pas pu mettre en évidence la participation d'interactions avec des protéines du CMI ou du cytosquelette dans l'ancrage de TgGAP50 dans la membrane du CMI. Néanmoins, chez *P. faciparum* de nouvelles protéines ancrées dans la face cytoplasmique du CMI, les PfGAPMs ont été découvertes (Bullen *et al*., 2009) et des homologues TgGAPMs chez *T. gondii* sont également localisés au niveau du CMI, suggérant que ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'interaction de GAP50 avec les deux membranes du CMI. La partie luminale de TgGAP50 avec des structures *N*-glycanniques pourraient interagir directement ou indirectement avec ces protéines TgGAPMs pour établir un lien supplémentaire entre le glidéosome et le cytosquelette de microtubules.

Les vésicules golgiennes contenant TgGAP50 sont transportées vers le CMI par la GTPase TgRab11B, lors de l'élongation du CMI durant la réplication parasitaire (figure 12 ; Agop-Nersesian *et al.*, 2010). Cependant, aucune interaction entre le domaine carboxy terminal cytoplasmique de TgGAP50 avec cette GTPase n'a été démontré. Les autres protéines du glidéosome entrent en interaction avec TgGAP50 à la fin du processus d'endodyogénie lorsque le proto-glidéosome est transporté du cytoplasme vers la pellicule par TgRab11A (Agop-Nersesian *et al.*, 2009).

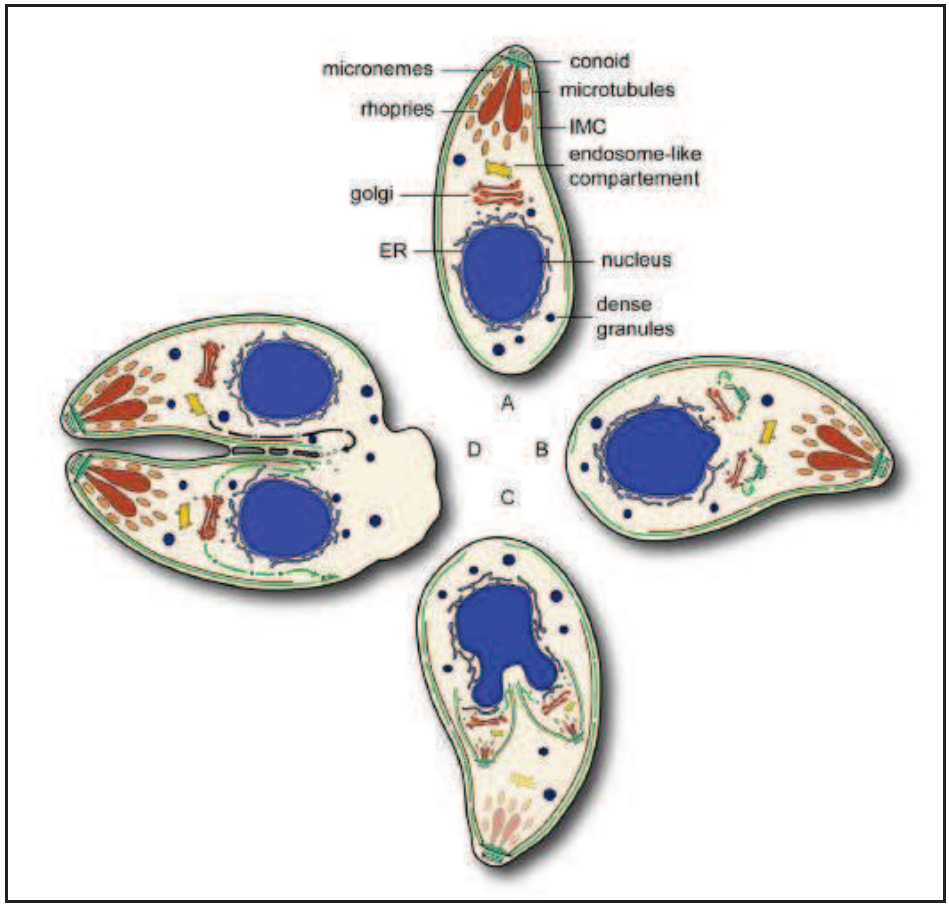


Figure 12 : Transport des vésicules golgiennes par TgRab11B vers le complexe membranaire interne en formation lors de l'endodyogénie de *Toxoplasma gondii* (d'après Agop-Nersesian, 2010) ; ER : réticulum endoplasmique ; IMC : complexe membranaire interne. Les flèches à l'intérieur des parasites dans les stades de division A à D indiquent le transport des vésicules golgiennes vers le CMI en cours d'élongation.

TgGAP50 appartient à la famille des protéines transmembranaires de type 1. Le segment transmembranaire de TgGAP50 est situé six acides aminés en amont de l'extrémité carboxy terminale. Ce court domaine carboxy terminal est tourné vers le cytoplasme, dans l'espace situé entre la membrane externe du CMI et la membrane plasmique, et permet d'interagir avec les composants du glidéosome (Gaskins *et al.*, 2004). En effet, la délétion des six acides aminés du domaine carboxy terminal empêche les interactions de TgGAP50 avec les autres composants du glidéosome, qui sont localisés dans la partie cytoplasmique de la pellicule. Malgré cela, aucune

donnée ne permet de déterminer si le domaine cytoplasmique de TgGAP50 interagit directement ou indirectement avec un ou plusieurs composants du glidéosome.

TgGAP50 possède des orthologues chez de nombreux autres parasites Apicomplexa comme *Neospora caninum*, *Eimeria tenella* et des *Plasmodiae*. Ces orthologues sont très conservés (41 à 58% d'identité ; Gaskins *et al*., 2004) à l'exception du domaine amino terminal au niveau du signal peptidique. Le domaine luminal de TgGAP50 possède également une homologie significative avec de nombreuses phosphatases acides des plantes et des animaux (22 à 26% ; Gaskins *et al*., 2004), même si les acides aminés importants pour l'activité catalytique de ces phosphatases ne sont pas conservés chez *T. gondii* et les autres Apicomplexa. Cependant, les orthologues de TgGAP50 possèdent une extension de 50 acides aminés environ dans la partie carboxy terminale qui contient le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique. Ce domaine transmembranaire est très conservé chez les coccidies, ce qui suggère que la fonction de TgGAP50 est conservée chez les autres parasites Apicomplexa. Chez *P. falciparum*, PfSAP, l'homologue de TgGAP50, possède une activité de type phosphatase, et intervient également dans le mécanisme d'acquisition de nutriments (Müller *et al*., 2010). Cependant, cette activité enzymatique n'a jamais été caractérisée chez *T. gondii*.

TgGAP50 possède un signal peptidique de 51 acides aminés et trois sites putatifs de *N*-glycosylation. Le nombre et la structure des *N*-glycannes portés par cette protéine ont été déterminés empiriquement en utilisant des endoglycosidases comme la PNGaseF et l'endoH (Gaskins *et al*., 2004). Les profils de digestions combinés de ces deux enzymes ont permis de définir que les *N*-glycannes de TgGAP50 sont de types riches en mannose et que chacun des sites semble être occupé.

2. Glideosome Associated Protein 45

TgGAP45 permet comme TgGAP50 d'ancrer le glidéosome dans la membrane externe du CMI (Gaskins *et al*., 2004). Cependant, TgGAP45 ne possède aucun domaine transmembranaire, mais elle renferme deux sites potentiels d'acylation dans la partie amino terminale, un site de N-myristoylation et un site de palmitoylation. Chacun de ces sites est occupé par des groupements acylés chez les mérozoïtes de *P. falciparum* (Rees-Channer *et al*., 2006). Cette double acylation participe probablement à l'ancrage du glidéosome dans la membrane externe du CMI. TgGAP45 possède de nombreux acides aminés qui sont phosphorylés. Plus particulièrement, la déphosphorylation des acides aminés S^{163} et S^{167} de TgGAP45 est nécessaire à l'association du proto-glidéosome à TgGAP50 (Gilk *et al*., 2009). *In vitro,* la phosphorylation est réalisée par une kinase, TgCDPK3 (Sugi *et al*., 2009). TgGAP45 est capable d'immunoprécipiter le complexe protéique comprenant TgGAP50, TgMyoA et TgMLC1 en condition de lyse douce.

TgGAP45 possède également des orthologues chez *N. caninum*, *P. falciparum*, *P. yoelii* et *C. parvum* et probablement d'autres Apicomplexa. En revanche, aucune homologie significative avec d'autres protéines eucaryotes n'a été trouvée. TgGAP45 présente un haut degré d'homologie de

séquence dans la partie carboxy terminale au sein du phylum. Il existe de forte probabilité que TgGAP45 et ses orthologues forment des structures en faisceau d'hélice (« coiled-coil »). La fonction de TgGAP45 semble ainsi conservée au sein du phylum. Des images de microscopie électronique ont montré que TgGAP45 est localisée exclusivement au niveau de la membrane externe du CMI. (Gaskins *et al*., 2004).

3. Myosin Light Chain 1

TgMLC1 est une petite protéine du glidéosome ressemblant aux calmodulines. TgMLC1 se lie à TgMyoA et aucune liaison directe ou indirecte avec TgGAP50 et/ou TgGAP45 n'a été décrite jusqu'à présent (Herm-Gotz *et al*., 2002). Chez les Eucaryotes, les chaines légères des myosines jouent un rôle majeur dans le contrôle des activités ATPasiques et de la stabilité des myosines (Trybus, 1994). Ces effets sont régulés par la fixation de calcium ou l'état de phosphorylation des chaines légères (Kamm et Stull, 2001). TgMLC1 possède un homologue chez *P. falciparum*, PfMTIP (Myosin A-Tail Interacting Protein), qui est phosphorylé (Bergman *et al*., 2003 ; Green *et al*., 2008).

La partie amino terminale de TgMLC1 est importante pour la localisation dans la pellicule du parasite (Heaslip *et al*., 2010). Il semble exister une modification post-traductionnelle d'origine inconnue porté par un des acides aminés contenus dans la séquence V_{46}GEYDGACESPSCR$_{59}$ de TgMLC1. Cette modification est inhibée par la drogue tachyplegine A qui inhibe également la motilité et l'invasion (Carey *et al*., 2004b ; Heaslip *et al*., 2010). TgMLC1 et ses homologues chez les Apicomplexa possèdent une extension dans la partie amino terminale de 70 à 82 acides aminés, qui n'est pas retrouvée dans les chaines légères de myosines des autres Eucaryotes. Cependant, chez *P. falciparum*, ce domaine ne semble pas intervenir dans la liaison avec la myosine A (Bosch *et al*., 2007b). La plupart des chaines légères de myosine contiennent une région riche en lysine dans leur domaine amino terminal qui interagit avec l'extrémité carboxy terminale de l'actine (Andreev *et al*., 1999), ce qui sert à moduler l'activité motrice des myosines. TgMLC1 contient trois lysines près de l'extrémité amino terminale qui pourrait également jouer la même fonction.

4. Myosine A

Les myosines forment une super-famille de protéines qui sont des moteurs moléculaires dépendant de l'actine (Sellers, 2000). Les chaines lourdes des myosines sont constituées de trois domaines distincts, la tête, le cou et la queue. Elles sont répertoriées en 18 classes selon une phylogénie basée sur la comparaison de leur domaine « tête » conservé. La myosine A des Apicomplexa fait partie de la sous-classe XIVa des myosines (Lew *et al*., 2002). Cette famille de myosine est non conventionnelle et est limitée au phylum des Apicomplexa (Heintzelman et Schwartzman, 1997). Elle a été décrite initialement chez *T. gondii* et *P. falciparum* (Pinder *et al*., 1998).

Le motif IQ présent dans toutes les myosines est situé dans la partie carboxy terminale de la protéine et est associé à la protéine TgMLC1 (Herm-Gotz *et al*., 2002). TgMyoA est localisée entre la membrane plasmique et la membrane externe du CMI. Les premières études chez *T. gondii* ont démontré que cette myosine est associée à la membrane plasmique (Hettmann *et al.*, 2000 ; Herm-Gotz *et al*., 2002). Cependant, une autre étude a déterminé que chez *T. gondii* cette protéine est associée à la membrane externe du CMI, par TgGAP50 et TgGAP45, comme chez *Plasmodium yoelii* (Bergman *et al.*, 2003 ; Gaskins *et al*., 2004). TgMyoA est essentielle dans les processus de motilité, d'invasion et de virulence (Meissner *et al*., 2002b).

TgMyoA ne suit pas la règle « TEDS » (Thr, Glu, Asp, Ser), selon laquelle les acides aminés situés 16 résidus en amont du motif conservé DALAK doivent être des acides aminés chargés négativement (Glu, Asp) ou des acides aminés pouvant être phosphoryler (Ser, Thr) (Bement et Mooseker, 1995 ; Heintzelman et Schwartzman, 1997 ; Hettmann *et al*., 2000). Malgré l'absence de ces séquences chez *T. gondii*, TgMyoA possède une activité ATPase et des propriétés biophysiques et biochimiques qui, théoriquement, sont compatibles avec la vitesse de déplacement du parasite, de l'ordre de 3 à 5 $\mu m.s^{-1}$. Ces expériences de cinétique ont également déterminé que TgMyoA est un moteur rapide, avançant par pas de 5,3 nm à une vitesse de 5,2 $\mu m.s^{-1}$ sur les filaments d'actine (Herm-Gotz *et al*., 2002).

B. Les autres composants de l'appareil moteur

Le glidéosome permet au parasite de se mouvoir grâce à la polymérisation de courts filaments d'actines qui sont associés à l'aldolase, elle-même associée au domaine cytoplasmique de l'adhésine de surface, TgMIC2. La dynamique du cytosquelette d'actine au niveau de la pellicule du parasite est un phénomène très important dans la motilité parasitaire.

1. Actine

L'actine est une protéine qui peut se retrouver sous deux formes principales, la forme globulaire monomérique (G-actine) et la forme filamenteuse polymérique (F-actine). Contrairement aux Eucaryotes supérieurs, la majeure partie (>97%) de l'actine de *T. gondii* se trouve sous forme globulaire, non polymérisée (Dobrowolski *et al*., 1997b). L'actine de *T. gondii* est homologue à celle des autres Eucaryotes.

Les filaments d'actines dans la pellicule sont présents uniquement lors de la mise en marche de l'appareil moteur suite à l'augmentation de la concentration calcique intra-parasitaire (Pezzella-D'Alessandro *et al*., 2001 ; Wetzel *et al*., 2003). Ces filaments sont très courts (0,2 à 1 µm) et leur diamètre correspond à celui des filaments des cellules Eucaryotes supérieures (8 à 9 nm). Ces filaments sont également perturbés suite à un traitement à la cytochalasine D (Wetzel *et al*., 2003).

Lors de la motilité, les filaments d'actines servent de support au moteur de TgMyoA pour propulser le parasite vers l'avant.

L'importance de la dynamique de polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actines durant la motilité a été mise en évidence grâce à des traitements avec une drogue agissant sur la polymérisation de l'actine, la jasplakinolide (JAS). A forte dose (1 à 2 µM), cette drogue inhibe la motilité et l'invasion (Poupel et Tardieux, 1999). Cependant, en utilisant des doses plus faibles (0,031 à 0,125 µM), les parasites semblent se déplacer plus vite mais leur mouvement est perturbé par de brusques changements de direction et l'invasion est moins inhibée (Wetzel *et al*., 2003).

Les Apicomplexa sont dépourvus des gènes régulant la polymérisation de l'actine, notamment le complexe ARP2/3 (Actin-Related Protein 2/3) qui permet la nucléation des filaments d'actines chez les plantes, les champignons, les amibes et les animaux (Higgs et Pollard, 2001 ; Pollard, 2007). En revanche, plusieurs études ont décrit la présence d'autres protéines impliquées dans la nucléation, la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actines qui semblent suffisantes pour assurer la dynamique des filaments d'actines. Ce sont les formines (Baum *et al*., 2008, Daher *et al*., 2010), la profiline (Kursula *et al*., 2008), la toxofiline (Poupel *et al*., 2000 ; Lodoen *et al.,* 2010), : ; Allen *et al*., 1997 ; Mehta et Sibley, 2010), les protéines de coiffe et la coronine (Tardieux *et al*., 1998 ; Soldati et Meissner, 2004).

2. Aldolase

L'aldolase est une enzyme glycolytique homotétramèrique qui catalyse le clivage du fructose1,6-bisphosphate en glycéraldhéyde-3-phosphate et dihydroxyacétone phosphate (Penhoet *et al*., 1967). Cette enzyme est capable de lier les filaments d'actines dans les cellules musculaires de lapin par des liaisons d'acides aminés basiques situés autour du site catalytique (Wang *et al*., 1996). Chez *T. gondii*, cette protéine est capable de lier des filaments d'actines et également d'interagir avec le domaine cytoplasmique de TgMIC2 (Buscaglia *et al.,* 2003 ; Jewett et Sibley, 2003 ; Starnes *et al.*, 2006 ; Heiss *et al*., 2008). Le produit et les substrats de la réaction catalysée par l'aldolase sont capables d'interférer dans les interactions entre l'aldolase et TgMIC2 et les filaments d'actines (Buscaglia *et al*., 2003 ; Jewett et Sibley, 2003). De plus, il semble que le site de liaison de l'aldolase à TgMIC2 soit confondu avec le site catalytique de cette enzyme (Bosch *et al*., 2007a, Starnes *et al*., 2009). Cependant, la mutation de deux des acides aminés ($K^{41}E$ et $R^{42}G$) situés sur les bords du site catalytique, n'affecte pas l'activité catalytique de l'enzyme mais perturbe sévèrement l'invasion des cellules hôtes (Starnes *et al*., 2009). Toutes ces données permettent de déterminer que les sites de liaisons de l'aldolase avec les filaments d'actine et le domaine cytoplasmique de TgMIC2, sont situés dans la même région, le site catalytique de l'enzyme.

La délétion conditionnelle du gène *Tgald1* conduit à des défauts conséquents dans la motilité, l'invasion et la croissance (Starnes *et al*., 2009). Récemment des interactions directes entre

l'aldolase et les domaines cytoplasmiques de TgMIC6, TgMIC12 et TgAMA1 ont été démontré (Zheng *et al*., 2009 ; Sheiner *et al*., 2010) même si le site de liaison de TgMIC2 à l'aldolase est peu conservé dans ces protéines.

Ayant un rôle dans la glycolyse, l'aldolase est retrouvé dans le cytoplasme chez les parasites intracellulaires (Jewett et Sibley, 2003). En revanche, chez les parasites extracellulaires on observe une concentration de la protéine au pôle apical du parasite, ce qui est en accord avec les résultats publiés chez *P. falciparum* (Buscaglia *et al*., 2003 ; Starnes *et al*., 2009). Cependant, dans une autre étude, l'aldolase n'apparait pas plus concentrée au niveau de la pellicule de cette zone antérieure des parasites extracellulaires, mais plutôt tout le long de la pellicule (Pomel *et al*., 2008).

Récemment, il a été démontré que l'aldolase de *T. gondii* est phosphorylée *in vitro* par TgCDPK3 et ces deux protéines interagissent directement lorsqu'elles sont exprimées dans des cellules de mammifères (Sugi *et al*., 2009). L'aldolase et TgCDPK3 sont relocalisées du cytoplasme vers la périphérie du parasite (apicale pour TgCDPK3) lorsque le parasite sort de la cellule hôte, ce qui suggère que l'état de phosphorylation de l'aldolase modifierait son rôle dans le parasite, passant d'une enzyme glycolytique à une protéine permettant de relier la surface de la cellule hôte au moteur moléculaire du parasite (Pomel *et al*., 2008 ; Sugi *et al*., 2009).

3. MIC2-M2AP

Les premières études qui ont décrit les rôles des adhésines de surface contenues dans les micronèmes, dans la motilité et l'invasion, ont été mené chez *P. faciparum* (Sultan *et al*., 1997 ; Bergman *et al*., 2003). Ces études ont défini un rôle décisif pour la protéine de micronème TRAP (Thrombospondine-Related Anonymous Protein) dans la motilité des sporozoïtes *in vitro* et dans l'infection des glandes salivaires et du foie des rats *in vivo*. Chez *T. gondii*, l'homologue de TRAP est TgMIC2, et son rôle est identique. TRAP et TgMIC2 possède des homologues chez d'autres Apicomplexa (Huynh *et al*., 2003). Le complexe TgMIC2/TgM2AP est assemblé dans l'appareil de Golgi avant d'être exporté vers les micronèmes (Jewett et Sibley, 2003). Après la sécrétion des micronèmes lors de l'invasion, le complexe TgMIC2/TgM2AP est ancré dans la membrane du parasite grâce au domaine transmembranaire de TgMIC2. Cet hétéro-hexamère de 450 kDa contient trois sous-complexes TgMIC2/TgM2AP dont les interactions sont maintenues par TgMIC2 (Jewett et Sibley, 2004). La sécrétion à un niveau basal de ce complexe permettrait au parasite de produire un premier mouvement du « gliding », le glissement circulaire, et la sécrétion des micronèmes suite à un influx calcique permettrait d'établir les deux autres mouvements, le glissement hélicoïdal et le tournoiement (Huynh et Carruthers, 2006).

Les motifs adhésines de TgMIC2 sont impliqués dans les interactions avec des récepteurs de la cellule hôte *in vitro* (Harper *et al*., 2004 ; Barragan *et al*., 2005). Chez *P. falciparum*, la protéine TRAP interagit avec les glycoaminoglycannes et la protéine TgMIC2 recombinante interagit avec

l'héparine (McCormick *et al*., 1999 ; Ménard, 2001 ; Harper *et al*., 2004). Le signal d'adressage vers les micronèmes, le court domaine cytoplasmique et le domaine transmembranaire de TgMIC2 se situent dans la partie carboxy terminale de la protéine (Wan *et al*., 1997). TgMIC2 interagit avec l'aldolase par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique qui joue un rôle important pour la motilité et l'invasion (Kappe *et al*., 1999 ; Buscaglia *et al*., 2003 ; Jewett et Sibley, 2003). Un résidu de tryptophane (W^{767}) entouré d'acides aminés acides situés dans le domaine cytoplasmique, très conservé chez les autres homologues, est essentiel pour l'interaction avec l'aldolase (Buscaglia *et al*., 2003 ; Starnes *et al*., 2006 ; Bosch *et al*., 2007a).

TgM2AP, qui est une protéine soluble dont le domaine β interagit avec TgMIC2, contient un pro-peptide dont le clivage est nécessaire à l'adressage du complexe vers les micronèmes (Rabenau *et al*., 2001). L'absence de TgM2AP chez *T. gondii* conduit à une rétention de TgMIC2 dans la région du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi et à une diminution significative de la motilité et de l'invasion (Rabenau *et al*., 2001 ; Huynh *et al*., 2003). TgM2AP intervient dans le transport du complexe TgMIC2/TgM2AP vers les micronèmes puis dans la sécrétion du complexe lors de la décharge des micronèmes.

Le complexe d'adhésion qui subit une translocation vers la surface du pôle basal est ensuite clivé par protéolyse. Les protéines TgMPP1 et TgMPP2 (Micronemal Protein Protease 1) interviennent dans le clivage du domaine transmembranaire de TgMIC2 lors de l'invasion (Carruthers *et al.*, 2000b ; Opitz *et al*., 2002 ; Howell *et al.,* 2005). Ces protéines présentent des homologies avec les protéases rhomboïdes, localisées au niveau des membranes plasmiques, capables de cliver leur substrat à l'intérieur du domaine transmembranaire. *T. gondii* possède cinq gènes codant pour des protéines rhomboïdes (TgROM1 à TgROM5, ROM pour RhOMboïde, Brossier *et al*., 2005). TgROM4 et TgROM5 sont localisés au niveau de la membrane plasmique du parasite (Brossier *et al*., 2005 ; Dowse *et al*., 2005). TgROM4 clive TgMIC2 à l'intérieur du domaine transmembranaire et TgROM5 est nécessaire au clivage final de toutes les adhésines de surface à la fin du processus d'invasion (Buguliskis *et al.*, 2010). La subtilisine TgSUB1, présente dans les micronèmes, est aussi impliquée dans le clivage du complexe TgMIC2/TgM2AP ancré à la surface du parasite (Lagal *et al.,* 2010). L'ensemble de ces processus d'insertion membranaire de complexe d'adhésine et de clivage contribue à établir un gradient antéropostérieur d'adhésines nécessaire à l'orientation du parasite lors de l'invasion.

C. La motilité parasitaire

En l'absence de pseudopodes, de cils ou de flagelles, les stades infectieux des parasites Apicomplexa ont développé un système de locomotion dépendant d'un substrat extra-parasitaire (figure 13). L'unique mécanisme de motilité par glissement du *T. gondii*, ou « gliding », fait intervenir un complexe moteur actine/myosine spécifique des Apicomplexa, localisé entre la membrane

externe du complexe membranaire interne et la membrane plasmique du parasite (Gaskins *et al.*, 2004).

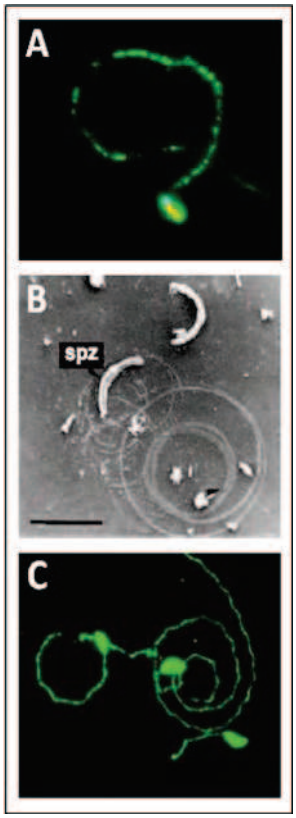


Figure 13 : La motilité par glissement chez les Apicomplexa (d'après Sibley, 2004) ; **A.** *Cryptosporidium parvum* ; **B.** *Plasmodium falciparum* ; **C.** *Toxoplasma gondii*. Spz : sporozoïte.

Les traces formées par le parasite lors de son mouvement sont visibles en microscopie à fluorescence en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines de surface comme TgSAG1, ou des protéines adhésives comme TgMIC2. D'autres protistes, comme les diatomés, utilisent également un système moteur actine/myosine (Poulsen *et al.*, 1999). Par définition, le gliding représente des mouvements lisses et continus, ainsi certaines bactéries arborent également de tels mouvements (McBride, 2001).

La myosine ou TgMyoA, intervenant dans la motilité est une protéine qui requiert l'ATP comme source d'énergie. La polymérisation des filaments d'actines nécessite également de l'ATP. Cette source principale d'énergie nécessaire pour la motilité est fournie par la glycolyse qui semble être à l'origine de la production de la majeure partie de l'ATP durant le « gliding » (Pomel *et al.*, 2008). L'acquisition et le transport du glucose est lié à la protéine TgGT1 (Glucose-Transporter 1) qui est répartie de manière homogène le long de la membrane plasmique du parasite (Joet *et al.*, 2002). L'aldolase, et d'autres enzymes intervenant à différents niveaux de la glycolyse sont délocalisées du cytoplasme chez les parasites intracellulaires vers la pellicule chez les parasites extracellulaires. A la fin de la glycolyse, la lactate déshydrogénase régénère le NADH en NAD^+ grâce la fermentation

lactique. TgLDH1 (Lactate Dehydrogenase-1) est également localisée dans le cytoplasme des parasites intracellulaires et dans la pellicule chez les parasites extracellulaires (Pomel *et al*., 2008). Ces observations suggèrent que le parasite utilise un système de transport des enzymes de la glycolyse, du cytoplasme vers la pellicule, lorsqu'il doit se déplacer, dans le but de fournir instantanément les ressources énergétiques nécessaires au fonctionnement du complexe moteur actine/myosine.

L'éclaircissement de la topologie de l'appareil moteur dans la pellicule du parasite est crucial pour comprendre comment les forces générées par la myosine peuvent être transférées au cytosquelette sous-jacent et ainsi déplacer le parasite vers l'avant.

D. Le mécanisme du « gliding »

Le « gliding » est une forme de motilité inhabituelle dépendante d'un substrat, type surface cellulaire ou matrice extracellulaire. Le mouvement général est généré par la mise en marche du moteur actine/myosine. D'un côté, de courts filaments d'actines sont polymérisés et associés à un homo-tétramère de TgALD. Ces protéines TgALD interagissent avec le complexe TgMIC2/TgM2AP. Chacun des complexes TgMIC2/TgM2AP est lié à un récepteur glycosylé de la surface de la cellule hôte. De l'autre côté, les filaments d'actines sont en interaction avec le complexe TgMyoA et la chaîne légère TgMLC1. Ce complexe est ancré au niveau de la membrane externe du complexe membranaire interne grâce aux deux protéines membranaires TgGAP45 et TgGAP50. Le complexe TgMyoA/TgMLC1 va ensuite diriger les filaments d'actines et les adhésines de surface liées à la membrane plasmique de la cellule hôte vers le pôle basal du parasite. Le CMI associé au cytosquelette du parasite va donc coulisser dans le sens de la marche de la myosine sur les filaments d'actine, soit du pôle antérieur vers le pôle postérieur.

L'utilisation d'une drogue, la jasplakinolide, permettant de stabiliser les filaments d'actines, a démontré que le contrôle de la polymérisation et dépolymérisation de courts filaments d'actines au niveau de la pellicule du parasite est un phénomène crucial dans la motilité (Wetzel *et al*., 2003), contrairement aux systèmes conventionnels dans lesquels l'état d'activation de la myosine est le facteur limitant du moteur acto-myosique. De même, l'implication de la myosine a été suggéré en utilisant un inhibiteur de l'activité ATPase des myosines (Dobrowolski *et al*., 1997a). Aucun changement majeur dans la morphologie du parasite n'est observé durant ce processus.

Ce mécanisme de glissement est commun aux autres parasites Apicomplexa et est basé sur des déplacements circulaires et spiralés. Trois types de mouvements permettent ces déplacements : un glissement circulaire dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, un tournoiement de pas droit dans le sens des aiguilles d'une montre et une glissement hélicoïdale qui combine des à-coups dans le sens des aiguilles d'une montre et des mouvements vers l'avant (Hakansson *et al*., 1999). Ces

mouvements spiralés et circulaires pourraient être reliés à l'arrangement spiralé des microtubules sous-pelliculaires et des saccules du complexe membranaire interne.

IV. La jonction mobile et l'invasion

Au point de contact entre la cellule et le conoïde du parasite se forme une petite dépression de la membrane plasmique de la cellule hôte qui se transforme en calotte sphérique, puis en anneau faisant la jonction avec le parasite (figure 14A ; Nichols et O'Connor, 1981 ; Dubremetz *et al*., 1985 ; Grimwood *et al*., 1995). Cette jonction mobile (JM) sert d'appui au parasite pour glisser dans la vacuole parasitophore en formation (figure 14B) et elle forme une structure de 6 nm d'épaisseur en forme d'anneau contractile retrouvée tout autour du parasite.

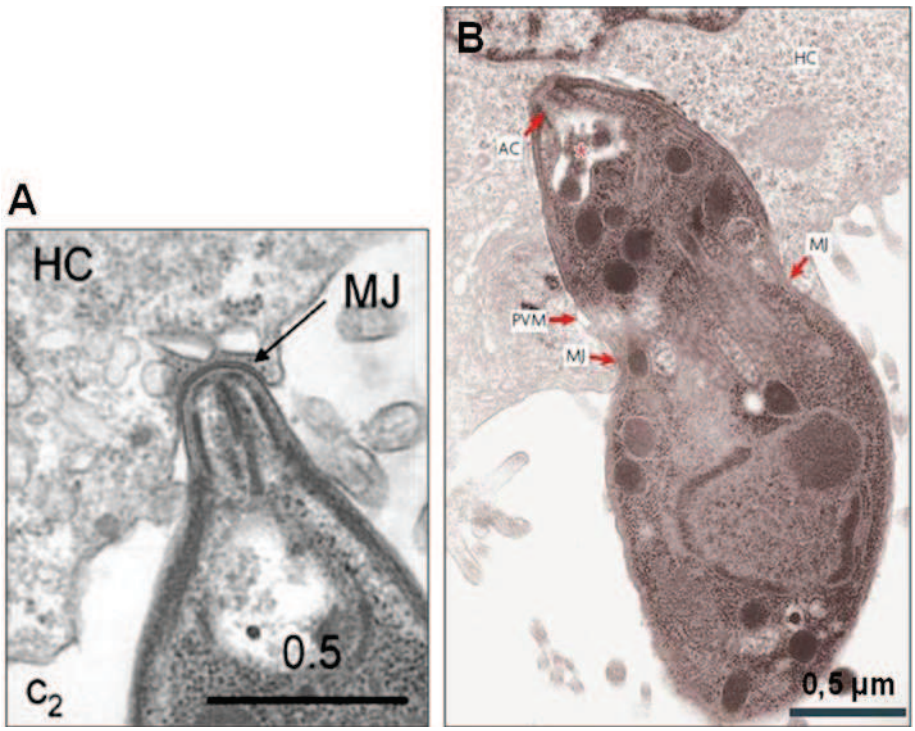


Figure 14A : Formation de la jonction mobile lors de l'attachement initial du parasite *Toxoplasma gondii* à la surface d'une cellule hôte (d'après Dubremetz *et al*., 2007) ; HC : cellule hôte ; MJ : jonction mobile.
Figure 14B : Progression de la jonction mobile vers le pôle basal du parasite lors de l'invasion (d'après Dubremetz, 1998) ; HC : cellule hôte ; AC : conoïde ; PVM : membrane de la vacuole parasitophore ; MJ : jonction mobile. L'astérisque marque les rhoptries déchargées de leur contenu.

Les protéines présentes dans la jonction mobile proviennent de la sécrétion des micronèmes (figure 15 ; TgAMA1 ; Donahue *et al*., 2000 ; Hehl *et al*., 2000 ; Alexander *et al*., 2005) et du cou des rhoptries (TgRON2, TgRON4, TgRON5 et TgRON8 ; Alexander *et al*., 2005 ; Lebrun *et al*., 2005 ; Straub *et al*., 2009. Il semble que la JM soit impliquée dans le tri et la dégradation des protéines de surface de la cellule hôte et du parasite lors de l'invasion en coulissant du pôle apical au pôle basal au fur et à mesure que le parasite entre dans la cellule hôte. La JM est également mise en place lorsque des

parasites sortent des cellules hôtes après un traitement avec un ionophore calcique (Alexander *et al*., 2005). Cependant, lors de la sortie des parasites de la cellule hôte, la jonction mobile ne nécessiterait pas la présence de TgAMA1. Une autre étude a également démontré le rôle crucial de TgMIC8, constituant du complexe TgMIC3/TgMIC8, dans l'établissement de la jonction mobile (Kessler *et al*., 2008).

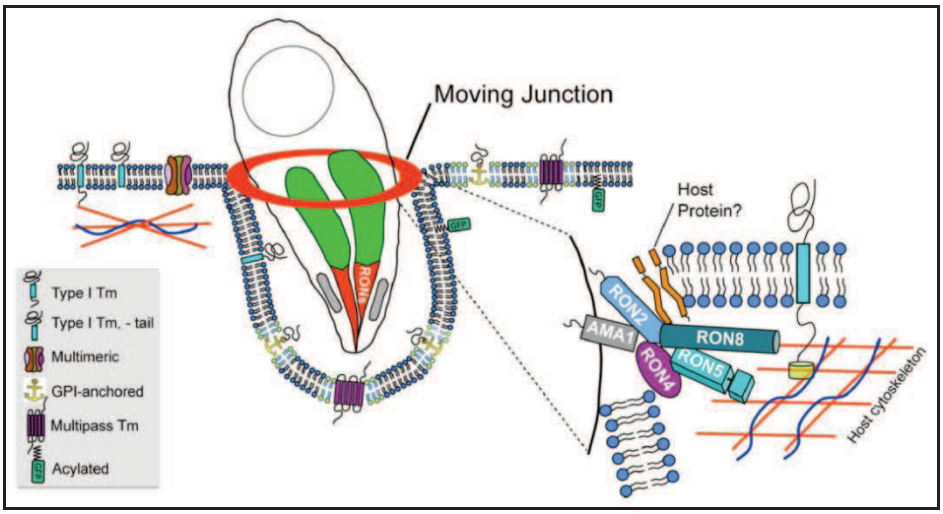


Figure 15 : Représentation schématique de l'entrée du parasite dans une cellule hôte, et de la jonction mobile (d'après Straub *et al*., 2009) ; RONs : protéines du cou des rhoptries ; AMA1 : Apical Membrane Antigen 1 : RON2,4,5,8 : protéines du cou des rhoptries 2,4,5,8 ; Tm : protéine transmembranaire ; GPI : ancre glycosylphosphatidylinositol. L'insert montre l'arrangement spéculatif des composants de la jonction mobile.

A. Apical Membrane Antigen 1

TgAMA1 est une protéine transmembranaire de type I localisée dans les micronèmes. Le domaine carboxy terminal cytoplasmique est court et le domaine amino terminal extracellulaire contient des résidus de cystéines conservés. TgAMA1 est spécifique et très conservé chez les autres parasites Apicomplexa, et est un candidat vaccinal d'intérêt contre le paludisme depuis de nombreuses années (Deans *et al*., 1988). Aucune modification co-traductionnelle ou post-traductionnelle n'a été mise en évidence sur cette protéine. L'absence de TgAMA1 provoque un défaut dans l'invasion des parasites (Mital *et al*., 2005). Cependant la motilité, l'attachement initial et la sécrétion des micronèmes ne semblent pas être perturbés. En revanche, la sécrétion des rhoptries est inhibée. De plus, des anticorps spécifiques de TgAMA1 sont capables d'inhiber l'invasion juste après l'attachement initial du parasite (Hehl *et al.*, 2000). TgAMA1 semble agir comme une adhésine secondaire permettant de consolider l'interaction initiale entre le parasite et la surface de la cellule hôte. Il a été décrit que TgROM4 est impliqué dans le clivage de TgAMA1 lors de l'invasion (Buguliskis *et al.*, 2010).

Suite à la sécrétion des micronèmes, TgAMA1 est ancré dans la membrane plasmique (Alexander *et al.*, 2005) et est en contact direct avec la jonction mobile par l'intermédiaire de TgRON2 (Besteiro *et al*., 2009). La structure cristalline de l'homologue de TgAMA1 chez *P. falciparum* démontre que les cystéines conservées divise l'ectodomaine en trois sous-domaines (Pizarro *et al*., 2005). Les domaines I et II ressemblent à la super-famille des protéines à domaine adhésine PAN, suggérant que PfAMA1 interviendrait dans l'interaction avec des protéines ou des glycannes. Il semble que TgAMA1 pourrait lier l'aldolase de *T. gondii in vitro* mais la signification biologique de cette liaison n'a pas été démontrée jusqu'à présent *in vivo* (Sheiner *et al*., 2010).

B. Les RONs

Les RONs sont des protéines de hauts poids moléculaire (>110 kDa) contenues dans le cou des rhoptries, spécifiquement conservés chez les Apicomplexa. TgRON8 est spécifique des coccidies et le complexe formé par les protéine TgRON2/TgRON4/TgRON5/TgRON8 dans la jonction mobile interagit directement avec la face cytoplasmique de la cellule hôte en traversant sa membrane plasmique (Besteiro *et al*., 2009 ; Straub *et al*., 2009). Ce complexe est préformé dans les rhoptries avant l'invasion (Straub *et al*., 2009)

TgRON2 possède deux ou trois segments transmembranaires et elle est capable d'interagir avec TgRON4 et TgAMA1 (Alexander *et al*., 2005 ; Besteiro *et al.*, 2009). Cette dernière interaction ne nécessite pas la présence des autres RONs dans la jonction mobile mais elle est très importante pour l'invasion (Beisteiro *et al*., 2009 ; Lamarque *et al*., 2010). TgRON2 est ancrée dans la membrane plasmique de la cellule hôte et permettrait l'association des autres TgRONs avec le cytosquelette sous-jacent de cette membrane. Cette interaction directe ou indirecte pourrait constituer un lien direct entre la jonction mobile du parasite et le cytosquelette de la cellule hôte.

TgRON4 est associée à TgAMA1 dans la jonction mobile et serait localisée au niveau de la face extérieure de la jonction mobile, tandis que TgRON5 est maturée en deux fragments majeurs qui s'insèrent éventuellement dans la jonction mobile mais cela reste à démontrer (Alexander *et al*., 2005 ; Straub *et al*., 2009). TgRON8 n'est pas exposé au niveau de la face extracellulaire lors de l'invasion, mais est sécrétée au niveau de la face interne de la membrane plasmique de la cellule hôte et semble établir un lien avec le cytosquelette cortical de la cellule hôte par le domaine carboxy terminale (Straub *et al*., 2009).

V. La vacuole parasitophore

La formation de la vacuole parasitophore (VP, figure 16) est le résultat de l'invagination de la membrane plasmique de la cellule hôte lors de l'entrée du parasite (Sibley, 2004). La sécrétion des rhoptries lors de l'invasion permet la formation de cette vacuole. Au cours de son entrée dans une

cellule hôte, le parasite va s'entourer progressivement d'une membrane provenant directement de la membrane plasmique de la cellule hôte.

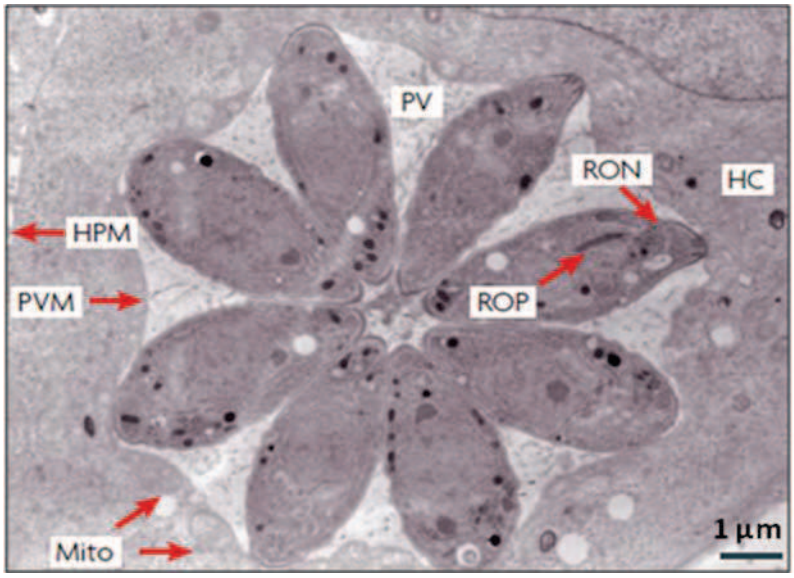


Figure 16 : Vacuole parasitophore contenant huit tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* (d'après Dubremetz, 1998) ; HPM : membrane plasmique de la cellule hôte ; PVM : membrane de la vacuole parasitophore ; PV : vacuole parasitophore ; ROP : rhoptries ; RON : cou des rhoptries ; HC : cellule hôte ; Mito : mitochondrie de la cellule hôte.

Des expériences de capacitance, permettant de mesurer l'augmentation ou la diminution de la taille de membranes biologiques, ont permis de déterminer qu'il n'y a pas de changement détectable de la taille de la membrane plasmique de la cellule hôte lors de l'invasion, de même que lorsque le parasite se multiplie dans cette vacuole (Suss-Toby *et al*., 1996). Le parasite va se débarrasser de la majeure partie des protéines de la membrane plasmique de la cellule hôte en excluant uniquement les protéines transmembranaires et en conservant les protéines à ancrage GPI (Mordue *et al*., 1999).

Des protéines parasitaires issues de la sécrétion des rhoptries, au cours de l'invasion, et des granules denses, lorsque la vacuole est entièrement refermée, vont être intégrées à la membrane de la vacuole parasitophore. Il a également été démontré que les lipides contenus dans les rhoptries vont s'associer à la membrane de cette vacuole (Foussard *et al.*, 1991 ; Coppens et Vielemeyer, 2005). Ces deux étapes de maturation de la VP vont empêcher la fusion de vésicules d'endocytoses ou d'exocytoses (type endolysosomes) présentes dans le cytoplasme de la cellule hôte. Il a été démontré que même lorsque les parasites intracellulaires sont tués, une fois la VP bien développée, les lysosomes de la cellule hôte sont incapables de fusionner avec cette vacuole (Joiner *et al*., 1990). Cette niche dans laquelle le parasite va se multiplier constitue ainsi la première barrière contre la défense de l'hôte.

Chez *T. gondii*, la maturation de la VP se fait grâce à la sécrétion des protéines des granules denses. Une première sécrétion a lieu quelques minutes après l'entrée du parasite, et ensuite cette sécrétion se fait à un niveau plus basale lors de la multiplication des parasites (Carruthers et Sibley, 1997). Les protéines secrétées des granules denses sont associées à la membrane de la vacuole (TgGRA3, TgGRA5, TgGRA7, TgGRA8 et TgGRA10) sous forme de complexe multimérique ou au réseau de nanotubes membranaires (TgGRA2, TgGRA4, TgGRA6 et TgGRA9) de la vacuole. Outre ces protéines de granules denses, certaines protéines de rhoptries sont également associées à la membrane de la VP, comme ROP1 (Bradley *et al*., 2002), ROP2 (Sinai et Joiner, 2001), ROP4 (Carey *et al*., 2004a) et ROP5 (El Hajj *et al*., 2007b).

La VP peut être divisée en trois sous-compartiments membranaires distincts, chacun ayant une fonction différente. La membrane de la VP est prolongée par de longues et fines extensions vers le cytoplasme de la cellule hôte, qui sont impliquées dans le recrutement des organites de la cellule hôte. Le second compartiment consiste en une structure appelée Host Organelle Sequestring Tubulo structures (HOSTs) qui sont des invaginations de la membrane de la VP vers l'intérieur de la VP. Cette structure particulière comprenant un unique microtubule de la cellule hôte serait impliquée dans le recrutement d'endolysosomes de la cellule hôte, riches en cholestérol (Coppens *et al*., 2006). Le dernier compartiment regroupe le réseau nanotubulaire membranaire qui s'étend à l'intérieur de la VP et permet de relier les parasites entre eux et à la membrane de la VP (Magno *et al*., 2005 ; Lemgruber *et al*., 2007).

La vacuole est également impliquée dans le recrutement de certains organites de la cellule hôte, comme le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Jones et Hirsch, 1972). Des études antérieures ont démontré que le domaine amino-terminal de ROP2, orienté vers le cytoplasme de la cellule hôte par une possible interaction avec ROP5, intervenait dans le recrutement des mitochondries de la cellule hôte (Sinai et Joiner, 2001 ; El Hajj *et al.*, 2007b). Cependant, une étude très récente a remis en cause cette observation (Pernas et Boothroyd, 2010). La vacuole parasitophore contribue également au recrutement de nutriments provenant du cytoplasme de la cellule hôte, nécessaire au développement du parasite. En effet, *T. gondii* est un parasite auxotrophe pour de nombreuses molécules intervenant dans divers processus biologiques telles que les purines intervenant dans le métabolisme des nucléotides et le cholestérol intervenant dans le métabolisme des lipides et des acides gras (Schwartzman et Pfefferkorn, 1981 ; Coppens *et al*., 2000). Certaines observations ont permis de démontrer que la membrane de la VP est perméable aux molécules de tailles comprises entre 1300 et 1900 Da (Schwab *et al*., 1994). Ce pore pourrait intervenir dans le recrutement de petites molécules comme l'ATP qui sera hydrolysé pour utiliser l'adénosine dans la voie de synthèse des purines (Schwartzman et Pfefferkorn, 1982). D'autres structures de la cellule hôte sont également associées à cette vacuole, comme les microtubules qui permettraient de

recruter les mitochondries de la cellule hôte et les filaments de type vimentine (Halonen et Weidner, 1994 ; Sinai *et al.*, 1997 ; Melo *et al*., 2001).

VI. Les organites spécifiques des Apicomplexa

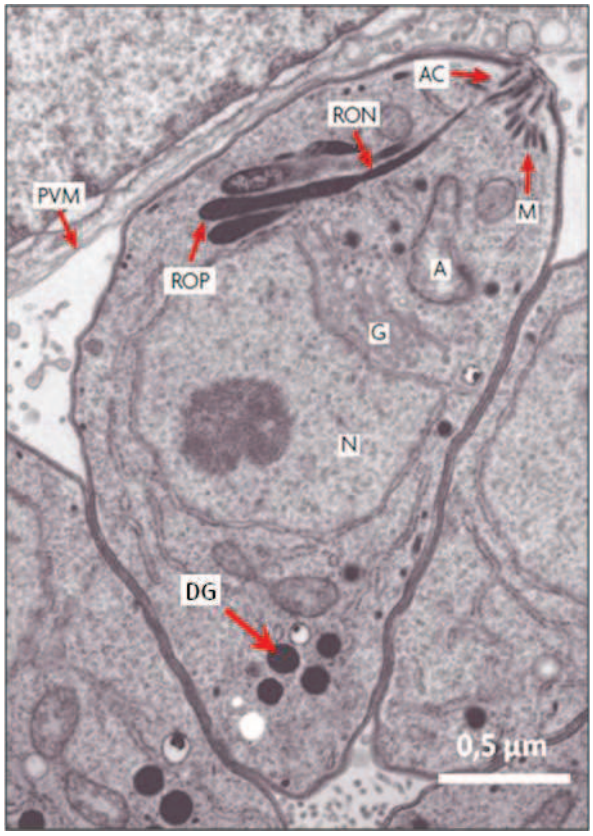


Figure 17 : Tachyzoïte intracellulaire de *Toxoplasma gondii* (d'après Dubremetz, 2007) ; PVM : membrane de la vacuole parasitophore ; ROP : rhoptries ; RON : cou des rhoptries ; AC : conoïde ; M : mocronèmes ; A : apicoplaste ; G : appareil de Golgi ; N : noyau ; DG : granules denses.

A. Les micronèmes

Les micronèmes sont de petits organites apicaux en forme de bâtonnets denses aux électrons, présents au nombre de 50 à 100 par parasites (figure 17). Ces organites sont associés à la face cytoplasmique du complexe membranaire interne dans la région apicale. Actuellement, de nombreuses protéines ont été identifiées dans ces organites apicaux : des protéines à domaines adhésines (TgMIC1 à TgMIC16), une protéine possédant un domaine subtilisin-like serine protease (TgSUB1), une protéine impliquée dans la formation de la jonction mobile (TgAMA1) et une protéine possédant des domaines thrombospondines altérés (TgSPATR, Secreted Protein with an Altered Thrombospondin Repeat, Kawase *et al*., 2010). Des études ont permis de déterminer que deux motifs peptidiques localisés dans la région carboxy-terminal sont nécessaires et suffisant pour l'adressage des protéines (MICs) dans les micronèmes. Ces deux motifs peptidiques sont YHYY, placés de manière adjacente à la face cytoplasmique du domaine transmembranaire de protéines MICs et

EIEYE, situé 11 acides aminés en aval du motif YHYY. Des mutations dans ces domaines entraînent une délocalisation de la protéine MIC2 vers la vacuole parasitophore en passant par l'intermédiaire des granules denses (Di Cristina *et al.*, 2000).

L'adressage des protéines MICs vers les micronèmes peut également se faire via la formation de complexes protéiques. Trois complexes MICs ont été découvert jusqu'à aujourd'hui. Il s'agit de TgMIC1/TgMIC4/TgMIC6 (Reiss *et al.*, 2001), de TgMIC2/TgM2AP et de TgMIC3/TgMIC8 (Cérède *et al*., 2002). Il a été démontré que la protéine TgMIC6 sert d'escorteur au complexe TgMIC1/TgMIC4/TgMIC6 afin de transporter ce complexe vers les micronèmes (Reiss *et al.*, 2001). Il en est de même pour le complexe TgMIC8-TgMIC3, ou TgMIC8 sert également d'escorteur (Meissner *et al.*, 2002a) et TgMIC2-TgM2AP, TgMIC2 servant d'escorteur à TgM2AP (Huynh *et al.*, 2004). Ces études ont montré que les protéines TgMIC6, TgMIC8 et TgMIC2, possédant des domaines transmembranaires dans leur région carboxy-terminal, pourraient se lier par leur court domaine cytoplasmique amino-terminal aux autres protéines MICs solubles TgMIC1-TgMIC4, TgMIC3 et TgM2AP respectivement, et pourraient ainsi amener ces protéines vers les micronèmes. Ces protéines escorteurs posséderaient ainsi dans leur région carboxy-terminale les informations nécessaires à l'adressage vers les micronèmes. De plus, ces escorteurs ont également un rôle d'ancrage de ces complexes dans la membrane plasmique du parasite lors de l'invasion. L'organisation de ces complexes dans les micronèmes semble être orchestrée par deux autres protéines présentes dans ces organites, TgMIC10 et TgMIC11. Ces petites protéines solubles ne sont localisées que dans les micronèmes et ne sont pas retrouvées à la surface du parasite lors de l'invasion (Hoff *et al.*, 2001 ; Harper *et al*., 2004).

La plupart des MICs contiennent des domaines extracellulaires et des motifs protéiques homologues à des protéines à domaine adhésine eucaryotes, comme les « Thrombospondin-1 type 1 domains repeats » (TSRs, TgMIC1, TgMIC2 et TgMIC12), les « Von Willebran A domain/integrin inserted domains » (domaine A/I, TgMIC2), les « Apple/PAN domains » (TgMIC4), les « Epidermal Growth Factor-like domains » (EGF-like, TgMIC3, TgMIC6, TgMIC7, TgMIC8, TgMIC9 et TgMIC12) et les « lectin domains » (TgMIC1, TgMIC3 et TgMIC8). Ces domaines servent dans l'attachement du parasite à la cellule hôte. La protéine TgMIC2 par exemple a été décrite comme un ligand des protéoglycannes héparanes sulfates (héparine) et ICAM-1 (Harper *et al.*, 2004 ; Barragan *et al.*, 2005). La protéine TgMIC1 est une lectine qui reconnaît et interagit avec les résidus d'acides sialiques (Blumenschein *et al.*, 2007). Quant au complexe TgMIC3/TgMIC8, chacune de ces protéines semble également avoir une activité lectinique en interagissant avec du *N*-acétyle-glucosamine (Cérède *et al*., 2002 ; 2005).

La protéolyse de la plupart des protéines MICs est une étape cruciale pour la maturation de ces protéines. Les protéines MICs sont synthétisées avec un peptide signal qui est ensuite éliminé dans le réticulum endoplasmique. Plus de la moitié de ces protéines possèdent également un pro-

domaine qui est éliminé lors du transport vers les micronèmes (TgM2AP, Harper *et al.*, 2006 ; TgMIC3, Cérède *et al*., 2002). Cette étape de protéolyse est nécessaire pour la stabilité des complexes de protéines MICs, mais aussi pour la sécrétion suivie de l'adhésion de ces protéines MICs à la cellule hôte.

B. Les rhoptries

Les rhoptries sont des organites avec une base en forme de bulbe s'étendant dans le cytoplasme du parasite vers le noyau, et une extrémité antérieure effilée rattachée au pôle apical du parasite dans le conoïde. Chez *T. gondii*, ces organites sont présents en plusieurs nombres, allant de 6 à 12 par parasites, d'une longueur d'environ 2 à 3 µm (figure 17).

Les rhoptries sont synthétisées tout d'abord sous la forme de pré-rhoptries. Il semble que ce soit les seuls organites dont le contenu est acide (Shaw *et al.*, 1998). Le contenu protéique de ces organites semble très bien ordonné sous forme de sous compartiments sans qu'il y ait de réseau membranaire pour les délimiter. A l'heure actuelle, le mécanisme par lequel ces protéines sont compartimentées dans le bulbe ou le cou des rhoptries est inconnu. Les protéines RONs (RhOptry Neck proteins) sont contenues dans le « cou » des rhoptries, la partie apicale, et les protéines ROPs (RhOptry Proteins) sont contenues dans le bulbe des rhoptries, la partie basale. Sur toutes les protéines de rhoptries identifiées à ce jour, 24 sont localisées dans le bulbe et seulement 5 dans le cou (Bradley *et al.,* 2005).

Les autres protéines de rhoptries jouent un rôle dans l'établissement de la vacuole parasitophore, et d'autres sont directement injectées dans le cytoplasme de la cellule hôte pour ainsi permettre le recrutement de certains organites comme les mitochondries (ROP2 ; Herion *et al.*, 1993). La protéine ROP16 par exemple est adressée au noyau de la cellule hôte dès la formation de la vacuole parasitophore permettant ainsi de contrôler certaines fonctions biologiques de la cellule hôte et de détourner des mécanismes physiologiques tels que la défense immunitaire de la cellule hôte en agissant sur la voie STAT3 et STAT6 (Saeij *et al*., 2007 ; Ong *et al*, 2010). Certaines de ces protéines de rhoptries sont également impliquées dans les différents niveaux de virulence chez la souris des différents types de souche de *T. gondii* (ROP18 ; Saeij *et al.*, 2006 ; Taylor *et al.*, 2006).

Toutes ces protéines possèdent un peptide signal et bon nombres possèdent au moins un domaine transmembranaire putatif ou un ancrage GPI, suggérant une association avec les membranes de ces organites. De plus, la majeure partie des protéines de rhoptries possèdent également un pro-domaine qui est clivé dans les pré-rhoptries lors de l'adressage des protéines vers les organites matures. Cette protéolyse est une étape clef dans l'adressage, la maturation et l'acquisition de la fonction finale des protéines ROPs, ce qui a des conséquences sur l'ultrastructure des rhoptries et la réplication des parasites (Shaw *et al.*, 2002). Deux protéines de rhoptries pourraient servir de maturases pour cliver les pro-domaines des autres protéines ROPs, ce sont la

cathepsin B-like protease Toxopain-1 et la subtilisine-like TgSUB2 (Que *et al.*, 2002 ; Miller *et al.*, 2003).

Ces protéines ROPs et RONs ont été classées dans différents groupes. La famille des kinases associées à ROP2 dont les membres possèdent tous un domaine transmembranaire putatif dans la partie carboxy terminale ainsi qu'un domaine d'homologie avec des protéines kinases (El Hajj *et al.*, 2006). Cependant, la majeure partie des protéines ROP de cette famille ont perdu leur capacité à phosphoryler des protéines, sauf ROP18 (El Hajj *et al.*, 2007a). Les autres protéines de rhoptries possèdent des homologies avec des phosphatases ou des protéases. Les protéines RON quant à elles ont un rôle totalement différent des protéines ROP.

C. L'apicoplaste

Ce plaste est un organite entouré de 4 membranes. Il n'est présent qu'à une seule copie par parasite (figure 17). L'apicoplaste serait le résultat d'une endosymbiose secondaire au cours de laquelle l'ancêtre des Apicomplexa aurait ingéré une algue rouge et dont le plaste aurait été conservé au cours de l'évolution (Roos *et al.*, 1999). Cet organite est présent chez tous les parasites Apicomplexa, excepté chez *C. parvum* (Zhu *et al.*, 2000). Ce plaste ne possède pas d'activité photosynthétique et les mécanismes biologiques s'y déroulant sont la synthèse des acides gras, la synthèse des isoprenoïdes nécessitant tous deux des composés issus du système redox et de la lipoylation présent également dans l'apicoplaste (McFadden *et al.*, 1996 ; Köhler *et al.*, 1997).

Le génome de l'apicoplaste de 35kb code environ 30 à 50 gènes, impliqués pour la plupart dans la transcription et la traduction de protéines ribosomales. Les autres ORFs codent pour des protéines inconnues à l'heure actuelle. Au cours de l'évolution des Apicomplexa, la plupart des gènes codant pour des protéines résidentes de l'apicoplaste a été transféré vers le génome nucléaire. Les protéines NEAT (Nucleus-Encoded Apicoplast-Targetted) sont redirigées ensuite vers cet organite grâce à des peptides signaux et des domaines peptidiques de transit de type plante permettant de traverser les 4 membranes du plaste (Tonkin *et al.*, 2008). Il semblerait que les acides aminés chargés positivement soient responsables du trafic correct des protéines vers l'apicoplaste. Ces protéines possèdent également un domaine hydrophobe qui sert de signal d'adressage vers l'apicoplaste (Lim *et al.*, 2009).

L'origine de ce plaste (algue rouge) en a fait une cible thérapeutique particulière pour la recherche de drogues ne visant que les protéines et les métabolismes spécifiques de l'apicoplaste. Des drogues comme la rifampicine et rifabutin, inhibant les ARN polymérases des Eubactéries comme celles codées par le génome de l'apicoplaste, inhibent la croissance de *T. gondii* et *P. falciparum* (Strath *et al.*, 1993 ; Araujo *et al.*, 1994 ; Olliaro *et al.*, 1994). D'autres antibiotiques antimicrobiens également actifs contre *T. gondii* ciblent la transcription et la traduction de l'apicoplaste. Par exemple, la clindamycine a permis de déterminer que certaines protéines ciblées

par cette drogue sont nécessaires lors de la réinvasion du parasite après sa première sortie de la vacuole parasitophore (He *et al*., 2001).

D. Les granules denses

Les granules denses sont des organites apicaux que l'on retrouve chez tous les stades infectieux de *T. gondii*. Leurs nombres varient selon les stades parasitaires mais on retrouve le plus de granules denses chez les stades tachyzoïte et sporozoïte. Les granules denses sont localisés à travers tout le cytoplasme du parasite (figure 17). Ce sont des organites circulaires de 200nm de diamètres entourés d'une membrane unique. Les granules denses ont été identifiés chez de nombreux types cellulaires et apparaissent denses aux électrons en microscopie électronique.

Les protéines de granules denses sont sécrétées dans la vacuole parasitophore une fois que le parasite est entièrement entré dans la cellule hôte et que la vacuole est close (Carruthers et Sibley, 1997). Certaines protéines de granules denses (DGPs pour Dense Granule Proteins) sont impliquées dans la modification et la fonctionnalité de la vacuole parasitophore, dans le recrutement de nutriments au sein même de la cellule hôte et d'autres dans le déclenchement de la réponse immune de l'hôte.

Il a été démontré que n'importe quelle protéine soluble peut être adressée vers les granules denses puis exportée vers la vacuole parasitophore, lorsqu'elle possède un peptide signal typique des granule denses (Karsten *et al.*, 1998). Les granules denses constituent la voie de sécrétion par défaut pour les protéines solubles. Cette sécrétion a lieu à un niveau sub-apical, probablement au niveau des interstices présents entre les saccules du CMI. La sécrétion des protéines GRA se fait par fusion de la membrane des granules denses avec la membrane plasmique, grâce à l'action de protéines GTPases de la famille Rab ainsi que d'autres facteurs solubles (Chaturvedi *et al.*, 1999). Cette voie de sécrétion constitutive vers la vacuole parasitophore lors du développement intracellulaire du parasite intervient dans les interactions hôte/parasite et pourrait avoir un rôle dans la physiopathologie de la toxoplasmose. Cependant, la sécrétion des granules denses semble être également régulée puisque la décharge des protéines GRA apparait très rapidement après la formation de la vacuole parasitophore (Dubremetz *et al*., 1993 ; Carruthers and Sibley, 1997).

A l'heure actuelle, 13 protéines de granules denses ont été identifiées chez le tachyzoïte. La plupart de ces protéines GRA possèdent un peptide signal et un domaine transmembranaire de type I entouré par deux domaines hydrophiles. Il n'existe pas d'homologies significatives entre les séquences des différentes protéines GRA.

La sécrétion des protéines GRA juste après l'invasion, coïncide avec des changements structuraux de la vacuole parasitophore spécifique du tachyzoïte. Ces changements résultent en l'établissement d'un réseau membranaire formant des nanotubes présents dans l'espace entre les parasites et la membrane de la vacuole parasitophore. Ce réseau permet de connecter les parasites à

la membrane interne de la vacuole parasitophore, ainsi que d'établir des liens entre les parasites eux-mêmes. La majeure partie des protéines GRA est associée au réseau membranaire, soit au niveau des tubules membranaires (TgGRA2/TgGRA4/TgGRA6, Labruyère *et al*., 1999 ; Mercier *et al*., 2002), soit au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore et des extensions vers le cytoplasme de la cellule hôte (TgGRA3/TgGRA5/TgGRA7/TgGRA8, revue de Mercier *et al*.,2005).

L'implication de ces protéines GRA dans la virulence parasitaire, et dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte font de ces antigènes des candidats de tests diagnostiques contre la toxoplasmose et également pour la mise au point de vaccins (TgGRA2, Sharma *et al*., 1984 ; Brinkmann *et al*., 1993 ; Cesbron-Delauw *et al*., 1996 ; TgGRA1, Supply *et al*., 1999 ; TgGRA7, Vercammen *et al*., 2000 ; TgGRA4, Mevelec *et al*., 1994, 1998 ; Martin *et al*., 2004).

VII. Le cytosquelette cortical

Le cytosquelette du parasite est constitué d'un réseau de microtubules corticaux, d'un complexe apical renfermant une structure appelée conoïde, d'un complexe basal et d'un réseau filamenteux sous-pelliculaire. Les microtubules sous-pelliculaires sont très stables et résistants aux détergents (Nichols et Chiappino, 1987 ; Stokkermans *et al*., 1996 ; Morrissette *et al*., 1997 ; Morrissette et Sibley, 2002a), contrairement aux cellules des Eucaryotes supérieurs dont le cytosquelette de microtubules est une structure plus dynamique. La structure cytosquelettique très particulière du parasite est reproduite à l'identique lors de la biogenèse des cellules filles, et est conservée chez les parasites Apicomplexa. Ce cytosquelette cortical sert d'échafaudage à la formation de la pellicule des parasites filles, et son extrême rigidité joue un rôle crucial lors de l'invasion, de la locomotion et de la pathogénie (Morrissette et Sibley, 2002a). Les microtubules sont essentiels pour la survie et la prolifération des parasites (Morrissette *et al.,* 1997 ; Shaw *et al.,* 2001 ; Morrissette et Sibley, 2002a). L'architecture, la forme et la polarité apicale du parasite est maintenue par le biais de ce réseau de microtubules corticaux qui agencé spécifiquement autour d'un point d'ancrage situé au pôle apical du parasite, le conoïde et l'anneau polaire apical.

A. Le conoïde et le complexe apical

Le conoïde est présent uniquement chez les coccidies et peut se décomposer en plusieurs sections (figure 18) :

- deux anneaux apicaux localisés sous la membrane plasmique du parasite, juste au dessus du conoïde. Ce sont des anneaux fins et denses aux électrons, l'anneau supérieur fait 160 nm de diamètre et l'anneau inférieur 200 nm de diamètre.
- le conoïde, en forme de cône tronqué est constitué de structures fibrillaires enroulées sous forme de spirales. Sa taille est de 400 nm de diamètre à la base et 250 nm en haut

du cône. Cette structure est composée d'α et de β-tubuline comme les autres microtubules du parasite, mais formant cependant des proto-filaments différents. Ces proto-filaments sont organisés selon un schéma bien particulier (Hu *et al*., 2002b) qui est différent des microtubules classiques. Ces structures tubulaires spiralées sont en effet bien plus compressées que celles du cytosquelette parasitaire. Chacun des 10 à 12 filaments du conoïde est composé d'un ruban de 9 proto-filaments formant une sorte de « hanse de canne », totalement différent des formes circulaires ordonnées des microtubules classiques. Il semblerait également que ces microtubules soient associés aux nombreuses protéines MAP (Microtubules Associated Proteins) permettant de former un arrangement spécifique du conoïde (Hu *et al*., 2006).

- un anneau polaire apical situé juste sous la base du conoïde est recouvert par l'extrémité antérieure du complexe membranaire interne. Cet anneau sert de point d'ancrage apical aux 22 microtubules sous-pelliculaires et constitue le MicroTubule-Organizing Center impliqué dans la synthèse *de novo* des microtubules lors de la réplication des parasites (Nichols et Chiappino, 1987). Cet anneau est constitué des protéines TgMORN1 (Membrane Occupation and Recognition Nexus, Gubbels *et al*., 2006 ; Hu *et al*., 2006), Tgcentrine2 (Hu *et al.*, 2006), TgDLC (Dynein Light Chain, Hu *et al.*, 2006), Tg CAM1&2 (CAlciuM binding proteins 1&2 ; Hu *et al*., 2006) et TgRNG1 (RiNG-1 protein, Tran *et al*., 2010). Cette structure est aussi impliquée dans la biogenèse des cellules filles.
- une paire de microtubule intra-conoïdaux adjacente à ces 22 microtubules est également présente. Ils s'étendent sur une courte distance vers le cytoplasme apical du parasite et pourrait avoir un rôle dans le transport de vésicules contenant les protéines de micronèmes et/ou de rhoptries lors de la phase d'invasion du parasite (Nichols et Chiappino, 1987 ; Carruthers et Sibley, 1997).

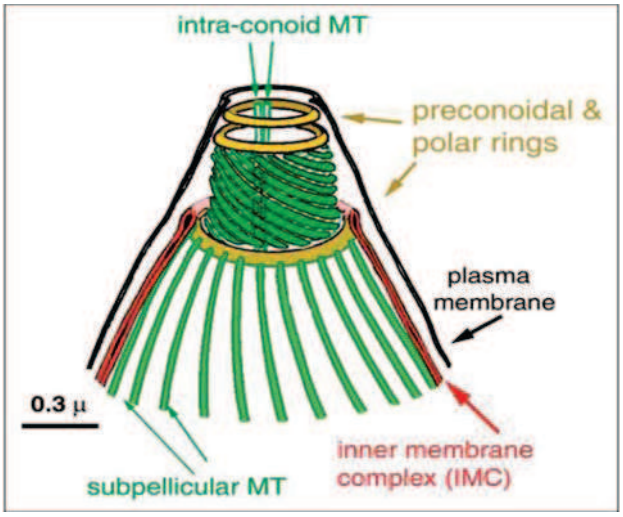


Figure 18 : Représentation schématique du conoïde de *Toxoplasma gondii* (d'après Hu *et al*., 2005) ; MT : microtubules.

Le conoïde serait à l'origine de la torsion du parasite lors de la locomotion (Chiappino *et al.*, 1984). L'arrangement spiralé, dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, des filaments du conoïde forment une structure extrêmement stable et mobile qui peut être pointée vers l'avant, à l'extérieur du parasite, étape d'extrusion du conoïde uniquement visible lors de la motilité ou de l'invasion, ou rétractée au niveau de la gaine de microtubules (Lycke *et al*., 1975 ; Aikawa *et al.*, 1977). Actuellement, quelques protéines impliquées dans cette motilité sont connues. TgDLC1 qui pourrait former une partie du moteur en association et TgCAM1 & 2 (CAlciuM-binding proteins) qui réguleraient la motilité du conoïde suite à l'influx calcique précédant l'invasion (Mondragón et Frixione, 1996 ; Hu *et al*., 2006). D'autres protéines impliquées dans un système moteur, comme les myosines, actine, dynéines et kinésines, ont également été identifiés par spectrométrie de masse sur des conoïdes purifiés (Hu *et al*., 2006). Parmi ces protéines, l'implication de filaments d'actines a été décrite (Mondragón et Frixione, 1996 ; Patrón *et al*., 2005).

Le complexe apical renferme également une autre structure formant un anneau périphérique constitué de 5 à 6 assemblages ponctuels composés de la protéine Tgcentrine2, probablement associées aux microtubules sous-pelliculaires ou au complexe membranaire interne (Hu *et al.*, 2006). A ce niveau apical, une coiffe de protéine TgDLC1 semble tapisser la face cytoplasmique du réseau filamenteux sous-pelliculaire. Les fonctions de l'ensemble de ces deux structures n'ont pas encore été élucidées. Très récemment, une nouvelle protéine a été découverte dans cette même zone apicale du parasite, TgISP1 (Beck *et al.,* 2010).

B. Les microtubules

Chez les Eucaryotes, le cytosquelette de microtubule joue un rôle essentiellement structural et peut être assemblé en de nombreuses structures avec des formes et des fonctions différentes. Chez le tachyzoïte de *T. gondii*, des populations distinctes de microtubules sont présentes dans au moins cinq structures.

- Les microtubules sous-pelliculaires qui interviennent dans le maintien de la structure et de la polarité du parasite, mais également dans le transport vésiculaire intracellulaire
- Les microtubules du fuseau mitotique (dans le centrocone) qui interviennent lors de la fission nucléaire
- Les structures tubulaires qui composent le conoïde (ces filaments ne sont pas appelés microtubules mais sont composés de tubuline)

- Les microtubules intra-conoïdaux qui semble intervenir dans la sécrétion des rhoptries et/ou micronèmes
- Les centrioles (dans le centrosome) autour duquel s'organisent les premières étapes de la formation des futures cellules filles.

Ces populations de microtubules sont polymérisées individuellement par au moins deux MicroTubule-Organizing Center (MTOC) différents, ce qui est différent des cellules de vertébrés et de la levure, ou un seul MTOC, le centrosome est à l'origine des microtubules cytoplasmiques et des microtubules du fuseau mitotique. Pour les microtubules sous-pelliculaires, le MTOC est l'anneau polaire apical situé sous le conoïde, tandis que pour les microtubules du fuseau mitotique le MTOC est représenté par une structure associée à la membrane nucléaire, renfermant les deux centrioles cytoplasmique, le centrosome (Senaud, 1966 ; Sheffield et Melton, 1968 ; Striepen *et al*., 2000). Chez *T. gondii*, il n'y a pas d'événement de désassemblage et de réorganisation du MTOC des microtubules du fuseau mitotique avant la fission nucléaire (Sheffield et Melton, 1968). La présence de deux MTOC distincts permet l'invasion des parasites quelque soit l'étape du cycle cellulaire. La composition en sous unité d'α et de β-tubuline de tous ces microtubules est identique. Ces deux sous-unités de tubulines sont très homologues à celles des autres Eucaryotes.

Les 22 microtubules sous-pelliculaires se trouvent juste en dessous du réseau filamenteux sous-pelliculaire, qui est associé au complexe membranaire interne, et parcourent environ les deux tiers de la longueur du corps du parasite, sur environ 5µm, formant une sorte de panier (Nichols and Chiappino, 1987). Ils sont composés de 13 proto-filaments de tubulines α et β formant des tubes de 22 nm de diamètre. Ces filaments de tubulines sont associés à l'anneau polaire apical situé sous le conoïde et s'étendent vers le pôle basale du parasite en formant une sorte d'hélice. L'extrémité de ces microtubules ne semble pas être physiquement protégée par une coiffe (Russell et Burns, 1984). Des études de cryo-microscopie électronique ont mis en évidence des protéines associées à ces microtubules corticaux, les MAPs (Microtubules Associated Protein) qui ont une périodicité de 32 nm sur toute la longueur des microtubules corticaux (Morrissette *et al.*, 1997).

Le cytosquelette de microtubules sous-pelliculaires polymérisés lors de la biogenèse du corps des cellules filles sert d'échafaudage à la formation du complexe membranaire interne (CMI) et réseau filamenteux sous-pelliculaires maintenant en place la forme du parasite. (Shaw *et al*., 2000 ; Gubbels *et al*., 2006).

Les microtubules du fuseau mitotique sont plus courts (de 1 à 2 µm de long) et permettent comme chez les Eucaryotes supérieures de séparer les chromosomes lors de la karyokinèse.

Les deux microtubules intra-conoïdaux sont de très courts filaments, positionnés près du centre du conoïde, dont la taille est d'environ 0,4 µm et la composition semblable aux microtubules sous-pelliculaires. Une étude chez *T. gondii* a mis en évidence une protéine liant directement et

stabilisant exclusivement cette paire de microtubule, TgICMAP1 (Intra-Conoïd Microtubule Associated Protein 1, Heaslip *et al*., 2009). Le centriole du parasite *T. gondii* est composé de 9 microtubules mono-filaments et d'un microtubule central. Cette organisation non conventionnelle de nature hybride est spécifique des Apicomplexa (Morrissette et Sibley, 2002b).

C. Le complexe basal

Le complexe basal est une structure très particulière qui intervient dans le maintien de la forme du parasite, mais également dans l'élaboration du corps des cellules filles. Cette structure occupe l'extrémité basale du parasite sous la membrane plasmique (figure 19). Chez les parasites matures, le complexe basal est une structure conique, fermée à l'extrémité postérieure, compartimentée et stratifiée. Ce complexe basal est séparé des microtubules sous-pelliculaires d'environ 1,5 µm. C'est un élément du cytosquelette qui est construit de concert avec le cytosquelette cortical des cellules filles.

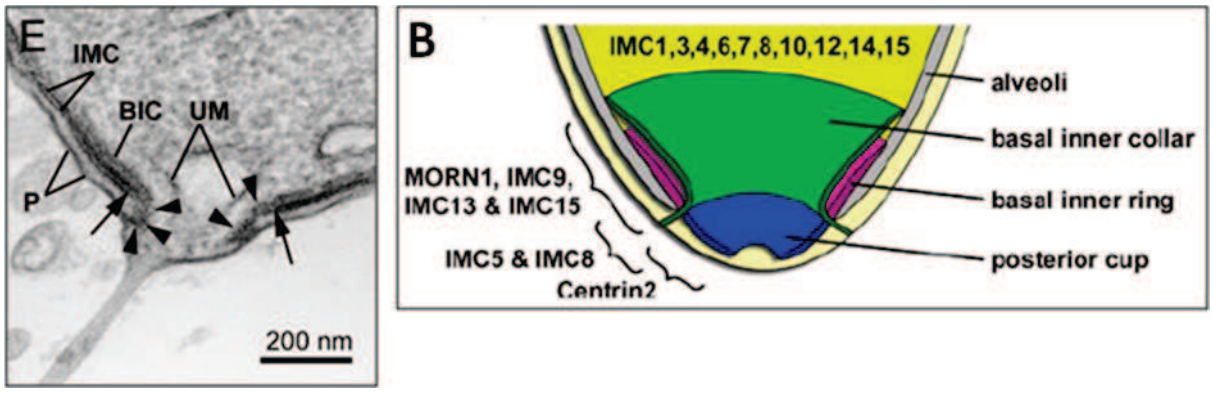


Figure 19 : Le complexe basal de *Toxoplasma gondii* (d'après Anderson-White *et al*., 2010) **E.** section longitudinale du pôle basal d'un tachyzoïte ; IMC : complexe membranaire interne ; P : membrane plasmique ; BIC : col basal interne ; UM : membranes d'origine inconnue. Les flèches marquent l'extrémité postérieure des saccules du CMI et les têtes de flèches marquent les plis au dessus du CMI. **B.** Représentation schématique du complexe basal, avec les différentes protéines connues qui le composent ; IMC : protéine du réseau filamenteux sous-pelliculaire ; MORN1 : Membrane Occupation and Recognition Nexus.

La structure de ce complexe a été très récemment détaillée grâce à des images de microscopie électronique et des études de co-localisation par immunofluorescence (Hu, 2008 ; Anderson-White *et al.*, 2010). Trois sous-structures composent ce complexe basal : une structure large appelée col basal interne sous laquelle se trouve un anneau basal interne, et à l'ultime extrémité basal se trouve la cupule postérieure. La cupule postérieure avait déjà été observée chez *T. gondii* (Mann *et al*., 2001) et un autre parasite, *Eimeria tenella* (Russell et Burns, 1984). Le col basal interne est composé des protéines TgMORN1, TgIMC9, TgIMC13 et TgIMC15. L'anneau basal interne est composé des protéines TgIMC5 et TgIMC8. La dernière sous-structure est composée de la protéine Tgcentrine2.

De nombreuse études ont permis d'attribuer à ce complexe un rôle primordial de « guide » dans la genèse du corps des cellules filles, tant au niveau de la mise en place du cytosquelette cortical que de la cytokinèse, mais également dans la ségrégation de l'apicoplaste dans le corps des cellules filles (Gubbels *et al.*, 2006 ; Hu, 2008 ; Heaslip *et al*., 2010 ; Lorestani *et al*., 2010). Il a été démontré qu'en l'absence de la protéine TgMORN1, les cellules filles sont incapables de sortir entièrement de la cellule mère à la fin de l'endodyogénie et de s'individualiser (Heaslip *et al*., 2010 ; Lorestani *et al*., 2010).

L'initiation de la formation de ce complexe semble impliquer les centrioles. Ce complexe basal est à l'heure actuelle la première structure du cytosquelette du parasite à être mise en place lors de la division parasitaire, avant la formation du cytosquelette cortical (microtubules sous-pelliculaires, réseau filamenteux sous-pelliculaire et complexe membranaire interne ; Hu, 2008).

D. Le réseau filamenteux sous-pelliculaire

Le réseau filamenteux sous-pelliculaire tapisse la face extérieure des microtubules sous-pelliculaires (figure 20). Ce réseau peut être comparé au squelette membranaire décrit chez de très nombreux Eucaryotes. Cette structure est également intimement associée au complexe membranaire interne et permet ainsi de faire le lien entre le cytosquelette cortical et la pellicule du parasite.

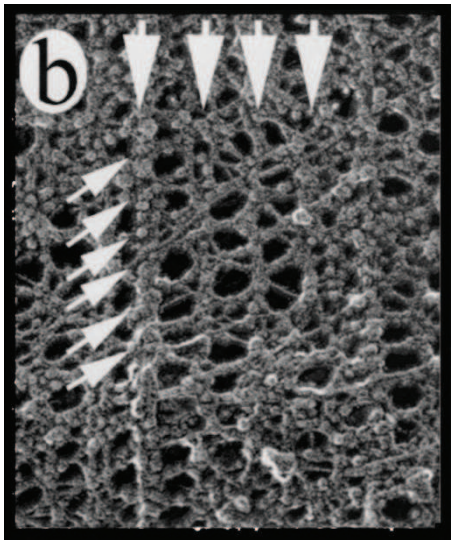


Figure 20 : Le réseau filamenteux sous-pelliculaire de *Toxoplasma gondii* (d'après Morrissette et Sibley, 2002). Les flèches indiquent les filaments horizontaux et obliques.

Les premières études de microscopie électronique sur des cryo-fractures de *T. gondii* et d'autres parasites Apicomplexa ont permis de mettre en évidence la présence d'un réseau de particules intra-membranaires (IMPs) ancrées dans les membranes du complexe membranaire

interne (Porcher et Torpier, 1977 ; Dubremetz et Torpier, 1978 ; Morrissette *et al*., 1997). Ces IMPs sont réparties de manière régulière et sont organisées en rangés simple ou double (Morrissette *et al*., 1997). Des études plus récentes ont établi que les simples et doubles rangés d'IMPs sont intimement liées au réseau filamenteux sous-pelliculaire comme chez *Sarcocystis* et *Bestoitia* (D'Haese *et al*., 1977 ; Mann et Beckers, 2001). Ces études de microscopie électronique sur des parasites traités avec différents détergents ont révélé la présence d'un réseau mécaniquement stable et associé à la pellicule du parasite. Ce réseau est constitué d'un groupe de protéines, les TgIMCs (Inner Membrane Complex proteins) apparentées à des filaments intermédiaires. Cette structure est composée de filaments entrelacés d'une longueur de 8 à 10 nm, et est retrouvé entre la face cytoplasmique du complexe membranaire interne et les microtubules sous-pelliculaires. L'espacement observé entre deux filaments longitudinaux est d'environ 32 nm. Ce réseau tapisse entièrement la face cytoplasmique du complexe membranaire interne sur toute la longueur du parasite à l'exception du pôle apical.

A l'heure actuelle, de nombreuses protéines composant ce réseau ont été découverte (TgIMC1 à TgIMC15 ; Mann et Beckers, 2001 ; Gubbels *et al*., 2004 ; Hu *et al*., 2006 ; Anderson-White *et al*., 2010). Toutes ces protéines ont des ressemblances avec des protéines de mammifères formant des filaments (« intermediate filament-like proteins ») et possèdent des domaines « coiled-coil » ainsi que des motifs répétés de type « alveolin repeats » (Gould *et al.,* 2008). Certaines d'entre elles possèdent également des homologies avec des articulines, composants majeurs du squelette membranaire des algues et de certains protistes. De plus, certaines de ces protéines ont des homologies avec des protéines d'autres Apicomplexa, notamment *P. falciparum*, déterminant ainsi la présence probable d'un squelette membranaire similaire chez d'autres parasites de ce phylum. Chez *P. berghei*, le « Knock-Out » de *PfIMC1a* conduit à des défaut dans la forme, la taille, le développement, l'invasion et la motilité des sporozoïtes (Khater *et al.*, 2004).

Les protéines TgIMCs sont retrouvées dans les parasites matures soit au niveau du réseau filamenteux sous-pelliculaire (TgIMC1, TgIMC2, TgIMC3, TgIMC4, TgIMC6, TgIMC7, TgIMC8, TgIMC10, TgIMC12, TgIMC14 et TgIMC15), soit au niveau du complexe basal (TgIMC5, TgIMC8, TgIMC9, TgIMC13 et TgIMC15). La fonction de chacune d'entre elles et leurs interactions respectives n'ont pour le moment pas encore été déterminées. Cependant, certaines semblent principalement associées à la formation du cytosquelette cortical des cellules filles (TgIMC3, TgIMC6 et TgIMC10), et ne se retrouvent qu'en faible proportion dans le réseau filamenteux sous-pelliculaire des parasites matures. De plus, la protéolyse des protéines TgIMCs semble intervenir dans la maturation et la stabilité du réseau sous-pelliculaire lors de la réplication des parasites (Hu *et al*., 2002a ; Mann *et al*., 2002).

VIII. La biogenèse des cellules filles

Le premier organite subcellulaire se divisant chez *T. gondii* est l'appareil de Golgi (Pelletier *et al*., 2002) dont la division est associée à celle du centrosome (Hartmann *et al*., 2006). Les centrioles vont ensuite se diviser suite à la migration du centrosome de la cellule mère au pôle basal du noyau (Nishi *et al*., 2008). TgIMC15 apparait alors à proximité des centrosomes (Anderson-White *et al*., 2010). Cette protéine marque l'étape la plus précoce de la formation du cytosquelette cortical des cellules filles. La division très précoce de l'appareil de Golgi semble être un pré-requis dans l'établissement d'un système sécrétoire polarisé nécessaire à la formation du corps des cellules filles, plus particulièrement le CMI (Striepen *et al*., 2007).

L'initiation de la formation des éléments du cytosquelette des cellules filles débute ensuite autour des centrioles. Tout d'abord, deux anneaux composés de la protéine TgMORN1 sont formés et entourent les centrioles dupliqués (Hu, 2008). Les premières protéines composant le réseau filamenteux sous pelliculaire et le complexe apical du parasite vont apparaître à l'intérieur et autour des deux anneaux « TgMORN1 ». A l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible pour déterminer si les premières vésicules provenant de l'appareil de Golgi pour former *de novo* le CMI des futures cellules filles, sont présentes au niveau de cette anneau « TgMORN1 ». L'apicoplaste s'allonge ensuite et vient se positionner au dessus du noyau grâce aux centrosomes (Nishi *et al*., 2008). Le noyau commence à se diviser suivant un cycle complexe durant lequel la membrane nucléaire reste intacte (processus de cryptomitose) et les chromosomes peu condensés (Dubremetz *et al.*, 1973 ; White *et al*., 2005). La fission nucléaire fait intervenir une structure particulière des Apicomplexa, le centrocone, associé aux centrosomes (Sheffield et Melton, 1968 ; Dubremetz *et al.*, 1973).

Le complexe apical (conoïde et anneaux polaires) apparaît ensuite et détermine ainsi la polarité des cellules filles. Les anneaux « TgMORN1 » commence alors à se déplacer vers le pôle basal de la cellule mère en s'éloignant du complexe apical, pour établir *de novo* le cytosquelette membranaire des deux cellules filles. La première vésicule aplatie, marquant le premier signe de la mise en place du CMI des cellules filles, apparait sous le conoïde. Cette vésicule est associée à un petit nombre de microtubules sous-pelliculaires en cours d'élongation (Sheffield et Melton, 1968 ; Dubremetz ; 1973).

La progression de l'anneau polaire basal vers le pôle basal de la cellule mère permet de former le CMI et le réseau filamenteux sous-pelliculaire des cellules filles (Anderson-White *et al*., 2010). La formation du CMI des cellules filles nécessite la présence et la stabilité des microtubules sub-pelliculaires (Morrissette et Sibley, 2002a). Une protéine actin-like, TgALP1 (Actin Like Protein) semble être impliquée dans les étapes très précoces de l'élaboration des CMIs des cellules filles (Gordon *et al*., 2008, 2010). Cette protéine interviendrait soit en escortant les vésicules provenant de l'appareil de Golgi vers le futur CMI, soit en agençant ces vésicules dans la membrane du CMI durant

les premières étapes de la biogenèse autour du conoïde. Le rôle d'une protéine Rab-GTPase spécifique des Alveolata, TgRab11B, dans le transport antérograde de vésicules issues du cis-Golgi vers le futur CMI des cellules filles a été décrit (Agop-Nersesian *et al*., 2010).

Certaines protéines du réseau filamenteux sous-pelliculaire (TgIMC5, TgIMC8, TgIMC9 et TgIMC13) sont ensuite relocalisées entièrement au niveau de l'anneau polaire basal des cellules filles, lors de sa contraction.

L'élongation du corps des cellules filles va permettre de scinder en deux l'apicoplaste puis le noyau, afin de distribuer de manière équivalente le matériel génétique de ces deux organites dans les cellules filles matures. En se divisant le noyau va s'entourer du réticulum endoplasmique qui se scinde alors en deux, suivi immédiatement de la division de la mitochondrie (Nishi *et al*., 2008). C'est au cours de cette étape que les organites apicaux (rhoptries, micronèmes et granules denses) vont commencer à se former *de novo* au pôle apical des parasites filles (Nishi *et al*., 2008).

La fin de la cytokinèse est marquée par la contraction finale de l'anneau polaire basal. Les parasites filles vont alors s'entourer progressivement de la membrane plasmique de la cellule mère (Morrissette et Sibley, 2001). Cette étape nécessite l'intervention de la GTPase, TgRab11A (Agop-Nersesian *et al*., 2009). Le proto-glidéosome serait associé aux vésicules lipidiques contenant les protéines SAG destinées à former la membrane plasmique des cellules filles. TgRab11A prendrait en charge ces vésicules à la sortie de l'appareil de Golgi, par une interaction directe avec TgMLC1, et les conduirait vers la membrane plasmique des futures cellules filles. Lorsque ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique des cellules filles, le proto-glidéosome serait relâché et s'associerait avec TgGAP50.

Lorsque les cellules filles sont matures et sortent de la cellule mère, les micronèmes, les rhoptries, du conoïde, du CMI et des microtubules sous-pelliculaires de la cellule mère sont transférés et désassemblés au pôle basal des parasites filles pour former le corps résiduel. Une partie du matériel contenu dans ce corps résiduel semble être recyclé par les parasites filles au cours de leur réplication.

IX. Trafic intracellulaire

La simplicité de l'appareil sécrétoire (réticulum endoplasmique/appareil de Golgi), la polarité antéro-postérieure des organites spécifiques tels que l'apicoplaste, les rhoptries et les micronèmes, ainsi que l'organisation spatio-temporelle de l'apparition de ces organites au cours de l'endodyogénie chez *T. gondii*, font de ce parasite un modèle de choix pour l'étude du trafic intracellulaire. De plus, les outils moléculaires (anticorps, étiquettes GFP, HA, c6Myc, etc) et la facilité d'appliquer les techniques de génétique inverse couplées à l'observation morphologique (microscopie simple, confocale et ultrastructure) permettent de décortiquer le trafic et le tri des

protéines parasitaires. Le trafic et le tri des protéines à travers cet appareil sécrétoire, puis leurs transports vers les différents compartiments sont basés sur la présence de différents signaux d'adressage au sein de leurs séquences peptidiques.

A. L'appareil sécrétoire

Le mode d'invasion polarisé du parasite nécessite la présence des rhoptries et des micronèmes au pôle apical. De ce fait, la voie de sécrétion des protéines parasitaires se fait selon l'axe basal/apical à partir de l'appareil de Golgi (figure 21). Le noyau du parasite est entouré du réticulum endoplasmique (RE) concentré principalement au pôle basal du noyau. Le RE est réduit à l'enveloppe nucléaire chez les parasites Apicomplexa, comme chez d'autres Eucaryotes inférieurs comme *Pichia pastoris* (Rossanese *et al*., 1999). Le point de sortie des vésicules du RE est localisé au pôle apical du noyau. L'appareil de Golgi est situé au pôle apical du noyau, adjacent au point de sortie des vésicules du RE (Hager *et al.,* 1999), et est constitué de trois à cinq vésicules aplaties. Des observations de microscopie électronique ont montré que des vésicules bourgeonnant au pôle apical de l'appareil de Golgi ressemblent aux vésicules du réseau trans-golgien. Ce réseau trans-golgien est constitué d'endosomes précoces, possédant des marqueurs protéiques tels que TgRab5 et TgRab51, et d'endosomes tardifs, possédant un marqueur protéique, la protéine TgRab7 (Stenmark et Olkkonen, 2001 ; Harper *et al*., 2006). Ces endosomes sont impliqués dans la biogenèse des pré-rhoptries et des micronèmes. Des vésicules circulant entre les différents saccules de l'appareil de Golgi ont également été observés (Karsten *et al*., 1998).

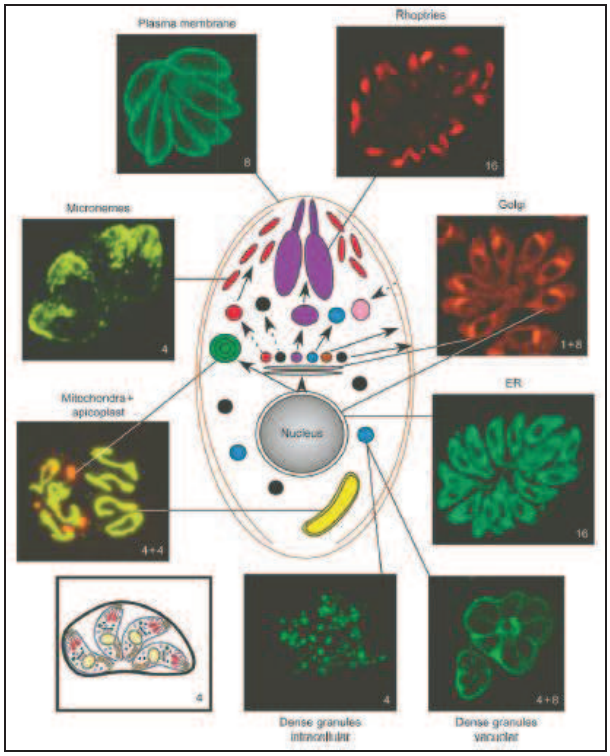


Figure 21 : Trafic protéique chez *Toxoplasma gondii* (d'après Sheiner et Soldati, 2008). Les flèches pleines indiquent les voies de trafic connues et les flèches pointillées, les voies de trafic putatives.

B. Les protéines dans le réticulum endoplasmique

Les protéines des rhoptries, micronèmes et granules denses possèdent un signal peptidique amino-terminal qui leur permet d'entrer dans la voie de sécrétion par translocation de cette séquence dans la membrane du RE, le peptide signal. Un homologue d'un des composants de la machinerie de translocation, TgBiP (Binding Protein ; Hager *et al.,* 1999) et des protéines chaperonnes intervenant dans le contrôle de la qualité des *N*-glycoprotéines et des protéines plus classiques, telles que la calnexine et Hsp70 respectivement, ont été retrouvées dans le génome du parasite (Banerjee *et al*., 2007). Le signal de rétention dans le RE, commun aux Eucaryotes, HDEL, est retrouvés dans les séquences peptidiques des protéines résidentes du RE (Hager *et al*., 1999). La protéine qui intervient dans la reconnaissance du signal HDEL, TgERD2, a également été identifiée (Pfluger *et al*., 2005).

C. Du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi

Les parasites Apicomplexa possèdent quelques protéines impliquées dans le trafic de vésicules entre le RE et l'appareil de Golgi, comme *Arf1* et *Sar1* (Ajioka *et al*., 1998). *T. gondii* possède les gènes codant les composants du complexe COP II recouvrant les petites vésicules qui transitent du RE vers l'appareil de Golgi (Hager *et al*., 1999). De même, les gènes codant les protéines du complexe COP I, impliqué dans le transport rétrograde des vésicules golgienne vers le RE sont retrouvés dans le génome du parasite (Sheiner et Soldati, 2008). Ces protéines prennent en charge les protéines des organites sécrétoires par le biais de leur motif acide/hydrophobe/acide présent dans leur domaine cytoplasmique (Joiner et Roos, 2002).

D. Le tri des protéines dans l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi et le réseau trans-golgien semblent former un carrefour de tri des protéines destinées à être adressées à leurs compartiments spécifiques, ou à être recyclées vers le RE. De nombreuses protéines intervenant dans le mécanisme de tri tels que ARF-1, (Liendo et Joiner, 2000), β-COP (Hager *et al.,* 1999), Sec63, Sec61, Sec 11 (Ajioka *et al*., 1998) ont été caractérisées chez *T. gondii*. Il a été démontré par des traitements à la bréfeldine A qui dissocie l'appareil de Golgi, qu'une protéine fixée à la membrane plasmique par un ancrage GPI, TgSAG1, est transporté vers la membrane plasmique par la voie de sécrétion constitutive empruntant le RE et l'appareil de Golgi (Karsten *et al*., 1998). La protéine GRASP (Golgi ReAssembly Stacking Protein, homologue de la protéine de mammifère GRASP55) un marqueur des compartiments cis et médian de l'appareil de

Golgi a été identifiée et une souche parasitaire transgénique exprimant la protéine GRASP-RFP de manière stable a été générée (Pelletier *et al*., 2002 ; Pfluger *et al*., 2005).

E. Le réseau trans-golgien et l'adressage vers les pré-organites

Les protéines de rhoptries et de micronèmes sont transportées via des compartiments ressemblant aux endosomes (Ngo *et al*., 2003 ; Harper *et al*., 2006). Il semble que le trafic correct de ces protéines est lié à la régulation temporelle de leur expression et qu'une corrélation existe entre leur transport et la biogenèse des rhoptries et micronèmes au cours de l'endodyogénie (El Hajj *et al*., 2008). Les mécanismes impliqués dans la biogenèse et la maintenance de ces organites sont peu connus. Il est également admis que les rhoptries et micronèmes dérivent du bourgeonnement de l'appareil de Golgi lors de la réplication parasitaire (Striepen *et al*., 2007).

TgRab6 a été identifié dans le transport antérograde et rétrograde des vésicules post-golgiennes vers les granules denses (Stedman *et al*., 2003). Il a été démontré qu'une protéine apparentée aux dynamines, TgDrpB (Dynamin-related protein B), un homologue des GTPases impliquées chez les Eucaryotes dans le trafic vésiculaire joue un rôle important dans la synthèse *de novo* des rhoptries et des micronèmes durant la réplication parasitaire (Breinich *et al*., 2009). D'autres GTPases ont également été identifiées dans le génome des parasites Apicomplexa (Langsley *et al*., 2008). Une protéine à domaine adaptine, TgAP 1 (Adaptin-Potein 1), impliquée dans le transport de vésicules golgiennes recouvertes de clathrine chez les Eucaryotes a été découverte et elle semble intervenir dans la biogenèse des rhoptries à partir du compartiment post-golgien (Ngô *et al*., 2003).

Deux autres études plus récentes ont caractérisé les fonctions de deux protéines Rab GTPase, TgRab11A et TgRab11B, dans le transport de vésicules golgiennes permettant de mettre en place le complexe membranaire interne (TgRab11B ; Agop-Nersesian *et al*., 2010), la membrane plasmique et le proto-glidéosome (TgRab11A ; Agop-Nersesian *et al*., 2009) durant la réplication du parasite. Une autre protéine, TgALP1 (Actin-Like Protein 1), localisée dans des vésicules de transport proche de l'enveloppe nucléaire, joue également un rôle important dans la mise en place précoce du complexe membranaire interne lors de la réplication (Gordon *et al*., 2008). Enfin, une protéine transmembranaire de type II, TgASP1 (ASpartyl Protease 1), a été localisée dans des vésicules proches du complexe membranaire interne en formation dans les cellules filles durant la réplication (Shea *et al*., 2007).

F. Trafic des protéines des organites apicaux à travers l'appareil sécrétoire

Les protéines des rhoptries et des micronèmes empruntent la voie de sécrétion régulée vers leurs compartiments finaux. Ces protéines possèdent des éléments d'adressages spécifiques au sein de leurs séquences peptidiques. En ce qui concerne le trafic des protéines de micronèmes, il a été

établi que la préformation des différents complexes TgMIC1/TgMIC4/TgMIC6, TgMIC3/TgMIC8 et TgMIC2/TgM2AP est nécessaire au transport du RE vers l'appareil de Golgi puis vers les micronèmes (Rabenau *et al*., 2001 ; Reiss *et al*., 2001 ; Meissner *et al*., 2002a). Chacun de ces complexes contient au moins une protéine transmembranaire de type I permettant d'ancrer chacun des complexes dans les membranes des vésicules du réticulum vers le Golgi puis vers les micronèmes matures (Soldati *et al.,* 2001). Ces protéines qui escortent les cargo protéiques possèdent des domaines particuliers impliqués dans la localisation au sein des micronèmes et dans le contrôle de la qualité des complexes dans le RE (Di Cristina *et al*., 2000 ; Saouros *et al*., 2005).

Les protéines de rhoptries sont localisées soit dans le bulbe soit dans le cou de l'organite, en fonction de leur rôle dans l'invasion (TgRONs) ou dans l'établissement de la vacuole parasitophore (TgROPs). Aucune protéine n'a été observée dans les deux sous-compartiments en même temps jusqu'à présent et il n'existe pas de délimitation franche à l'intérieur de l'organite (Boothroyd et Dubremetz, 2008), ce qui implique l'existence des mécanismes de tri particulier qui n'ont pas été totalement définis pour le moment. Cependant, de nombreuses protéines de rhoptries sont synthétisées sous forme de pro-protéines et la maturation de ces pro-domaines a lieu dans les pré-rhoptries. Pour les membres de la famille TgROP2, il existe une séquence signal commune qui est nécessaire à l'adressage vers les pré-rhoptries par les vésicules golgiennes recouvertes de clathrine, ce qui requiert une machinerie de protéines adaptatrices de type AP1 (Hoppe et Joiner, 2000). Ce motif d'adressage se trouve dans le domaine cytoplasmique des protéines matures. Pour d'autres protéines de rhoptries, le pro-domaine est suffisant pour l'adressage correct dans l'organite.

En revanche, les protéines de granules denses ne semblent pas contenir un signal d'adressage spécifique (Karsten *et al*., 1998 ; Chaturvedi *et al*., 1999). De plus, toute protéine recombinante fusionnée à un peptide signal permettant un transport dans le RE est transportée dans les granules denses par le biais de la voie de sécrétion constitutive (Joiner et Roos, 2002), de même que les protéines incorrectement conformées, portant une mutation dans le signal d'adressage spécifique (Striepen *et al*., 1998 et 2001 ; Reiss *et al*., 2002) ou même sans aucun signal d'adressage spécifique (Opitz *et al.,* 2002).

Toxoplasma gondii et *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation est une modification post-traductionnelle largement répandue chez un grand nombre d'organismes Eucaryotes. Cette modification permet une bonne conformation des protéines *N*-glycosylées, leur stabilité, leur adressage correct vers les organites intracellulaires, la membrane plasmique ou le milieu extracellulaire, après leur passage dans l'appareil de Golgi où se déroule la maturation de la *N*-glycoprotéine (Dempski et Imperiali, 2002). Toutefois, la *N*-glycosylation peut également jouer des fonctions biologiques importantes dans les mécanismes de reconnaissance cellule-cellule ou protéines-protéines, mais aussi intervenir dans la solubilité de la protéine ou dans la résistance à la dégradation lysosomale (Kukuruzinska *et al*., 1998 ; Roth *et al*., 2002 ; Helenius et Aebi, 2004).

I. Synthèse des *N*-glycoprotéines chez les Eucaryotes

Une description exhaustive de la voie de synthèse des *N*-glycannes a été décrite chez la levure *Sacchamoryces cerevisiae* (figure 22 ; Roth, 2002 ; Lehle *et al*., 2006). La *N*-glycosylation se déroule dans le réticulum endoplasmique (RE) et de façon concomitante à la traduction de l'ARNm par les ribosomes ancrés au RE.

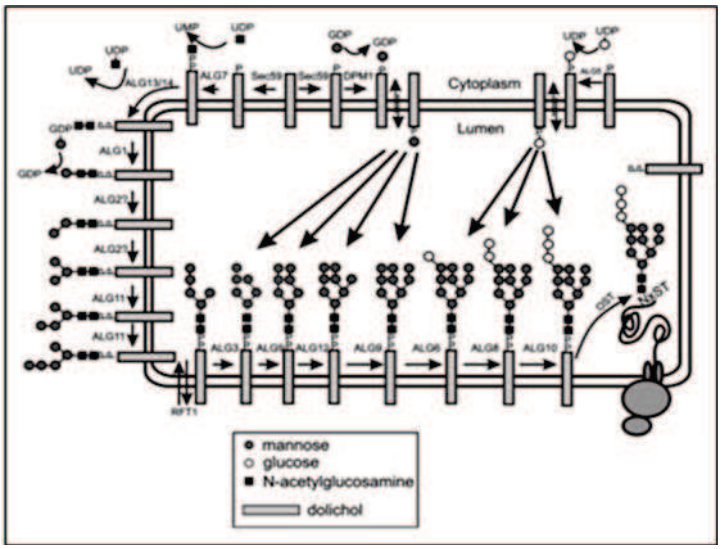


Figure 22 : Représentation schématique de la voie de synthèse des *N*-glycannes chez *Saccharomyces cerevisiae* (d'après Garénaux *et al*., 2008) ; ALG : Asparagin-Linked Glycosylation ; OST : complexe oligosaccharyl transférase ; UDP : Uracile DiPhosphate ; UMP : Uracile MonoPhosphate ; GDP : Guanidine DiPhosphate

Cette maturation protéique se caractérise par l'ajout du *N*-glycanne ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) en bloc, sur le résidu asparagine contenu dans la séquence spécifique consensus -Asn-X-Ser/Thr- qui est conservée chez tous les Eucaryotes. Chez les Eucaryotes, on retrouve des structures *N*-glycanniques de type riche en mannose, hybride et complexe (figure 23). Ces deux dernières structures résultent de la maturation de la structure riche en mannose dans l'appareil de Golgi.

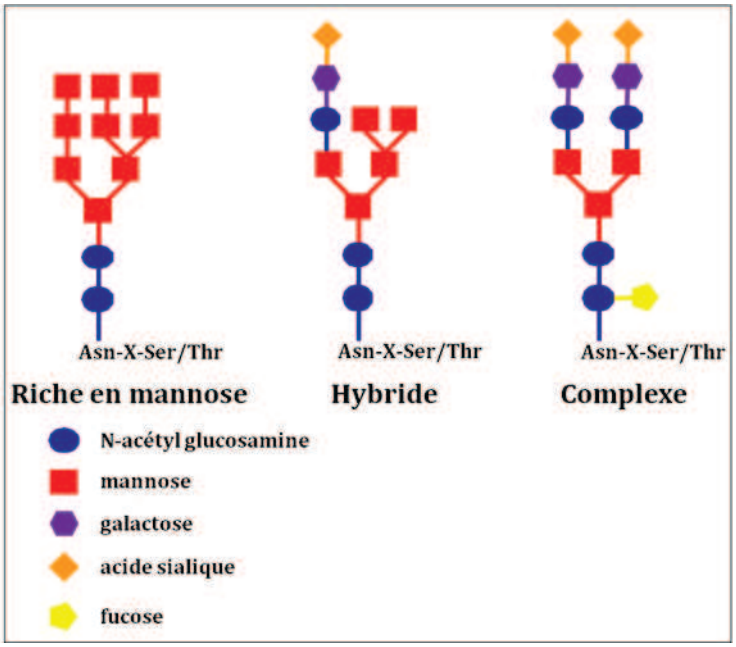


Figure 23 : Les différentes structures *N*-glycanniques présentes chez les Eucaryotes.

A. Synthèse d'une structure *N*-glycannique

Dans le réticulum endoplasmique, le *N*-glycanne est une structure oligosaccharidique comprenant des résidus de glucose (Glc), de mannose (Man) et de N-acétyl glucosamine (GlcNAc) qui est liée par un groupe pyrophosphate à un transporteur lipidique saturé en α de type polyisoprenoïde, le dolichol. Le dolichol phosphate activé (Dol-P) agit comme transporteur lipidique dans la formation du *N*-glycanne, mais aussi comme accepteur dans la synthèse des sucres donneurs Dol-P-Man (dolichol phosphate mannose) et Dol-P-Glc (dolichol phosphate glucose) à partir du GDP-Man libre et de l'UDP-Glc libre dans le cytoplasme, respectivement.

L'initiation de la synthèse du précurseur oligosaccharidique débute du côté cytoplasmique du RE par la maturation du Dol-P ancré dans la membrane du RE. Le Dol-PP-GlcNAc est formé par une UDP-GlcNAc N-acétylglucosaminephosphotransférase (ALG7), puis convertit en Dol-PP-$GlcNAc_2$ par une GDP-GlcNAc:GlcNAc beta-1,4-N-acétylglucosaminyltransférase (ALG13, ALG14), à partir de l'UDP-GlcNAc libre dans le cytoplasme. Ensuite, une liaison β entre le mannose du GDP-Man libre dans le cytoplasme et le GlcNAc accepteur du Dol-PP-$GlcNAc_2$ est assurée par une 4-beta-

mannosyltransférase (ALG1). Les quatre résidus qui suivent le mannose sont transférés sur le glycolipide en formation selon un ordre déterminé à partir du GDP-Man libre. Successivement, une 3-alpha-mannosyltransférase (ALG2) pour la liaison α1,3 entre deux mannoses, une 6-alpha-mannosyltransférase (ALG2) pour la liaison α1,6 entre deux mannoses et une 2-alpha-mannosyltransférase (ALG11) pour les liaisons α1,2 entre deux mannoses, permettent d'aboutir au glycolipide Dol-PP-$GlcNAc_2Man_5$. Il y alors un « flip » permettant de faire passer le glycolipide de l'extérieur de la membrane du RE vers la lumière du RE. Cette étape est assurée par la protéine RFT1 (Helenius *et al*., 2002). Le Dol-PP-$GlcNAc_2Man_5$ va alors être converti en Dol-PP-$GlcNAc_2Man_9$ par des dolichyl-phosphate-mannose-alpha-mannosyltransférases (ALG3, ALG9 et ALG12), utilisant comme donneur le Dol-PP-Man, ancré à la membrane du RE. Les trois résidus de glucose terminaux sont ajoutés au glycolipide par des dolichyl-phosphate-glucose-alpha-glycosyltransférases (ALG6, ALG8, ALG10), utilisant le donneur Dol-PP-Glc également ancré à la membrane du RE.

Les structures *N*-glycanniques possèdent une large diversité, tant dans leurs compositions que dans leurs fonctions. En effet, on retrouve à priori, à travers les organismes eucaryotes supérieurs étudiés, le même corps glycannique initial lié au dolichol pyrophosphate (Dol-PP) dans le RE, le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Le *N*-glycanne peut être décomposé en deux séquences : la première, assemblée dans le cytoplasme ($Man_3GlcNAc_2$), est la partie commune aux différents types de *N*-glycannes connus aujourd'hui chez les Eucaryotes supérieurs; la seconde, assemblée dans la lumière du RE, à partir du $Man_5GlcNAc_2$, est une structure plus flexible sujette à un remodelage dans le RE et dans l'appareil de Golgi, et enfin, elle varie selon le type de *N*-glycanne et les organismes cellulaires.

B. Transfert du *N*-glycanne sur la protéine en cours de synthèse

Le transfert de la chaîne oligosaccharidique ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) du glycolipide Dol-PP-$Glc_3Man_9GlcNAc_2$, sur la protéine naissante par le complexe oligosaccharyl transférase (OST) ancré dans la membrane du RE, constitue la première étape de la synthèse des *N*-glycoprotéines. La présence des trois résidus de glucose terminaux est importante pour l'efficacité du transfert. Les gènes codant les 9 protéines représentées dans ce complexe ont été identifiés et caractérisés chez la levure et d'autres Eucaryotes supérieurs (*Ost1p* à *Ost6p, Stt3, Wbp1, Swp1*). Ces protéines interagissent entre elles et trois des sous-unités du complexe sont *N*-glycosylées (Ost1p, Wbp1p, Stt3p), mais seule la *N*-glycosylation de Stt3p est essentielle *in vivo* et *in vitro*. Chacune des protéines du complexe possède un ou plusieurs domaines transmembranaires. Il a été démontré que deux isoformes du complexe existent dans le RE. Ces deux isoformes possèdent alternativement Ost3p ou Ost6p, ainsi que toutes les autres protéines citées ci-dessus. Ost1p, Ost2p, Stt3p, Wbp1p et Swp1p sont essentielles à la formation et l'activité du complexe OST, alors que Ost3p, Ost4p, Ost5p et Ost6p sont requises pour l'activité optimale du complexe. Stt3p est la sous-unité catalytique du complexe

OST permettant de transférer le *N*-glycanne. Wbp1p est la sous-unité qui reconnait le dolichol du glycolipide $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Stt3p et Wbp1p sont associées dans le complexe OST. Il semble que les acides aminés adjacents au site consensus soit également important pour la reconnaissance de cette séquence -Asn-X-Ser/Thr- par le complexe OST.

Le transfert du *N*-glycanne a lieu dès que le résidu d'asparagine traverse le translocon et apparait dans le RE, soit environ 65 acides aminés plus loin que le codon en cours de traduction par le ribosome (Whitley *et al*., 1996 ; Chavan et Lennarz, 2006). Une fois le *N*-glycanne transféré, l'α-glucosidase I (ancrée à la membrane du RE) et l'α-glucosidase II (soluble dans la lumière du RE) vont permettre de retirer les trois glucoses terminaux.

C. Première étape de maturation de la *N*-glycoprotéine

Les *N*-glycoprotéines déglucosylées peuvent être reglucosylées de manière transitoire par une UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT) avant leur exportation vers l'appareil de Golgi. Cette enzyme a été découverte la première fois chez *Trypanosoma cruzi* (Caramelo *et al*., 2003). Le contrôle de la qualité du *N*-glycanne fixé à la protéine se fait via un système de déglucosylation et reglucosylation dans le RE. La plupart des glycoprotéines sont soumises à cette balance de déglucosylation/reglucosylation (Jones *et al*., 2005) découverte en premier lieu chez les Trypanosomatidae. La conformation de la protéine est alors vérifiée par des lectines et des chaperonnes avant d'être exportée vers les vésicules du cis-Golgi pour subir d'autres types de maturation. Les α-mannosidases I et II peuvent éliminer des résidus de mannose (de quatre à six mannoses selon le type de *N*-glycanne). Ce processus n'est pas nécessaire pour la maturation des *N*-glycoprotéines dans l'appareil de Golgi, puisqu'il existe également des endo α-mannosidases présentes dans l'appareil de Golgi, mais il peut être un moyen de rétention et de dégradation des *N*-glycoprotéines dans le RE.

D. Maturation du *N*-glycanne des *N*-glycoprotéines dans l'appareil de Golgi

L'ajout de différents monosaccharides dans un ordre donné tels que des résidus de fucose, d'acide sialique, de galactose ou de N-acétyl glucosamine dans l'appareil de Golgi permet d'élaborer des structures *N*-glycanniques de type complexes ou hybrides. Les enzymes catalysant l'ajout de ces différents résidus saccharidiques sont distribuées de manière ordonnée dans les différents saccules de l'appareil de Golgi. Ces enzymes ont été caractérisées dans les cellules de mammifères (Roth, 2001). Les glycoprotéines sont ensuite adressées aux compartiments subcellulaires adéquats, par des vésicules dérivant du compartiment trans-golgien.

E. Contrôle qualité des *N*-glycoprotéines dans le RE

Le contrôle qualité de la conformation des *N*-glycoprotéines est très important et évite d'exporter des protéines ou des complexes protéiques mal conformés (Caramelo et Parodi, 2007). Les *N*-glycoprotéines mal conformées peuvent être prisent en charge par des chaperonnes permettant de les re-conformer correctement. Cependant, un défaut trop important dans la conformation des *N*-glycoprotéines conduit à leur dégradation via le système ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation) menant au protéasome ou à leur agrégation dans le cytoplasme. La calnexine et la calréticuline sont des lectines résidentes du RE intervenant dans cette étape de contrôle qualité (figure 24). La calnexine est une protéine transmembranaire de type I non glycosylée et la calréticuline est une protéine soluble. La calréticuline et le domaine luminale de la calnexine possèdent de fortes homologies dans leur site de haute affinité pour le calcium. Ces protéines sont retenues dans la lumière du RE par la séquence carboxy terminale RKPRRE pour la calnexine et la séquence KDEL pour la calréticuline. Ces lectines sont des protéines chaperonnes non conventionnelle puisqu'elles n'interagissent pas directement avec la partie protéique des *N*-glycoprotéines, mais avec le *N*-glycanne. Elles interagissent toutes deux avec le glucose terminal des oligosaccharides de type riche en mannose monoglucosylés ($Glc_1Man_{5-9}GlcNAc_2$) des *N*-glycoprotéines solubles et membranaires présentes dans le RE. L'UGGT est la seule protéine interagissant directement avec la partie protéique de la *N*-glycoprotéine, jouant ainsi un rôle essentiel dans le contrôle de la conformation de la *N*-glycoprotéine.

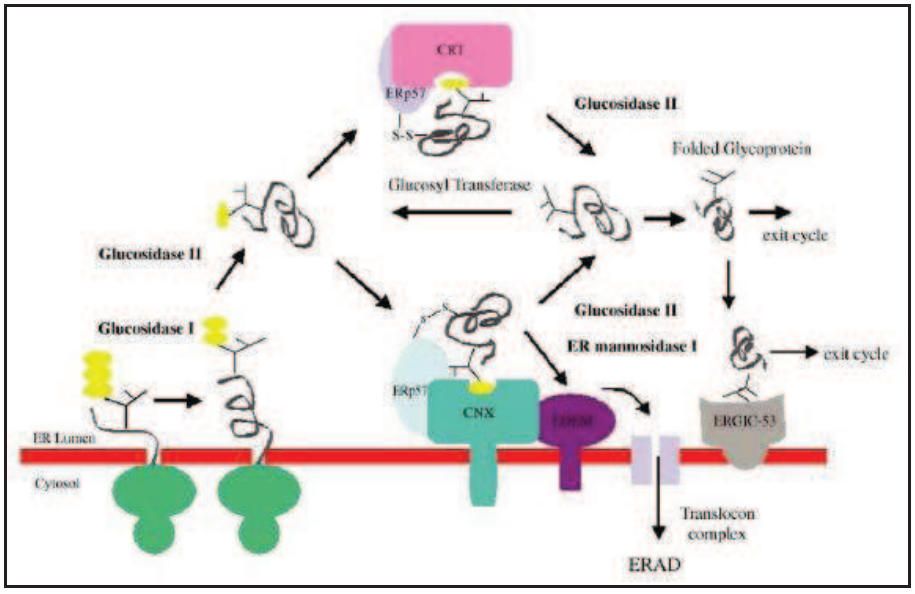


Figure 24 : Le cycle calnexine/calréticuline dans le contrôle qualité des N-glycoprotéines (d'après Jones *et al.*, 2005) ; CRT : calréticuline, CNX : calnexine, ER : réticulum endoplasmique, ERGIC : Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment protéine, EDEM : ER-Degradation Enhancing-Mannosidase-like protéine, ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation.

Le contrôle qualité débute lorsqu'il ne reste plus qu'un glucose sur le *N*-glycanne transféré sur la *N*-glycoprotéine. La calnexine et la calréticuline interagissent alors avec leur substrat pour vérifier la conformation de la *N*-glycoprotéine, grâce à la formation de pont disulfure transitoire par ERp57, une thiol oxydoréductase. Le complexe calnexine/calréticuline/ERp57 est dissocié lorsque le dernier glucose du *N*-glycanne de la *N*-glycoprotéine correctement conformée est éliminé par l'α-glucosidase II. La *N*-glycoprotéine est alors exportée vers l'appareil de Golgi grâce à des chaperonnes dont ERGIC-53. Dans le cas d'une *N*-glycoprotéine mal conformée, le *N*-glycanne est reglucosylé par l'UGGT et un second cycle de contrôle qualité peut se mettre en place. L'adressage vers la voie de dégradation par le protéasome des *N*-glycoprotéines mal conformées semble être lié à l'action des endo α-mannosidases résidentes du RE. La *N*-glycoprotéine mal conformée peut être dégradée dans le protéasome où elle subit alors une déglycosylation totale par une *N*-glycannase soluble présente dans le cytoplasme. Ce type de *N*-glycoprotéine mal conformée sort du RE par l'intermédiaire du complexe Sec61.

II. Nature des précurseurs glycolipidiques de la *N*-glycosylation chez les Eucaryotes inférieurs

Le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ est l'oligosaccharide synthétisé chez de très nombreux Eucaryotes, cependant de nombreux protistes sont incapables de former ce type d'oligosaccharides. En effet, ces organismes synthétisent et transfèrent des oligosaccharides plus courts pour former des *N*-glycoprotéines. De ce fait, le nombre de gènes *ALGs* est plus ou moins important en fonction des *N*-glycannes formés. Cependant, tous les Eucaryotes inférieurs cités ci-dessous possèdent au moins les gènes *ALGs* permettant de former les glycolipides au niveau de la face cytoplasmique du RE (figure 25 ; Dol-PP-$GlcNAc_2Man_5$), à l'exception de *Giardia lamblia* et *Plasmodium falciparum*.

Genus/species abbreviation	Cytosol GlcNAc	Cytosol Man				ER lumen Man				ER lumen Glc				OST
	Alg7	Alg1	Alg2	Alg11	Rft1	Alg3	Alg9	Alg12	Dpm1	Alg5	Alg6	Alg8	Alg10	STT3*
Sc/Hs/Dd	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	1/2/1
Tb/Tc/Lm/Cn	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	y/y/n/y	yes	no	no	no	no	3/1/4/1
Eh/Tv	yes	yes	yes	yes	yes	no	no	no	y/n	n/y	no	no	no	2/3
Tt/Cp/Tg	yes	yes	yes	y/y/n	y/y/n	no	no	no	yes	yes	yes	y/n/y	y/n/y	1/1/1
Pf/Gl	yes	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	no	no	no	1/1
Ec	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	no	no	no	0

Figure 25 : Les glycosyltransférases prédites chez certains organismes Eucaryotes supérieurs et inférieurs (d'après Samuelson *et al.,* 2005) ; Sc : *Saccharomyces cerevisiae,* Hs : *Homo sapiens,* Dd : *Dictyostelium discoideum,* Tb : T*rypanosoma brucei,* Tc : *Trypanosoma cruzi,* Lm : *Leishmania mexicana,* Cn : *Cryptococcus neoformans,* Eh : *Entamoeba histolytica,* Tv : *Trichomonas vaginalis,* Tt : *Tetrahymena thermophilia,* Tg : *Toxoplasma gondii,* Cp : *Cryptosporidium parvum,* Pf : *Plasmodium falciparum,* Gl : *Giardia lamblia,* Ec :

Encephalitozoon cuniculi. Les chiffres situés dans la colonne STT3 correspondent aux nombres de sous-unités STT3 présentent dans les complexes OST des organismes cités.

A. Structure des *N*-glycannes

Les Kinetoplastidae tels que *Trypanozoma cruzi* et *Leishmania mexicana* synthétisent des oligosaccharides du type $Man_9GlcNAc_2$ et $Man_6GlcNAc_2$ respectivement. Les Ciliae tels que *Tetrahymena pyriformis* et *Toxplasma gondii* synthétisent des oligosaccharides du type $GlcNAc_2$-Man_5-Glc_3 (de la Canal et Parodi, 1987 ; Parodi, 1993 ; Luk *et al*., 2008). Des études de bioinformatiques et de biochimies menées chez d'autres organismes Eucaryotes inférieurs, ont démontré que *Giardia lamblia* et *Plasmodium falciparum* sont capables de synthétiser du Dol-PP-$GlcNAc_2$, *Trichomonas vaginalis* et *Entamoeba histolytica* du Dol-PP-$GlcNAc_2Man_5$, *Cryptosporidium parvum* du Dol-PP-$GlcNAc_2Man_5Glc_1$, *Dictyostelium discoideum* du Dol-PP-$GlcNAc_2Man_9Glc_3$ et *Cryptococcus neoformans* du Dol-PP-$GlcNAc_2Man_9$ (figure 26 ; Samuelson *et al*., 2005).

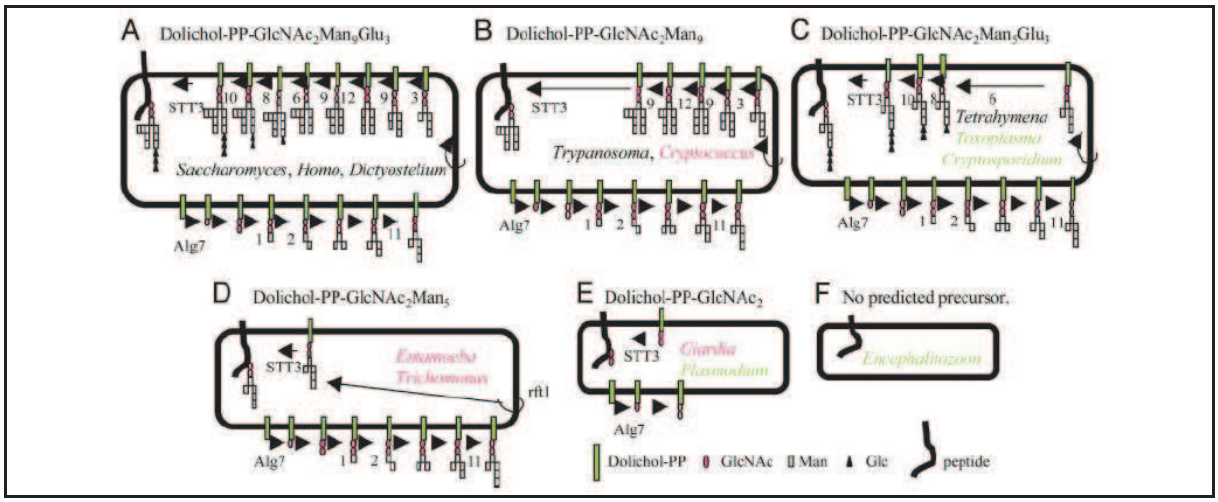


Figure 26 : Voie de synthèses des *N*-glycannes dans le réticulum endoplasmique de différents organismes Eucaryotes supérieurs et inférieurs (d'après Samuelson *et al*., 2005).

B. Le complexe OST

L'absence des trois résidus de glucose sur les *N*-glycannes de la plupart des protistes (principalement les Kinetoplastidae) et chez *C. neoformans* est due à la déficience des gènes homologues d'*alg6p*, *alg8p* et *alg10p*. Cette observation est surprenante puisqu'il est admis chez les Eucaryotes que le glucose terminal est très important pour la reconnaissance du *N*-glycanne par le complexe OST (Karaoglu *et al*., 2001 ; Kelleher *et al*., 2003). La synthèse de *N*-glycoprotéines possédant des *N*-glycannes intermédiaires peut interférer avec les processus du contrôle qualité dans le RE et la maturation des protéines dans l'appareil de Golgi, et mène chez l'Homme aux défauts

congénitaux de glycosylation (Jaeken et Matthijs, 2007). Cependant, la levure est capable de transférer des oligosaccharides dont la structure minimale est $GlcNAc_2$ (Gibbs et Coward, 1999). Il semble donc que les complexes OST des Eucaryotes inférieurs se soient adaptés en conséquence de cette évolution.

L'analyse des bases de données génomiques et protéomiques a révélé que ces organismes ne possèdent pas tous les constituants du complexe OST décrit chez la levure. Les génomes de *G. lamblia*, *T. cruzi* et *T. brucei* renferment de nombreux gènes différents codant pour des homologues de *Stt3p*, mais les autres sous-unités non-catalytique du complexe OST n'ont pas encore été identifiées (Samuelson *et al*., 2005). Quatre de ces sous-unités, homologues de Stt3p, Ost1p, Ost2p et Wbp1p, sont présentes chez *T. vaginalis* et *E. histolytica*. Six de ces sous-unités, homologues d'*Ost1p* à *Ost4p*, *Stt3p* et *Wbp1p*, sont prédites chez *C. parvum*. Enfin, le génome de *C. neoformans* code pour les homologues de toutes les sous-unités du complexe OST, à l'exception d'*Ost5p*. La sous-unité homologue de Stt3p de *Leishmania major* est capable de complémenter la levure déficiente pour cette enzyme (Hese *et al*., 2009).

Chez les Kinetoplastidae, le transfert des différents types d'oligosaccharides sur les *N*-glycoprotéines est réalisé par l'activité oligosaccharyl transférase de trois sous-unités différentes homologues de Stt3p, fonctionnant en monomère. L'étude de cette activité oligosaccharyl transférasique chez *T. cruzi* a démontré que ces enzymes sont capables de transférer des oligosaccharides glucosylés du type $Glc_{1\text{-}3}Man_9GlcNAc_2$ et des oligosaccharides non-glucosylés du type $Man_{5\text{-}9}GlcNAc_2$ (Bosch *et al*., 1988 ; Jones *et al*., 2005). De plus, chez *T. brucei*, chacune des sous-unités (TbSTT3A, TbSTT3B, TbSTT3C) est impliquée dans le transfert d'un type particulier d'oligosaccharides (Izquierdo *et al*., 2009). L'absence de TbSTT3A et TbSTT3B dans des parasites mutants mène à un défaut de virulence chez la souris, alors que le défaut de l'un ou l'autre n'a pas d'effet. En conséquence de l'absence des enzymes permettant de « glucosyler » l'oligosaccharide $Man_9GlcNAc_2$ avant de le transférer sur la protéine, ces protistes ont mis en place un mécanisme de glucosylation post-transfert. Une fois la *N*-glycoprotéine formée, ces protozoaires sont capables de « glucosyler » le ou les *N*-glycanne(s) grâce à l'UGGT dans le RE afin de réaliser ensuite le contrôle qualité de la conformation des *N*-glycoprotéines (Parodi *et al*., 1983).

L'étude exhaustive des complexes OST de *T. vaginalis*, *E. histolytica*, *T. cruzi*, *C. neoformans* et *S. cerevisiae* a permis d'établir que les résidus terminaux de mannose des oligosaccharides synthétisés par ces différents organismes sont importants pour la reconnaissance du donneur de substrat des complexes OST respectifs (Kelleher *et al*., 2007). De plus, en fonction du nombre de sous-unités présentes dans le complexe OST, les vitesses de transfert des oligosaccharides, *in vitro* sur le tripeptide NYT, varient en fonction de la complexité de l'oligosaccharide précurseur. Par exemple, les $Man_{4\text{-}9}GlcNAc_2$ sont transférés plus rapidement que le $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ par le complexe

OST de *T. vaginalis* et *E. histolytica* qui ne comportent que les sous-unités Stt3p, Ost1p, Ost2p et Wbp1p. Il semble également que le type de liaison des mannoses terminaux sur les oligosaccharides non glucosylés et leur isoformes interviennent dans la reconnaissance et le transfert du *N*-glycanne par le complexe OST de *T. cruzi*. Ces résultats indiquent que l'évolution de la composition des sous-unités du complexe OST (apparition de nouveaux constituants) chez les Eucaryotes supérieurs s'est faite en parallèle du gain d'enzymes permettant de former des oligosaccharides de type $Glc_3Man_9GlcNAc_2$. Chez les Protistes, les structures *N*-glycanniques plus simple sont transférées par des complexes OST moins évolués.

Il a été démontré que le transfert du *N*-glycanne par le complexe OST chez la levure et les mammifères est régulé par l'assemblage correct du glycolipide Dol-PP-$GlcNAc_2Man_9Glc_3$. L'interaction allostérique entre les sous-unités régulatrices du complexe OST, probablement le sous-complexe Swp1p/Wbp1p/Ost2p, et l'oligosaccharide intervient dans la reconnaissance du donneur de substrat (le Dol-PP) et le transfert de l'oligosaccharide, par la sous-unité Stt3p (Kelleher *et al*., 2007). Cependant, le transfert des *N*-glycannes par les complexes OST des Eucaryotes inférieurs semble avoir perdu ce type de reconnaissance puisque chez *T. brucei*, TbSTT3B est capable de transférer seule un oligosaccharide de type $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ (Izquierdo *et al*., 2009).

C. Le contrôle qualité

L'étude bioinformatique et biochimique du système de contrôle qualité de la conformation des *N*-glycoprotéines, et du système de dégradation ERAD dans le RE, des différents protistes cités ci-dessus, a déterminé que ces mécanismes ont évolué en parallèle de la perte des enzymes ALGs et du complexe OST (figure 27 ; Banerjee *et al*., 2007). Il apparait que le contrôle qualité de la conformation des *N*-glycoprotéines est présent et actif chez certains des protistes synthétisant des oligosaccharides du type $Man_5GlcNAc_2$ (substrat minimal de l'UGGT) alors que ce système est absent chez les organismes ne synthétisant que des *N*-glycannes sans mannose. Les lectines calnexine et calréticuline sont présentes ensemble ou séparément chez les protistes synthétisant au minimum l'oligosaccharide $Man_5GlcNAc_2$. Ce mécanisme a été validé *in vitro* chez *C. neoformans*, *T. vaginalis* et *E. histolytica*. En ce qui concerne le système de dégradation ERAD, il ne semble être uniquement présent que chez les Trypanosomatidae et *T. vaginalis* synthétisant des oligosaccharides du type $Man_9GlcNAc_2$ (substrat minimal de l'α-mannosidase I). Les activités mannosidases de deux des enzymes nécessaires à ce mécanisme ont été validées *in vitro*.

Organisms	N-glycan	Folding			Degradation					
		Gls2	UGGT	CRT*	CNX*	ERGIC	Mns1†	EDEM†	Yos9	PNGase
Sc/Sp	$Glc_3Man_9GlcNAc_2$	Y	N‡/Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Hs/At/Dd	$Glc_3Man_9GlcNAc_2$	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Cn	$Man_9GlcNAc_2$	Y	Y§	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Lm/Tb/Tc	$Man_{7-9}GlcNAc_2$	Y	Y	Y	N	Y	N	N/Y/Y¶	Y	N
Eh/Tv	$Man_5GlcNAc_2$	Y‖	Y§	Y	N/Y	Y	N/Y**	N	N/Y	N/Y††
Tt/Tg/Cp	$Glc_{1-3}Man_5GlcNAc_2$	Y	N	N	N/Y‡‡/N	N	N	N	N	N
Pf/Gl	$GlcNAc_2$	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ec/Ta	None	N	N	N	N	Y/N	N	N	N	N

Figure 27 : Les protéines impliquées dans le contrôle qualité des *N*-glycoprotéines chez certains organismes Eucaryotes supérieurs et inférieurs (d'après Banerjee *et al.*, 2007) ; Sc : *Saccharomyces cerevisiae*, Sp : *Schizosaccharomyces pombe,* Hs : *Homo sapiens,* At : *Arabidopsis thaliana*, Dd : *Dictyostelium discoideum*, Cn : *Cryptococcus neoformans*, Lm : *Leishmania major*, Tb : *Trypanozoma brucei*, Tc : *Trypanozoma cruzi*, Eh : *Entamoeba histolytica*, Tv : *Trychomonas vaginalis*, Tt : *Tetrahymena thermophila*, Tg : *Toxoplasma gondii*, Cp : *Cryptosporidium parvum*, Pf : *Plasmodium falciparum*, Gl : *Giardia lamblia*, Ec : *Encephalitozoon cuniculi*, Ta : *Theileiria annulata*.

D. La maturation de la *N*-glycoprotéine

Chez certains Kinetoplastidae qui infectent les insectes et les hôtes non-mammifères, les *N*-glycoprotéines sont maturées dans l'appareil de Golgi par l'ajout de rhamnose, de ribose et de galactofuranose (McConville *et al.*, 2002). Chez *T. cruzi*, *T. brucei* et *L. major*, la maturation dans l'appareil de Golgi fait intervenir des α-mannosidases permettant de former des oligosaccharides plus courts du type $Man_{4-8}GlcNAc_2$ glucosylés ou non. Cependant, certaines *N*-glycoprotéines lysosomales et de surface sont modifiées par l'ajout de galactose (la cruzaine et la Tc85) ou de N-acetyllactosamine (la procycline). D'autres *N*-glycannes de type complexe ont également été décrits chez ces parasites.

III. Les *N*-glycoprotéines des Eucaryotes inférieurs

A. Chez les Trypanosomatidae

La *N*-glycosylation chez ces parasites est aberrante et varie énormément en fonction des sous-espèces et des stades parasitaires (Parodi, 1993). Ces parasites ont établi une hétérogénéité très importante dans la structure des oligosaccharides qu'ils sont capables de transférer sur les différentes *N*-glycoprotéines. Aucun de ces parasites n'est capable *in vivo* de « glucosyler » les différents glycolipides précurseurs Dol-PP-$GlcNAc_2$-Man_{6-9} formés par les différentes sous-espèces. Cependant l'UGGT permet d'ajouter un résidu terminal de glucose une fois le *N*-glycanne transféré sur la protéine, permettant de mettre en place le contrôle qualité de ces *N*-glycoprotéines.

1. Chez *Trypanosoma brucei*

La surface des formes sanguines de ce parasite est recouverte majoritairement d'une protéine appelée VSG (Variant Surface Glycoprotein) ancrée dans la membrane plasmique par un ancrage GPI (Pays et Nolan, 1998). La protéine VSG est également *N*-glycosylée chez *T. brucei* qui est capable de moduler abondamment la taille des chaines *N*-glycanniques de cette protéine (Strang *et al*., 1993). La présence de différentes isoformes d'oligosaccharides sur la même protéine VSG semble être due au transfert spécifique des oligosaccharides des différents glycolipides donneurs, Dol-PP-$GlcNAc_2Man_5$ et Dol-PP-$GlcNAc_2Man_9$, sur une asparagine spécifique par deux sous-unités TbSTT3 différentes durant la formation de la *N*-glycoprotéine dans le RE (Jones *et al*., 2005 ; Manthri *et al*., 2008 ; Izquierdo *et al*., 2009). Le transfert du premier oligosaccharide se fait de manière co-traductionnelle alors que le second semble se faire de manière post-traductionnelle. Il existe plusieurs gènes codant pour différentes *N*-glycoprotéines VSG conférant à ces parasites une variation antigénique les protégeant contre le système immunitaire de l'hôte infecté. A la surface des parasites, ces *N*-glycoprotéines possèdent des *N*-glycannes de structures très hétérogènes de type riche en mannose et complexes (Mehlert *et al*., 2010). Les *N*-glycannes des protéines VSG semble intervenir dans l'adressage des protéines vers la membrane plasmique (Wang *et al*., 2003). Les formes procycliques (stades présent chez les insectes) possèdent également des glycoprotéines de surface ancrées à la membrane plasmique par une ancre-GPI (les procyclines) et *N*-glycosylées dans leur domaine amino terminal. Ces *N*-glycoprotéines interviennent dans la protection contre les hydrolases du tube digestif de la mouche tsé-tsé et dans la maturation du parasite vers la forme métacyclique. D'autres protéines de surface sont *N*-glycosylées chez ce parasite, les antigènes invariants de surface (Isg65, Isg70, Isg75), une ectophosphatase et une phosphatase acide. Au niveau de la poche du flagelle, il existe également des *N*-glycoprotéines comme les récepteurs à la transférine, Isg100 et la TgsGP (McConville *et al*., 2002). Isg100 est une *N*-glycoprotéine qui est hautement *N*-glycosylée (15 sites putatifs) et dont l'état de *N*-glycosylation varie en fonction des stades du parasite (Kelley *et al*., 1996).

2. Chez *Tryponasoma cruzi*

La surface de la majeure partie des stades de développement de ce parasite est composée de protéines à ancre-GPI, les protéines de la famille des transialidases et les protéines de type mucines. Les transialidases sont *N*-glycosylées et les protéines de type mucines sont *O*-glycosylées. Les mucines des formes extracellulaires semblent protéger les parasites contre la lyse par le complément et l'opsonisation, et jouent un rôle important dans l'invasion. Une autre protéine est *N*-glycosylée chez ce parasite, la Gp72, localisée au niveau de la zone d'attachement du flagelle (McConville *et al*., 2002).

B. Chez les Leishmaniae

La majeure partie de la surface de ces parasites est constitué d'un oligosaccharide à ancrage GPI hyperglycosylée, le lipophospoglycanne (LPG). Cette structure intervient dans la protection des parasites contre la lyse extracellulaire par le complément ou les hydrolases. Cependant, les protéines d'une autre famille de marqueurs de surface sont *N*-glycosylées, les leishmanolysines (ou GP63). Cependant, les différents types de *N*-glycannes retrouvés sur les différentes isoformes des protéines GP63 ($Man_{4-6}GlcNAc_2$ et $Glc_1Man_6GlcNAc_2$) ne semble pas jouer de rôle important dans les différences biochimiques observées entre ces différentes isoformes (Olafson *et al*., 1990). Comme chez *T. brucei*, la variation entre les différentes isoformes des protéines VSG semble être liée à la structure primaire des protéines plutôt qu'aux modifications post-traductionnelles. La structure $Glc_1Man_6GlcNAc_2$ est retrouvée sur deux de trois sites de *N*-glycosylation de la protéine GP63 chez les formes promastigotes infectieuses chez les insectes de *L. major* et *L. m. mexicana* (Funk *et al*., 1997). Les *N*-glycoprotéines GP63 sont des métalloprotéases dépendantes du zinc qui interviennent dans la protection des formes promastigotes contre la lyse, dans la phagocytose et la survie des formes amastigotes dans les macrophages (Yao *et al.*, 2003). Les *N*-glycannes de ces *N*-glycoprotéines sont importants pour la virulence des formes infectieuses de ces parasites (Kink et Chang, 1988), mais également pour la stabilité de la protéine intracellulaire (McGwire et Chang, 1996). En revanche, ces oligosaccharides ne semblent pas intervenir dans l'adressage de la protéine vers la membrane plasmique, ni dans son activité enzymatique, ni dans la protection contre la protéolyse (Funk *et al*., 1993). D'autres *N*-glycoprotéines de surface, comme la GP40 et une 3' 5' nucléotidase sont également présentes. Ces parasites sécrètent également une phosphatase acide *N*-glycosylées (Ilg *et al*., 1994).

C. Chez *Giardia lamblia*

Ce parasite protozoaire est capable de former et de transférer des oligosaccharides très simples du type $GlcNAc_2$ car il a perdu les enzymes ALGs responsables de l'élaboration des oligosaccharides plus longs (Helenius et Aebi, 2004 ; Samuelson *et al*., 2005). Comme chez les Trypanosomatidae, le transfert de cet oligosaccharide est assuré par une seule enzyme homologue de Stt3p (Kelleher et Gilmore, 2006). La lectine WGA (Wheat Germ Agglutinin) qui lie les $GlcNAc_2$ et les acides sialiques est capable de reconnaitre la surface, les flagelles, l'appareil sécrétoire et des vésicules intraparasitaires acides chez les trophozoïtes et la surface des kystes de ce parasite (Ratner *et al*., 2008). Cependant, aucune maturation des *N*-glycannes par l'ajout d'acides sialiques n'a été observée chez *G. lamblia*. Une étude visant à caractériser les *N*-glycoprotéines totales de ce parasite

a mis en évidence la présence de très nombreuses *N*-glycoprotéines présentent à la surface du parasite, des protéines sécrétées, des enzymes lysosomales et d'autres impliquées dans le contrôle qualité dans le RE. Des *N*-glycoprotéines sont impliquées dans l'enkystement et dans la paroi kystique du parasite.

D. Chez *Dictyostelium discoideum*

Ce parasite protozoaire, une amibe, possède une *N*-glycoprotéine, la gp130, qui est impliquée dans la macropinocytose, un processus de transport de larges vésicules. Cette *N*-glycoprotéine joue également un rôle d'adhésion entre les cellules durant la croissance végétative du parasite permettant de former des amas cellulaires (Chia *et al*., 2005). Cette protéine possède 18 sites putatifs de *N*-glycosylation dont 15 sont occupés par des oligosaccharides très hétérogènes avec une structure commune $Man_{6-9}GlcNAc_2$ à laquelle s'ajoute des GlcNAc, des fucoses, des groupements sulfates et/ou méthyl-phosphates (Feasley *et al*., 2010).

E. Chez *Tetrahymena thermophila*

Une étude visant à caractériser les *N*-glycoprotéines sécrétées par ce protiste a révélé des structures oligosaccharidiques de type riche en mannose $Man_{3-5}GlcNAc_2$ (Becker et Rüsing, 2003), parmi lesquelles une phosphatase acide et une α-glucosidase avaient déjà été identifiées (Taniguchi *et al*., 1985). Ce protiste frome des oligosaccharides du type $Glc_3Man_5GlcNAc_2$. En effet, aucune *N*-glycoprotéine portant plus de 5 résidus de mannose n'a été identifiée dans cette étude. Un à trois résidus de glucose terminal a également été observé sur les *N*-glycannes de la phosphatase acide, mais dans une faible proportion par rapport aux autres oligosaccharides.

IV. La *N*-glycosylation chez les Archae et les Bactéries

La découverte de la *N*-glycosylation chez les Archae date de 1976, avec l'identification d'une *N*-glycoprotéine de surface chez *Halobacterium salinarum* (Mescher et Strominger, 1976). Depuis, des *N*-glycoprotéines ont également été découvertes chez les Bactéries comme *Campylobacter jejuni* (Szymanski et Wren, 2005). La *N*-glycosylation est plus développé chez les Archae que les Bactéries.

L'étude de la voie de synthèse des *N*-glycannes chez *C. jejuni* a déterminé que le processus se déroule au niveau de la face interne de la membrane plasmique de la bactérie. Les enzymes ajoutant les monosaccharides sur le lipide accepteur sont nommées PGL (Protein GLycosylation). Le lipide accepteur est un undecaprenyl phosphate et le premier monosaccharide ajouté est un di-N-acétyl bacillosamine (2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyglucose). Six autres monosaccharides de ce genre sont ajoutés avant qu'il y ait une translocation du *N*-glycanne à travers la membrane plasmique par une

flippase nommée PglK. Ensuite l'oligosaccharide est transféré par une unique sous-unité oligosaccharyl transférase, PglB, sur le résidu asparagine de la protéine, contenu dans la séquence D/E-Z-N-X-S/T, ou Z et X ne sont pas des prolines. Il ne semble pas y avoir de maturation du *N*-glycanne une fois la *N*-glycoprotéine formée. Chez les Archae, la synthèse des *N*-glycannes se déroule également du côté cytoplasmique de la membrane plasmique (figure 28). L'accepteur lipidique est le dolichol phosphate (Dol-P) comme chez les Eucaryotes. En fonction des Archae, il peut y avoir un second Dol-P (formant comme chez les Eucaryotes, le dolichol pyrophosphate Dol-PP) ajouté avant l'addition des monosaccharides par les enzymes AGL (Archaeal GLycosylation), identifiées chez *Methanococcus voltae* et *Haloferax volcanii*.

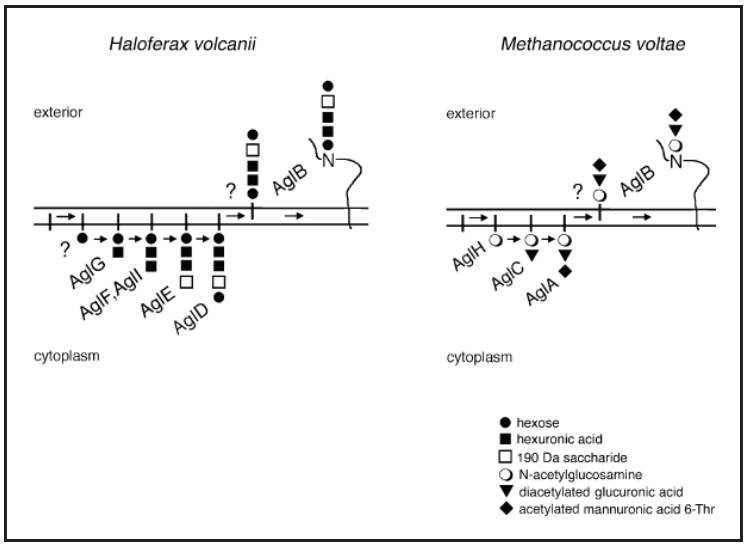


Figure 28 : La *N*-glycosylation chez deux Archaes, *Haloferax volcanii* et *Methanococcus voltae* (d'après Yurist-Doutsch *et al*., 2008) ; AGL : Archaeal GLycosylation.

Le gène *aglH* de *M. voltae* permet de transférer le premier GlcNAc sur le Dol-PP et complémente la déficience en *alg7p* chez la levure. Ensuite, AglC et AglA catalyse respectivement l'ajout d'un acide glucuronique diacétylé et d'un acide mannuronique acétylé associé à une thréonine. Le *N*-glycanne (trisaccharide) est retrouvé sur la flagelline et une *N*-glycoprotéine de surface chez ces Archae. La suppression des deux gènes implique des défauts d'assemblage et de fonction du flagelle. Chez *H. volcanii*, au moins deux des sept sites putatifs de *N*-glycosylation de cette *N*-glycoprotéine de surface sont occupés par des pentasaccharides. AglD, homologue de Alg7p, AglE, homologue de Dpm1, AglF, AglG et AglI ont été identifiées dans le génome de *H. volcanii* et sont impliquées à différents niveaux dans la synthèse du *N*-glycanne de cette *N*-glycoprotéine de surface. Une flippase assure la translocation de cette structure à travers la membrane plasmique avant que le *N*-glycanne soit transférer sur la protéine par l'enzyme AglB. L'activité oligosaccharyl

transférase de cette enzyme a été démontrée chez *P. furiosus* et la délétion du gène entraine l'absence de *N*-glycannes sur les protéines cibles. Contrairement aux bactéries, la séquence classique N-X-S/T des Eucaryotes, où X n'est pas une proline, est suffisante au transfert de l'oligosaccharide sur la protéine.

V. La *N*-glycosylation chez les Apicomplexa et chez *Toxoplasma gondii*

Jusqu'aujourd'hui, seulement quelques travaux ont permis d'étudier la *N*-glycosylation chez les Apicomplexa. Les parasites de ce phylum les plus étudiés sont *Neospora caninum*, et *Cryptosporidium parvum*, tous deux proches phylogénétiquement de *T. gondii*. *Plasmodium falciparum* est également étudié mais il existe aussi une controverse au sujet de la synthèse des *N*-glycannes par le parasite car les gènes codant les protéines impliquées dans la *N*-glycosylation (à l'exception des homologues de *alg7p* et *stt3p*), mais également les protéines *N*-glycosylées, n'ont pas été identifiés jusqu'à ce jour.

A. Chez *Cryptosporidium parvum*

Ce parasite est virtuellement capable de former des structures oligosaccharidiques de type $Glc_1Man_5GlcNAc_2$. Plusieurs protéines de surface de type mucine impliquées dans l'invasion, *O*-glycosylées, ont été identifié chez ce parasite, GP40, GP15, GP900 (Cevallos *et al*., 2000). La protéine GP40 possède un site putatif de *N*-glycosylation qui n'a pas encore été caractérisé.

B. Chez *Neospora caninum*

Une étude visant à caractériser les glycoprotéines globales par l'utilisation de différentes lectines chez ce parasite, a démontré la présence de *N*-glycoprotéines à la surface de *N. caninum* et dans les granules denses. Suite à la lyse de ces parasites par du Triton X-114, des *N*-glycoprotéines reconnues par la ConA sont essentiellement présentes dans la fraction soluble contenant des protéines membranaires (Fuchs *et al*., 1999).

C. Chez *Plasmodium falciparum*

Des *N*-glycannes de type $GlcNAc_2$, $Man_3GlcNAc_2$ et $Man_9GlcNAc_2$ ont été observés sur les protéines de surface des stades intra-érythrocytaires précoce (Kimura *et al*., 1996). Ces structures sont absentes chez les stades plus tardifs (Dieckmann-Schuppert *et al.* 1992). Il semble que les deux dernières structures proviennent d'un détournement des *N*-glycannes de l'hôte. Cependant, d'autres études ont proposé que ces protéines de surface ne sont pas modifiées par des *N*-glycannes, mais par un ancrage GPI (Gowda *et al*., 1997 ; Berhe *et al*., 2000). Cette controverse entre la présence et

l'absence de structures *N*-glycanniques portées par les protéines de surface n'est pas encore élucidée, de même que la présence d'une machinerie fonctionnelle de synthèse de *N*-glycannes.

D. Chez *Toxoplasma gondii*

Chez *T. gondii*, des travaux préliminaires portant sur les études bioinformatiques ont suggéré la présence de sites *N*-glycosylés dans les protéines GRA4 (Mevelec *et al.*, 1992) et SAG1 (Kim *et al.*, 1994). Toutefois, la présence de *N*-glycannes a été décrite pour la protéine de surface P23 (Odenthal-Schnitter *et al.*, 1993) et la protéine du glidéosome GAP50 (Gaskins *et al.*, 2004 ; Luk *et al.*, 2008 ; Fauquenoy *et al.*, 2008). De plus, des travaux ont démontré que l'homologue de Stt3p chez *T. gondii* doit être exprimé à un haut niveau pour complémenté la levure *S. cerevisiae* déficiente dans le gène s*tt3p* (Shams-Eldis *et al.*, 2005). Néanmoins, ces travaux sur les protéines *N*-glycosylées restent restreints et marginaux.

Il a été démontré que la tunicamycine, une drogue permettant de bloquer la voie de synthèse des *N*-glycannes, inhibe la croissance des parasites durant le second cycle de traitement des parasites intracellulaires. De plus, l'invasion, la motilité et la morphologie de ces parasites sont fortement perturbées (Luk *et al.,* 2008 ; Fauquenoy *et al.*, 2008). Une étude a déterminé que le gène homologue de *alg7p* de *T. gondii* est capable de complémenter la déficience en Alg7p chez le levure. Ces auteurs ont également décrit que la présence de structures *N*-glycanniques de type $Hex_9HexNAc_2$ est due à un détournement par le parasite de ce type de *N*-glycannes présent chez la cellule hôte (Garénaux *et al.*, 2008).

L'absence d'un système de contrôle de qualité et de dégradation par la voie ERAD a été suggéré par une étude bioinformatique (Banerjee *et al.*, 2007). En effet, seul un homologue de la calnexine est présent dans le génome du parasite, mais une large partie du domaine liant la protéine disulfide isomérase ERp57 est manquante. Les autres protéines impliquées dans ces mécanismes (UGGT, calréticuline, ERGIC, α-mannosidase I) n'ont pas été identifiées dans le génome du parasite.
En revanche, de nombreux articles traitent également d'autres types de glycosylation tels que les ancres GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) qui sont fortement représentés à la surface du parasite (Tomavo *et al.*, 1989, 1992a et b ; Nagel et Boothroyd, 1989). Enfin, la *O*-glycosylation a été également sommairement rapportée chez *T. gondii* (Zinecker *et al.*, 1998 ; Stwora-Wojczyk *et al.*, 2004).

PROBLEMATIQUE

PROBLEMATIQUE

L'incidence grave de la toxoplasmose congénitale ou chez les patients immunodéprimés tels que les Sidéens montre qu'il est indispensable de mieux comprendre la biologie du parasite ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'invasion et la différenciation du parasite. L'invasion de l'hôte est régie par deux événements majeurs : la motilité et la formation de la jonction mobile. *Toxoplasma gondii* reconnait, s'attache, et pénètre théoriquement à l'intérieur de n'importe quelle cellule de mammifères en utilisant de nombreuses protéines déchargées à partir d'organites sécrétoires, situés à l'apex du parasite, et une unique forme de motilité circulaire qui dépend exclusivement de l'association des filaments d'actine avec le glidéosome.

La *N*-glycosylation chez les parasites Apicomplexa a toujours fait l'objet jusqu'à présent de conclusions contradictoires car les données des premières expériences biochimiques étaient marginales voire infructueuses. De plus, l'absence des gènes codant respectivement les enzymes impliquées dans la biosynthèse des précurseurs glycolipidiques donneurs (ALG) et celles du transfert des *N*-glycannes sur les protéines chez certains Apicomplexes tels que *Plasmodium falciparum* et *Theleria* n'ont pas contribué à résoudre ces incertitudes. Chez *T. gondii*, une étude préliminaire a évoqué la présence de structures *N*-glycanniques probables sur la protéine de surface P23, (Odenthal-Schnittler *et al.*, 1993). Toutefois, l'antigène majeur de surface SAG1, qui possède un site de *N*-glycosylation putatif, n'est pas glycosylé chez le parasite mais son expression dans les cellules CHO conduit à l'addition de *N*-glycannes (Kim *et al.*, 1994). Une autre étude plus récente a caractérisé une nouvelle *N*-glycoprotéine impliquée dans la motilité parasitaire, TgGAP50, sans élucider les fonctions des *N*-glycannes portés par cette protéine (Gaskins *et al*., 2004). La majorité de ces travaux sur la *N*-glycosylation chez *T. gondii* portaient sur l'identification de *N*-glycoprotéines de surface. En revanche, aucune étude n'a permis de déterminer l'existence de *N*-glycoprotéines intra-parasitaires. Le récent séquençage et annotation du génome de *T. gondii* ont mis en évidence la présence d'un nombre significatif de gènes impliqués dans la synthèse des précurseurs glycolipidiques, notamment au niveau de la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique, nécessaires à la biosynthèse des *N*-glycoprotéines. Ces gènes ALG ont de fortes homologies avec les ALG de la levure et de l'homme, suggérant fortement la présence de *N*-glycannes chez *T. gondii*.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris de caractériser les *N*-glycoprotéines totales de *T. gondii*, dans le but de déterminer que les *N*-glycannes pourraient être impliqués dans des fonctions biologiques particulières chez le parasite.

RESULTATS

RESULTATS

Analyses protéomiques et glycomiques des structures *N*-glycosylées impliquées dans les interactions cellules hôtes-*Toxoplasma gondii*

Au cours de la première partie de notre travail, nous avons caractérisé les *N*-glycoprotéines totales de *T. gondii*, ainsi que leurs structures *N*-glycanniques majeures. Les résultats ont donné lieu au premier article (page 102) dans lequel nous avons également décrit les localisations subcellulaires des glycoprotéines chez les tachyzoïtes et bradyzoïtes. Enfin, les fonctions putatives des *N*-glycannes ont été abordées par l'inhibition de leur synthèse par la tunicamycine, couplée aux analyses biochimiques et cellulaires.

I. Analyses glycomiques des *N*-glycannes totaux de *T. gondii*

Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec le Docteur Willy Morelle (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq, de l'UMR 8576 du CNRS, Directeur : Jean-Claude Michalski). La méthode d'obtention des *N*-glycannes totaux du parasite est basée sur une lyse de tachyzoïtes sur glace dans un tampon contenant du SDS 0,5% (p/v) suivi d'un traitement des protéines extraites permettant d'isoler les structures *N*-glycanniques.

Un total de 10^{11} parasites a été utilisé pour extraire les glycoprotéines parasitaires. Après centrifugation et dialyse, les glycoprotéines ont été dénaturées par du chlorure de guanidium et du DTT. Les glycoprotéines dénaturées subissent ensuite une carboxyamidométhylation avant d'être lyophilisées. Les protéines traitées sont ensuite digérées par la trypsine bovine et sont soumises à une première digestion enzymatique par l'endoglycosidase PNGaseF. Cette enzyme permet de couper les *N*-glycannes de type riche en mannose, hybride et complexe liées sur l'acide aminé asparagine des *N*-glycoprotéines contenant le motif Asn-X-Ser/Thr où X ne peut pas être une proline. Toutefois, la PNGase F est inactive lorsqu'il y a du fucose qui est attaché au GlcNAc lié à l'asparagine du glycopeptide. Les *N*-glycannes sont ensuite séparés des peptides par une colonne de chromatographie d'affinité Sep-Pak C_{18} (Walters Ltd.).

Afin de s'assurer qu'il ne reste pas d'autres types de *N*-glycannes sur les peptides élués, les éluats de la colonne sont traités par une autre endoglycosidase, la PNGase A, qui est capable de couper les *N*-glycannes au niveau du premier GlcNAc même lorsque ces derniers sont liés a du fucose. Ce type de liaison est fréquemment présent dans les *N*-glycoprotéines chez les plantes. Les produits de digestion sont également séparés sur une colonne de chromatographie d'affinité.

Les *N*-glycannes libres issus de ces deux types de digestion sont ensuite per-méthylés afin d'augmenter la sensibilité de détection en spectrométrie de masse.

Les *N*-glycannes traités sont analysés par MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry). Les *N*-glycannes isolés à partir de la digestion par la PNGaseF ont permis de déterminer deux caractéristiques (Article n°1, figure1, page 895).

Tout d'abord, les structures *N*-glycanniques majeures de *T. gondii* sont de type riche en mannose. En effet, les pics obtenus dans ces expériences correspondent à des structures oligosaccharidiques du type $Hex_3HexNAc_2$ à $Hex_9HexNAc_2$. Aucun résidu de galactose ou d'acide sialique n'a été identifié dans ces préparations. De plus, l'analyse par MALDI-TOF-MS des *N*-glycannes isolés après digestion par la PNGase A n'a révélé aucune nouvelle structure, indiquant que tous les *N*-glycannes avaient déjà été coupés par la PNGaseF, et qu'il n'y a pas de modification par du fucose sur le GlcNAc lié à l'asparagine des *N*-glycopeptides parasitaires.

Ensuite, ces résultats de spectrométrie de masse ont permis de déterminer qu'il existe deux sous-populations de *N*-glycannes de type riche en mannose chez *T. gondii*. La distinction entre ces sous-populations est basée sur la hauteur des pics des spectres de masse révélant une population majeure de structures oligosaccharidiques de type $Hex_6HexNAc_2$ à $Hex_8HexNAc_2$, et une population mineure de type $Hex_3HexNAc_2$ à $Hex_5HexNAc_2$, et $Hex_9HexNAc_2$. La population mineure ($Hex_3HexNAc_2$ à $Hex_5HexNAc_2$) correspond à des structures tronquées de type paucimannose.

Les analyses plus approfondies des structures *N*-glycanniques après une digestion avec l'α-mannosidase suivie d'une per-méthylation et MALDI-TOF-MS ont révélé des structures oligosaccharidiques de type $Hex_1HexNAc_2$ et $Hex_2HexNAc_2$, démontrant que les *N*-glycannes majoritairement présents sur les *N*-glycoprotéines de *T. gondii* sont de type riche en mannose ($Man_{5-8}GlcNAc_2$) et paucimannose ($Man_{3-4}GlcNAc_2$) (Article n°1, figure1D, page 895).

II. Expression des gènes de la voie de synthèse des *N*-glycannes chez *T. gondii*

Les analyses bioinformatiques menées par Samuelson *et al.* en 2005 ont permis de définir que *T. gondii* ne possède pas les gènes *algs* codant les enzymes responsables de l'ajout de mannose sur les structures *N*-glycanniques dans la lumière du réticulum endoplasmique (ALG3, ALG9 et ALG12). Par RT-PCR semi-quantitative sur des ADNc totaux de tachyzoïtes, nous avons déterminé que les gènes *algs* préalablement identifiés dans le génome du parasite sont exprimés au niveau transcriptionnel (figure 29 page 101). Le gène constitutif de l'actine a été utilisé comme contrôle pour démontrer que la même quantité d'ADNc a été utilisée au cours de ces expériences. De manière surprenante, nous avons également obtenu des amplifications en utilisant des couples d'amorces

correspondant aux transcrits des gènes *alg3*, *alg9* et *alg12*, malgré leur absences prédites dans le génome du parasite. Par comparaison avec des ADNc de bradyzoïtes, nous avons également défini qu'il existe probablement une régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes *algs* chez le stade latent du parasite. En effet, certains transcrits des gènes *algs* sont moins exprimés ou indétectables par cette technique de PCR (*alg1, alg3, alg6, alg7, alg9, alg11* et *alg14*). Nous ne pouvons pas exclure de réactions croisées des amorces permettant d'amplifiées les transcrits des gènes *alg3*, *alg9*, et *alg12*, de même la présence des enzymes ALG3, ALG9 et ALG12 n'a jamais été démontré chez les autres parasites Apicomplexa. Ces résultats concordent avec la présence de structures *N*-glycanniques de type oligomannosidiques et paucimannosidiques obtenus dans cette étude.

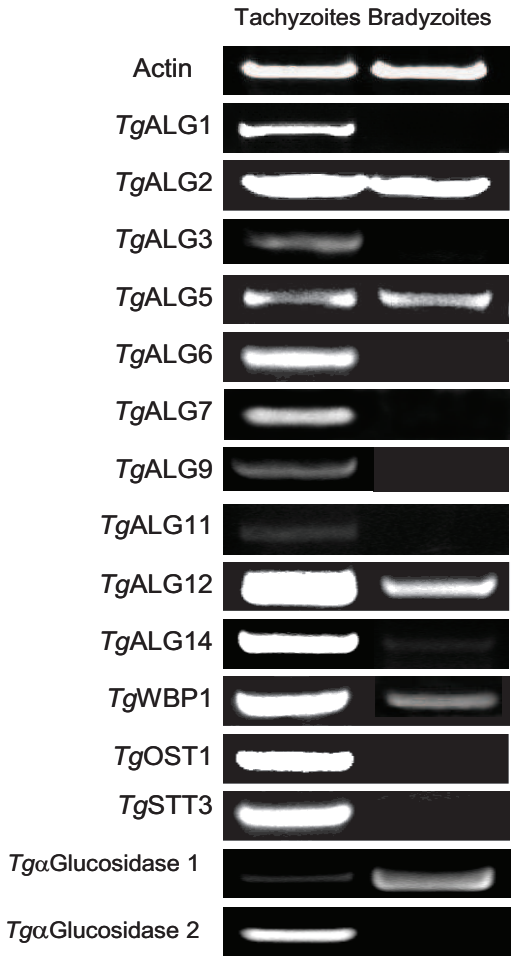


Figure 29 : **Expression comparative des 15 gènes putatifs impliqués dans la voie de synthèse des *N*-glycannes identifiés chez *T. gondii*, entre le tachyzoïte et le bradyzoïte.** Cette image correspond aux résultats des RT-PCR semi quantitatives réalisées à partir de quantités équivalentes d'ADNc des deux stades parasitaires.

III. Localisation subcellulaire des *N*-glycoprotéines de *T. gondii*

Nous avons décidé, après ces analyses glycomiques, d'utiliser deux types de lectines pour visualiser *in cellulo N*-glycoprotéines présentes chez *T. gondii*. La première, la Concanavaline A (ConA) reconnaît les α-D-mannoses et les α-D-glucoses, et la seconde, la Pisum Sativum Agglutinin (PSA),

reconnaît les α-D-mannoses uniquement. Les immunofluorescences indirectes ont été réalisées sur des tachyzoïtes extracellulaires cultivés *in vitro* et des bradyzoïtes extracellulaires issus de cerveaux de souris infectés de manière chronique pendant 2 mois. Ces expériences sont réalisées sur des parasites extracellulaires afin d'éviter toute interférence avec les *N*-glycoprotéines des cellules hôtes. La combinaison des signaux fluorescents obtenus par ces deux lectines permet d'éliminer la reconnaissance par la ConA des structures riches en glucose, l'amylopectine, présente abondamment chez les bradyzoïtes et dans une moindre mesure chez les tachyzoïtes.

Les images de microscopie confocale obtenues ont révélé un marquage diffus dans le cytoplasme des tachyzoïtes et des bradyzoïtes, à la fois avec la ConA et la PSA, ainsi que des ponctuations cytoplasmiques plus importantes (Article n°1, figure2, page 896). Chez les tachyzoïtes extracellulaires, ces ponctuations ou vésicules fluorescentes sont localisées autour et proche du noyau.

La résolution du microscope confocale utilisé ne nous permettait pas de déterminer si ces ponctuations correspondaient à un ou plusieurs des organites apicaux. Nous avons donc entrepris des expériences de colocalisation en utilisant des anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre différents organites subcellulaires spécifiques du parasite, micronèmes (αMIC1), rhoptries (αRON1), granules denses (αGRA1), complexe membranaire interne (αMyoA, αGAP45, αMLC1) et actine (αACT). Une colocalisation significative a été observée entre la ConA et les micronèmes, les rhoptries et les granules denses, avec une plus forte colocalisation entre la protéine TgRON1, située dans le cou des rhoptries, et la ConA (Article n°1, figure 3 page 897). De même, une colocalisation non négligeable est observable entre l'apicoplaste et la ConA mais ne pouvant pas exclure qu'il s'agit d'une fluorescence artéfactuelle puisque cet endosymbionte est très riche en vitamine B et les lectines utilisées sont biotinylées. En revanche, aucune colocalisation évidente et forte n'est observée sur le complexe membranaire interne où se trouve le glidéosome, ce qui pourrait aussi s'expliquer par l'inaccessibilité des *N*-glycannes probablement impliqués dans les interactions glycannes-glycannes et/ou glycannes-protéines entre les différents composants du glideosome.

Ensemble, ces résultats confirment la présence de *N*-glycoprotéines chez les tachyzoïtes et bradyzoïtes de *T. gondii*.

IV. Nature des *N*-glycoprotéines de *T. gondii*

Une des raisons de cette étude était de caractériser l'ensemble des *N*-glycoprotéines par le couplage d'une technique de purification par chromatographie d'affinité et d'analyses par spectrométrie de masse. Pour cela, nous avons tout d'abord mis en place dans le laboratoire un

système de purification des *N*-glycoprotéines parasitaires totales par les techniques fines ou micro-méthodes.

Tout d'abord, les parasites sont lysés en conditions douces (1% Triton X100) pour conserver les complexes formés par les *N*-glycoprotéines. Les lysats parasitaires sont centrifugés et incubés sur la colonne de chromatographie d'affinité composée de billes d'agarose lié de façon covalente à la lectine ConA. Après une série de plusieurs lavages, les glycoprotéines retenues par la lectine sont éluées par chauffage à 95°C pendant 5 min. La qualité des différents lavages est appréciée par coloration au bleu de Coomassie d'un gel d'acrylamide dans lequel des échantillons de ces lavages ont été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE (Article n°1, figure 4A ligne 2 à 4, page 898). Différentes conditions d'incubation et d'élution ont été réalisées afin de déterminer les meilleures conditions d'incubations des lysats parasitaires avec la colonne. Des expériences de compétition ont été réalisée par une pré-incubation de la colonne avec un monosaccharide, l'α-méthylmannoside afin de déterminer la spécificité des interactions lectiniques (Article n°1, figure 4A ligne 6, page 898), et une élution par ce même monosaccharide a été réalisée (Article n°1, figure 4A ligne 7, page 898). Ces résultats ont permis de déterminer qu'une pré-incubation avec l'α-méthylmannoside augmente la spécificité de fixation des *N*-glycoprotéines sur la colonne. De même, l'élution par ce monosaccharide compétiteur, l'α-méthylmannoside, permet de décrocher une plus petite quantité de *N*-glycoprotéines de la colonne de chromatographie d'affinité. De plus, l'élution de la colonne sans incubation avec un lysat parasitaire nous a permis de déterminer approximativement le nombre de bandes correspondantes aux *N*-glycoprotéines retenues par la colonne incubée avec un lysat parasitaire. De manière surprenante, cette méthode de purification montre que des *N*-glycoprotéines présentes chez le parasite sont de masses moléculaires exclusivement comprises entre 45kDa et 100kDa (Article n°1, figure 4A ligne 1, page 898).

Afin de déterminer la nature de ces *N*-glycoprotéines par spectrométrie de masse, des lysats parasitaires plus importants (10^{10} parasites) ont été purifiés par chromatographie d'affinité ConA préalablement incubée en présence du compétiteur α-méthylmannoside. Les *N*-glycoprotéines éluées ont été séparées en gel d'acrylamide et 13 bandes ont été découpées. Les protéines sont ensuite digérées dans les fragments de gels par de la trypsine et analysées en spectrométrie de masse en tandem (nano-LC-MS/MS, nano-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry). Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le Dr Christine Schaeffer et Agnès Hovasse (Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bioorganique, CNRS UMR 7178, Université de Strasbourg, Directeur : Alain Van Dorsselear). Les spectres de masse sont comparés à la base de données MASCOT qui a permis d'identifier 26 protéines. Des analyses bio-informatiques exhaustives des données de spectrométrie de masse ont été réalisées dans ce laboratoire, en créant une banque interne regroupant les lectures protéiques putatives dans les six cadres de lecture des séquences

génomiques entières de *T. gondii*. Ces résultats ont permis d'identifier 11 nouvelles protéines qui n'avaient pas été identifiées par l'annotation du consortium international du génome de *T. gondii* (http://www.toxodb.org).

Nos analyses de spectrométrie de masse confirmées par des expériences d'immunoempreintes (Western blots) ont permis d'identifier de nombreuses protéines telles que, par exemple, la myosine A, l'actine, la tubuline et des chaperonnes qui n'ont à priori aucun potentiel et sites de *N*-glycosylation car ces dernières ne possèdent pas de signal peptidique d'adressage dans le réticulum endoplasmique et ne peuvent donc pas rentrer dans la voie de trafic intracellulaire (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi). Nous avions conclu que ces protéines ont été co-précipitées avec des *N*-glycoprotéines auxquelles elles sont associées et que ce sont ces *N*-glycoprotéines qui ont servi d'appât ou de partenaires reconnus par la lectine Con A. Nous avons identifié des protéines impliquées dans différents processus et mécanismes biologiques de *T. gondii* (Article n°1, tableau 2, page 899 à 902), comme l'invasion (TgAMA1, TgRON2), la motilité (TgMyoA, TgAct, TgGAP50, TgMLC1), le cytosquelette (Tgβ-TUB, TgIMC2A), le trafic et le tri des protéines (TgSortilin et un homologue de PfSec61), des protéines de rhoptries (TgRON1, TgROP18, TgROP7, TgROP5, TgROP4, TgROP2), deux myosines impliquées dans la division (TgMyoB/C), un homologue de la perforine et des « Heat Shock Proteins » impliquées dans la conformation et la stabilité des protéines (TgHSP70, TgHSP90). L'identification d'un glycopeptide provenant de TgGAP50 et les analyses plus précises et fines du *N*-glycanne de cette protéine par spectrométrie de masse ont confirmé une structure de type riche en mannose puisque nous avons observés alternativement sur l'asparagine 136 un oligosaccharide de type $Man_7GlcNAc_2$ ou $Man_8GlcNAc_2$ (Article n°1, figure 5, page 903).

V. Implication de la *N*-glycosylation de *T. gondii* dans l'invasion des cellules hôtes

L'identification de *N*-glycoprotéines putatives impliquées dans les mécanismes d'invasion et de la motilité parasitaire nous ont conduit à étudier le rôle de cette modification post-traductionnelle dans ces mécanismes, en utilisant une drogue qui bloque la synthèse des *N*-glycannes de manière précoce, ciblant l'ALG7.

Nous avons tout d'abord examiné la croissance des parasites en présence de 5 µg/mL de tunicamycine. Lorsque les parasites sont traités 48 H environ, aucune différence de croissance intracellulaire n'a pu être observée, en comparaison avec des parasites témoins traités par du DMSO. Les parasites traités avec la tunicamycine et témoins, sortant des cellules HFFs, sont alors déposés en quantité égale sur de nouveaux tapis de cellules HFFs confluentes. Après ce second cycle de lyse, les parasites sont dénombrés et nous observons alors les premiers effets de l'inhibition de la *N*-

glycosylation sur la croissance, soit une diminution de 70 à 75% du taux de croissance en comparaison avec les parasites témoins. Cette expérience est à nouveau réalisée dans les mêmes conditions pendant un troisième cycle d'invasion et de croissance de 48 H. La diminution du taux de croissance observée est alors de 90%, en comparaison avec les parasites témoins (Article n°1, figure 6A, page 904).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'observation de la division des parasites en présence de la tunicamycine. Les parasites ont tout d'abord été préalablement traités pendant 48 H avec de la tunicamycine et après leur premier cycle de division intracellulaire, les parasites extracellulaires sont incubés avec une monocouche de cellules HFFs et cultivés en l'absence de drogue pendant 24 H. Nous avons observé 1 à 4 parasites par vacuoles, tandis que des parasites témoins négatifs traités par du DMSO montrent des vacuoles de 4 à 16 parasites, indiquant un ralentissement significatif de la réplication parasitaire (Article n°1, figure 6B, page 904).

Nous avons également démontré que la tunicamycine altère la biogenèse d'organites apicaux et du complexe membranaire interne. Nous avons ensuite comparés par immunofluorescence la morphologie de certains organites subcellulaires comme les rhoptries, les micronèmes, les granules denses, le complexe membranaire interne ou la surface de parasites non traités, avec ces parasites traités. Nous avons identifié que la structure du complexe membranaire interne (marqué par l'anticorps αMLC1) est aussi significativement altérée suite à ce traitement, et dans une moindre mesure, celle des rhoptries (Article n°1, figure 7, page 904). Cette altération du complexe membranaire interne a des conséquences sur les mouvements du parasite traité avec de la tunicamycine car les traces de motilité faites par les parasites sur le support de verre sont considérablement réduites par rapport à celles des parasites témoins non traités (Article n°1, figure 9A, page 906). De même, nous avons observé une diminution de plus de 50% de l'invasion chez ces parasites, en comparaison avec les parasites témoins (Article n°1, figure 9B, page 906).

Nos résultats montrent une implication de la *N*-glycosylation dans les mécanismes de motilité, d'invasion, de croissance et de mise en place du complexe membranaire interne. Ces résultats de la première partie de ma thèse montrent que le parasite est capable de synthétiser des structures *N*-glycanniques riches en mannose. Ces structures sont en accord avec les prévisions faites à partir des gènes *alg* identifiés dans le génome du parasite. L'identification de nombreuses *N*-glycoprotéines impliquées dans les mécanismes de motilité, d'invasion et d'interaction avec les cellules hôtes concordent avec les résultats obtenus suite au traitement des parasites par la tunicamycine, inhibant la voie de synthèse des *N*-glycannes.

ARTICLE 1

Fauquenoy, S., Morelle, W., Hovasse, A., Bednarczyk, A., Slomianny, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Tomavo, S. (2008). Proteomics and glycomics analyses of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*--host cell interactions. Mol Cell Proteomics *7*, 891-910.

Supplemental Material can be found at:
http://www.mcponline.org/cgi/content/full/M700391-MCP200/DC1

Proteomics and Glycomics Analyses of *N*-Glycosylated Structures Involved in *Toxoplasma gondii*-Host Cell Interactions*[S]

Sylvain Fauquenoy‡, Willy Morelle‡, Agnès Hovasse§, Audrey Bednarczyk§, Christian Slomianny¶, Christine Schaeffer§, Alain Van Dorsselaer§, and Stanislas Tomavo‡‖

The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* recognizes, binds, and penetrates virtually any kind of mammalian cell using a repertoire of proteins released from late secretory organelles and a unique form of gliding motility (also named glideosome) that critically depends on actin filaments and myosin. How *T. gondii* glycosylated proteins mediate host-parasite interactions remains elusive. To date, only limited evidence is available concerning *N*-glycosylation in apicomplexans. Here we report comprehensive proteomics and glycomics analyses showing that several key components required for host cell-*T. gondii* interactions are *N*-glycosylated. Detailed structural characterization confirmed that *N*-glycans from *T. gondii* total protein extracts consist of oligomannosidic ($Man_{5-8}(GlcNAc)_2$) and paucimannosidic ($Man_{3-4}(GlcNAc)_2$) sugars, which are rarely present on mature eukaryotic glycoproteins. *In situ* fluorescence using concanavalin A and *Pisum sativum* agglutinin predominantly stained the entire parasite body. Visualization of *Toxoplasma* glycoproteins purified by affinity chromatography followed by detailed proteomics and glycan analyses identified components involved in gliding motility, moving junction, and other additional functions implicated in intracellular development. Importantly tunicamycin-treated parasites were considerably reduced in motility, host cell invasion, and growth. Collectively these results indicate that *N*-glycosylation probably participates in modifying key proteins that are essential for host cell invasion by *T. gondii*. *Molecular & Cellular Proteomics 7:891–910, 2008.*

Apicomplexans are protozoan parasites defined by the presence of a complex of specialized organelles at their apical end (1). The phylum Apicomplexa contains many important pathogens of humans and animals, including the causative agents of malaria (*Plasmodium* spp.) and chicken coccidiosis (*Eimeria* spp.) as well as some of the opportunistic infections associated with AIDS patients such as *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* is uniquely adapted to infect a wide range of hosts, including virtually all warm blooded animals and up to 50% of the world's human population. The primary transmission route in humans is via ingestion of undercooked contaminated meat, particularly lamb, and contact with feces from infected domestic cats. The parasite causes a serious opportunistic disease (toxoplasmosis) in congenitally infected infants that can lead to severe syndromes including congenital malformations such as blindness, mental retardation, and hydrocephaly in children exposed *in utero*. More attention has been paid to *T. gondii* because toxoplasmosis is a common opportunistic infection in immunocompromised individuals with AIDS and in transplant patients (2, 3). Although the parasite has a sexual cycle occurring in cats, in mammalian non-feline hosts, *T. gondii* is found in two haploid asexual forms, the rapidly replicating tachyzoites and the slowly dividing, quiescent encysted bradyzoites. Infection during the acute phase is rapidly established in the host by the fast replicating tachyzoites, which can invade a broad range of cell types. Unlike other protozoan pathogens that hijack the pre-existing host cell uptake machinery, *T. gondii* actively gains entry into host cells. Penetration is of paramount importance for survival and relevant to its pathogenesis during acute infection. In response to immune defense, tachyzoites differentiate into encysted bradyzoites that remain in the brain and other organs throughout the life of chronically infected hosts. The reactivation of encysted bradyzoites into actively replicating and cytolytic tachyzoites is the cause of fatal toxoplasmic encephalitis in AIDS patients (4). Like all apicomplexan parasites, *T. gondii* lacks cilia or flagella throughout most of its life cycles and enters into host cells using an unusual form of gliding motility (5). The process of host cell invasion also requires contact with the host cell plasma membrane followed by reorientation and generation of a motive force ensured by the actomyosin motor, which drives gliding and penetration into a novel, parasite-induced structure called the parasitophorous vacuole (6–9). Success-

From the ‡Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France, §Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bioorganique, CNRS UMR 7178, Université Louis Pasteur, 67087 Strasbourg, France, and ¶Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U 800, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Received, August 17, 2007, and in revised form, January 9, 2008
Published, MCP Papers in Press, January 9, 2008, DOI 10.1074/mcp.M700391-MCP200

© 2008 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
This paper is available on line at http://www.mcponline.org

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

ful invasion of host cells requires a highly regulated release of proteins from several parasite organelles, namely micronemes, rhoptries, and dense granules (Ref. 7 and see details in Fig. 9*C*). Microneme discharge occurs first. Their contents are involved in the attachment to the host cell membrane and the formation of a connection with the parasite's actomyosin system, thereby providing the motive force that drives motility and invasion (8, 9). We speculate that glycosylation of parasite proteins may be important for host cell recognition and invasion by *T. gondii*.

Protein *N*-glycosylation serves a wide variety of functions including signaling through interaction with lectins, protein stabilization, protease resistance, endosome sorting, protein folding, and secretion (10). In eukaryotes, the precursor for *N*-glycans is built up on the lipid carrier dolichol (Dol)[1] located in the endoplasmic reticulum (ER) membrane. Current evidence has established that the biosynthetic pathway is defined by the synthesis of the protein *N*-glycosylation precursor oligosaccharide $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$-PP-Dol. In most eukaryotes, this biosynthetic pathway of $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$-PP-Dol is highly conserved, and the glycan portion is transferred en bloc via the action of oligosaccharyltransferase enzymes to Asn residues within Asn-*X*-(Ser/Thr) sequons during protein translation and sequestration into the lumen of the ER (10, 11). However, it has been shown that other eukaryotes can transfer structures other than the largest lipid-linked oligosaccharide precursor, Dol-PP-$Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ (12–14). Processing of the precursor structure by glycosidase and glycosyltransferase enzymes within the ER and Golgi apparatus generates the final set of mature glycan structures.

Although studies have clearly highlighted *N*-glycosylation as an essential modification for protein folding, stability, half-life, secretion, and other relevant biological functions in most eukaryotic cells, very little is known concerning this issue in *T. gondii.* The presence of *N*-glycoproteins is indeed still controversial (15–19). In general, *N*-glycosylation is considered a rare post-translational modification in apicomplexan parasites. For example, the causative agent of malaria, *Plasmodium falciparum*, lacks most genes involved in lipid (dolichylpyrophosphate)-linked oligosaccharide donors (20). We applied proteomics and glycomics analyses as well as pharmacological approaches to elucidate the parasite's *N*-glycosylation biosynthetic pathway. This led to the elucidation of the major structures of protein *N*-linked glycans that suggests the presence of an almost complete early *N*-glycosylation biosynthetic pathway in *T. gondii*. In particular, we showed that several key proteins involved in gliding motility, moving junction, and other functions that are essential for host cell invasion by *T. gondii* are modified by *N*-glycosylation. Consistently inhibition of this post-translational modification dramatically impaired the parasite's motility, host cell invasion, and intracellular growth.

[1] The abbreviations used are: Dol, dolichol; ER, endoplasmic reticulum; PP, pyrophosphate; HFF, human foreskin fibroblast; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ConA, concanavalin A; PSA, *P. sativum* agglutinin; GC, gas chromatography; SAG, surface antigen; MIC, micronemal protein; GRA, dense granule protein; ROP, rhoptry protein; PNGase, peptide-N^4-(*N*-acetyl-β-glucosaminyl)asparagine amidase; PMAA, partially methylated alditol acetate; BLAST, Basic Local Alignment Search Tool; PFA, paraformaldehyde; mAb, monoclonal antibody; Hex, hexose; HexNAc, *N*-acetylhexosamine; Tg, *T. gondii*; MyoA, myosin A; MLC, myosin light chain; GAP, gliding-associated protein; RON, rhoptry neck protein; AMA, apical membrane antigen.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Growth and Isolation of Parasites—Human foreskin fibroblasts (HFFs) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, BioWhittaker, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine (Sigma), and 0.05% gentamycin (Sigma). Tachyzoites from RH or 76K strains were grown in monolayers of HFF cells, harvested, and purified as described previously (21). Encysted bradyzoites were purified from brains of mice chronically infected by *T. gondii* 76K for 2 months (22). These *in vivo* bradyzoites were freed by pepsin digestion (0.05 mg·ml^{-1} pepsin in 170 mM NaCl, 60 mM HCl) for 5–10 min at 37 °C. For some experiments, we generated transgenic lines of *T. gondii* 76K expressing β-galactosidase using the plasmid containing the promoter 5′GRA1 and untranslated 3′SAG1 that drives β-galactosidase expression as described previously (23). This plasmid also contains TUB1-CAT-3′SAG1, which allowed the expression of chloramphenicol acetyltransferase for selection of *T. gondii* stable transgenic β-galactosidase-expressing clones. One of the β-galactosidase-expressing clones of *T. gondii* was used to quantify parasite numbers during host cell infection and growth.

Detergent Extraction of Toxoplasma Proteins, Reduction, and Carboxyamidomethylation—Proteins were extracted on ice in a buffer of 0.5% (w/v) SDS in 100 mM Tris·HCl (pH 7.4). Insoluble material was removed by centrifugation at 3000 rpm for 15 min. Detergent was removed by extensive dialysis against 50 mM ammonium bicarbonate at 4 °C. The protein extracts were dissolved in 500 μl of 600 mM Tris·HCl (pH 8.3) and denatured by guanidine hydrochloride (6 M final concentration). The sample was incubated at 45 °C for 90 min, and the number of disulfide bridges was reduced using 300 μg of DTT. The sample was flushed with argon and incubated at 45 °C for 5 h. After addition of 1.8 mg of iodoacetamide, the sample was flushed with argon and incubated at room temperature overnight in the dark. The sample was then extensively dialyzed against 50 mM ammonium bicarbonate at 4 °C and lyophilized.

Tryptic, PNGase F, PNGase A, or α-Mannosidase Digestions—The reduced carboxymethylated proteins were digested with L-1-tosylamide-2-phenylethylchloromethylketone bovine pancreas trypsin (EC 3.4.21.4; Sigma) with an enzyme-to-substrate ratio of 1:20 (by mass), and the mixture was incubated for 24 h at 37 °C in 50 mM ammonium bicarbonate. The reaction was terminated by boiling for 5 min before lyophilization.

PNGase F (peptide-N^4-(*N*-acetyl-β-glucosaminyl)asparagine amidase, EC 3.5.1.52; Roche Applied Science) digestion was carried out in ammonium bicarbonate buffer for 16 h at 37 °C. The reaction was terminated by lyophilization, and the products were purified on a Sep-Pak C_{18} (Waters Ltd.) to separate the *N*-glycans from the peptides. After conditioning the Sep-Pak C_{18} by sequential washing with methanol (5 ml) and 5% acetic acid (2 × 5 ml), the sample was loaded onto the Sep-Pak, and the glycans were eluted with 3 ml of 5% acetic acid. Peptides were eluted with 3 ml of 80% acetonitrile containing 5% acetic acid. Acetonitrile was evaporated under a stream of nitrogen, and the samples were freeze-dried. Glycopeptides remaining

Molecular & Cellular Proteomics

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

after PNGase F digestion were further digested with PNGase A (peptide-N^4-(*N*-acetyl-β-glucosaminyl)asparagine amidase, EC 3.5.1.52; Roche Applied Science) in ammonium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) for 16 h at 37 °C using 0.5 milliunit of the enzyme. The reaction was terminated by lyophilization, and the products were purified on a Sep-Pak C_{18} (Waters Ltd.) as described above.

α-Mannosidase digestion was carried out on PNGase F-released glycans using the following conditions: 0.5 unit of enzyme (jack bean α-mannosidase, EC 3.2.1.24; Sigma) in 200 μl of 50 mM ammonium acetate buffer, pH 4.5. The enzyme digestion was incubated at 37 °C for 48 h with a fresh aliquot of enzyme added after 24 h and terminated by boiling for 10 min before lyophilization. An aliquot corresponding to 25% of the total sample was taken after the digestion and permethylated for MALDI-TOF-MS and gas chromatography (GC)-MS analysis.

Permethylation of Glycans—Permethylation of the freeze-dried glycans was performed according to the procedure developed by Ciucanu and Kerek (24). The reaction was terminated by adding 1 ml of ultrapure water followed by three extractions with 500 μl of chloroform. The pooled chloroform phases (1.5 ml) were then washed eight times with ultrapure water. The methylated derivative-containing chloroform phase was finally dried under a stream of nitrogen, and the extracted products were further purified on a Sep-Pak C_{18}. The Sep-Pack C_{18} was sequentially conditioned with methanol (5 ml) and water (2 × 5 ml). The derivatized glycans dissolved in methanol were applied on the cartridge, washed with 3 × 5 ml of water and 2 ml of 10% (v/v) acetonitrile in water, and eluted with 3 ml of 80% (v/v) acetonitrile in water. Acetonitrile was evaporated under a stream of nitrogen, and the samples were freeze-dried.

MALDI-TOF-MS—MALDI-TOF-MS experiments were carried out on a Voyager Elite DE-STR Pro instrument (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in the positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV, a pulse delay time of 200 ns, and a grid voltage of 66%. All spectra shown represent accumulated spectra obtained by 400–500 laser shots. Permethylated glycans were co-crystallized with 2,5-dihydroxybenzoic acid as matrix (10 mg/ml 2,5-dihydroxybenzoic acid in methanol/water solution (50:50)). The instrument was externally calibrated with a maltose ladder encompassing the *m/z* values of the analyzed samples.

Linkage Analysis—The permethylated native *N*-glycans were hydrolyzed in 300 μl of 4 M TFA at 100 °C for 4 h. After removing TFA by drying *in vacuo*, the permethylated compounds were then reduced at room temperature overnight by adding 200 μl of 2 M ammonia solution containing sodium borodeuteride (4 mg/ml). The reduction was terminated by adding acetic acid, and borates were eliminated under a stream of nitrogen in the presence of methanol containing 5% (v/v) acetic acid. After adding 20 μl of pyridine and 200 μl of acetic anhydride, peracetylation was carried out at 100 °C for 2 h. After evaporation under a stream of nitrogen, the partially methylated alditol acetates (PMAAs) were dissolved in chloroform, and the chloroform phase was washed 10 times with water. This PMAA-containing phase was finally dried under a stream of nitrogen, and the PMAAs were dissolved in methanol before GC-MS analysis. GC separation of PMAAs was performed using a Carbo Erba GC 8000 gas chromatograph fitted with a 25-m × 0.32-mm CP-Sil5 CB low bleed capillary column, 0.25-μm film phase (Chrompack France, Les Ullis, France). The temperature of the Ross injector was 260 °C. Samples were analyzed using a temperature program starting by a gradient of 2 °C/min from 130 to 180 °C after 2 min at 130 °C followed by a gradient of 4 °C/min until 240 °C. The column was coupled to a Finnigan Automass II mass spectrometer. PMAA analyses were performed in the electron impact mode using an ionization energy of 70 eV. Quantification of the various PMAA derivatives was carried out using total ion current of the MS detector in the positive ion mode.

Affinity Chromatography Using Concanavalin A-linked Agarose—All purification steps were carried out at 4 °C. Purified tachyzoites of RH strain (10^9 parasites) were lysed with 1 ml of buffer A containing 10 mM Tris·HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 1% Triton X-100, and protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics). After 1 h at 4 °C, insoluble material was removed by centrifugation at 10,000 × *g* for 15 min. The supernatant was incubated with concanavalin A (ConA)-agarose beads (from *Canavalin ensiformis*, jack bean, Type VA, Sigma) for 3 h and washed five times with buffer A without protease inhibitors. After a final wash with 62.5 mM Tris·HCl (pH 6.8), the bound proteins were eluted with 2 volumes of 2× SDS sample buffer and boiled at 95 °C for 5 min or with 0.5 M α-methyl-D-mannoside. Competition assays were also performed using ConA beads incubated with protein extract in the presence of 0.5 M α-methyl-D-mannoside. Large scale purification of glycoproteins for proteomics analyses was also performed according to the protocol described above except that protein extracts from 10^{10} tachyzoites were used. The eluted samples were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining.

Protein Identification by Mass Spectrometry—In-gel digestion was performed with an automated protein digestion system, MassPREP station (Waters, Milford, MA). The gel plugs were washed twice with 50 μl of 25 mM NH_4HCO_3 and 50 μl of ACN. The cysteine residues were reduced by 50 μl of 10 mM DTT at 57 °C and alkylated by 50 μl of 55 mM iodoacetamide at room temperature. After dehydration of the gel bands with ACN, the proteins were digested overnight in gel with 50 μl of 12.5 ng/μl modified pig trypsin (Promega, Madison, WI) in 25 mM NH_4HCO_3 at room temperature. The peptides released were extracted twice with 60% ACN in 5% formic acid and 100% ACN followed by excess ACN removal. Tryptic digests were analyzed by nano-LC-MS/MS using an Agilent 1100 series HPLC-Chip/MS system with a 43-mm reversed phase C_{18} column (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) coupled to an HCTultra ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The voltage applied to the capillary cap was optimized to −1750 V. For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes. The three most abundant peptides and preferentially doubly charged ions were selected on each MS spectrum for further isolation and fragmentation. The MS/MS scanning was performed in the ultrascan resolution mode at a scan rate of 26.000 *m/z* per second. A total of six scans were averaged to obtain an MS/MS spectrum. The complete system was fully controlled by ChemStation (Agilent Technologies) and EsquireControl (Bruker Daltonics) softwares.

Mass data collected during nano-LC-MS/MS analysis were processed, converted into *.mgf files, and searched first against the National Center for Biotechnology Information non-redundant (NCBInr) database using a local Mascot™ server (Matrix Science, London, UK). In addition, an in-house genome database was constructed using the complete genome sequence, downloaded as a single text file from The Institute for Genomic Research, and segmented into regular segments of well chosen length (7500 bp) with a determined overlap length (2500 bp). This nucleic acid database was imported into the local Mascot server, and the segments were translated in all possible reading frames.[2] Once expressed coding regions were identified thanks to the matching peptides on the genome sequence, the protein functions were determined by MS-BLAST sequence similarity searches. Searches were also performed using the annotated genome sequence available at ToxoDB. In both cases,

[2] S. Fauquenoy, W. Morelle, A. Hovasse, A. Bednarczyk, C. Slomianny, C. Schaeffer, A. Van Dorsselaer, and S. Tomavo, unpublished data.

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

protein identification was validated according to the established guidelines for proteomics data publication (25–27).

N-Glycosylated Protein Identification by Mass Spectrometry—Tryptic digests were analyzed by nano-LC-MS/MS using an Agilent 1100 series HPLC-Chip/MS system with a 43-mm carbon graphite column (Agilent Technologies) coupled to an HCTplus ion trap (Bruker Daltonics). The voltage applied to the capillary cap was optimized to −1750 V. The mass spectrometer ion transmission parameters were optimized for high *m/z* (1000 *m/z*). For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes. The three most abundant peptides and preferentially doubly charged ions were selected on each MS spectrum for further isolation and fragmentation. The MS/MS scanning was performed in the ultrascan resolution mode at a scan rate of 26.000 *m/z* per second. A total of six scans were averaged to obtain an MS/MS spectrum. The complete system was fully controlled by ChemStation (Agilent Technologies) and EsquireControl (Bruker Daltonics) softwares. For each protein identified, potential *N*-glycosylation sites were predicted using the NetNGlyc 1.0 Server, and *in silico* tryptic digestion was performed to generate the tryptic peptides containing a potential *N*-glycosylation site in their amino acid sequence. For each analysis, typical glycopeptide diagnostic ions were extracted from MS/MS ion current, and MS/MS spectra containing diagnostic ions were manually interpreted. Results were validated taking into account the following three types of fragment ions classically generated for glycopeptides: sugar neutral losses, non-glycosylated peptide fragments, and glycan backbone internal fragments.

Western Blotting—Glycoproteins, affinity-purified using a ConA column, resuspended in 2× SDS sample buffer and freshly isolated tachyzoites lysed with the same sample buffer were separated on SDS-polyacrylamide gels under non-reducing conditions and blotted to nitrocellulose by an electrophoretic transfer system (Bio-Rad system). Blots were blocked in TNT buffer (15 mM Tris·HCl (pH 8), 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20) with 5% dry milk and incubated with primary antibodies (monoclonal or rabbit polyclonal antibodies) followed by goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (Sigma), and the signal was detected by chemiluminescence using the ECL kit (Amersham Biosciences). *T. gondii*-specific antibodies were generously provided by Drs. M. Lebrun (anti-rhoptry neck protein 2 (RON2) and anti-apical membrane antigen 1 (AMA1), D. Boothroyd (anti-AMA1), P. Bradley (anti-RON1 and anti-apicoplast), D. Soldati (anti-myosin A (MyoA), anti-MLC1, and anti-gliding-associated protein 45 (GAP45) and J.-F. Dubremetz (anti-ROP2/3/4, anti-MIC, and anti-GRA).

Lectin and Immunofluorescence Localizations—Freshly isolated and purified tachyzoites were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 30 min on ice. For the localization of glycoproteins, fixed slides were permeabilized with 0.1% Triton X-100 prepared in buffer B containing 10 mM Tris·HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 $MnCl_2$ at room temperature. Free PFA was blocked by 0.1 M glycine in buffer C (similar to buffer B except that the Triton X-100 was at 0.01%) for 10 min at room temperature. Then parasites were incubated either with 10 μg/ml biotinylated concanavalin A (Type IV, Sigma) or 100 μg/ml FITC-coupled *Pisum sativum* agglutinin (PSA; Sigma) diluted in buffer C for 30 min at 37 °C. After three washes with buffer C, the ConA-treated slides were incubated with FITC-coupled streptavidin (Sigma) for 30 min at 37 °C and washed three times. For co-localization, slides containing intracellular parasites were incubated with lectins followed by incubation with monoclonal or polyclonal antibodies in PBS with 0.01% Triton X-100. Fluorescently conjugated secondary antibodies were added and incubated for 30 min at 37 °C. After three washes, slides were mounted in ImmunO (immunofluor mounting medium, MP Biochemicals Inc.), examined, and photographed on a Zeiss confocal microscope.

In Vitro Gliding Assays—Intracellular tachyzoites of the RH strain were treated with 5 μg/ml tunicamycin (Sigma) prepared at an initial concentration of 1 mg/ml in DMSO for 40 h at 37 °C. The untreated intracellular parasites incubated in DMSO only or tunicamycin-treated parasites were filtered as described above; chased with DMEM containing 10 mM HEPES, 1 mM EGTA; and centrifuged at 1,000 rpm for 10 min at room temperature. The parasite pellet was resuspended in medium as above, and 5×10^8 tunicamycin-treated or untreated tachyzoites were inoculated into a chamber containing a slide that had previously been coated overnight with 50% fetal calf serum in PBS. The slides were then incubated with the parasites at 37 °C for 15 min, rinsed in PBS, and fixed in 4% PFA in PBS. Trails left by gliding parasites were visualized by staining with the monoclonal antibody anti-surface antigen (SAG) 1 and photographed using a Zeiss Axiophot microscope.

Parasite Attachment, Host Cell Invasion, and Growth—To test parasite attachment and invasion, two assays were used to distinguish parasites that had attached and entered host cells from those that had entered and replicated in host cells. First, freshly purified tachyzoites of RH strain treated with tunicamycin or untreated parasites as described above were resuspended in DMEM containing 10% FCS, loaded onto slides containing confluent monolayer HFF cells, incubated at 37 °C for 10 min, then fixed with 4% PFA, and processed for immunofluorescence analysis. Second, tunicamycin-treated or untreated tachyzoites of RH strain were also loaded onto confluent monolayer HFF cells for 1 h, and intracellular growth was monitored for 24 h at 37 °C. Slides were rinsed with PBS, fixed with 4% PFA, washed with PBS, and stained with mAb anti-SAG1 followed by FITC-goat anti-mouse IgG. Attached/invaded parasites for 10 min-pulse infection or 1-h infection followed by growth for 24 h were quantified by single tachyzoites or replicated tachyzoites, and counting was performed for at least 500 host cells. Experiments were repeated three times, and data are expressed as the mean ± S.D. Third, parasite growth was alternatively quantified by using freshly isolated β-galactosidase-expressing 76K strain parasites to infect slides in 24-well plates containing HFF cells for 4 h at 37 °C. Four wells were individually treated with 5 μg/ml tunicamycin or DMSO alone. After 2 days of growth, one-fifth of each well was used to infect a new well containing monolayer HFF cells, and incubation was continued for 2 days under tunicamycin or DMSO treatment. The remaining parasites of the first cycle experiment were recovered, washed with PBS, and frozen. After the second cycle of treatment, one-fifth of each well was used to infect new monolayer HFF cells for the third cycle experiment. The parasite pellets were washed with PBS and lysed with buffer containing 100 mM HEPES (pH 8.0), 1 mM $MgSO_4$, 5 mM DTT, 1% Triton X-100. The β-galactosidase activity was quantified using a chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (Roche Applied Science) colorimetric assay (23). Three independent experiments were performed, and data are expressed as mean ± S.D.

RESULTS

MALDI-TOF-MS of N-Glycans Released from Detergent Extracts—To gain more insight into protein *N*-glycosylation by the parasite, we embarked on the determination of the major structures of *N*-glycans synthesized by *T. gondii*. Experimental strategies based on derivatization, chemical hydrolysis, exoglycosidase digestions, MALDI-TOF-MS, and GC-MS were used to characterize the glycans of *Toxoplasma* total protein extracts. Reduced and carboxamidomethylated *Toxoplasma* products were first digested with trypsin, and glycans were released from the resulting peptide/glycopeptide mixture by digestion with PNGase F. This enzyme is capable of releasing all known *N*-linked oligosaccharides except those

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

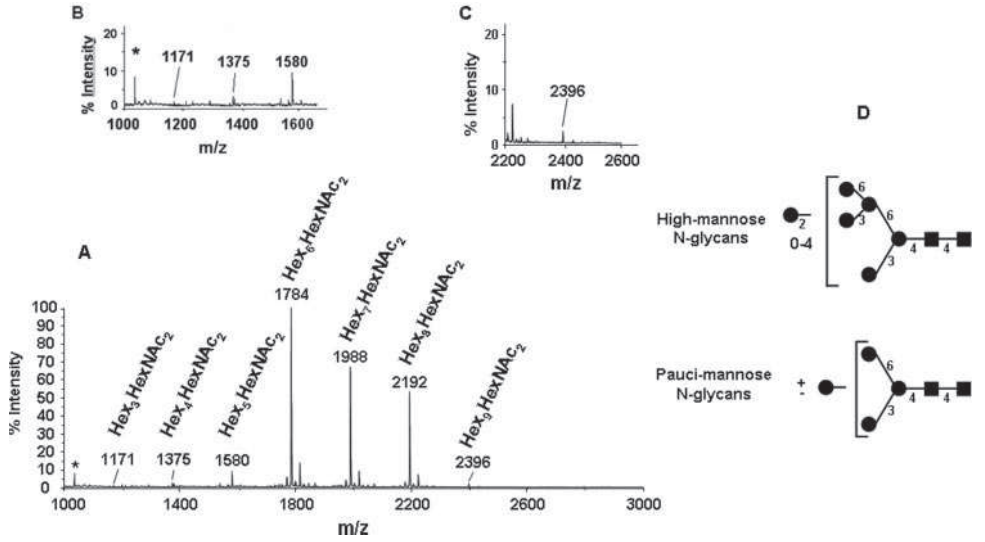


FIG. 1. **Positive MALDI-TOF mass spectrum of permethylated *N*-glycans from *T. gondii* glycoproteins.** *A*, the *N*-glycans were released from tryptic glycopeptides by digestion with PNGase F, separated from peptides by Sep-Pak purification, and permethylated. The three major molecular ions identified are $Hex_6(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1784), $Hex_7(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1988), and $Hex_8(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 2192), which correspond to $Man_6(GlcNAc)_2$, $Man_7(GlcNAc)_2$, and $Man_8(GlcNAc)_2$, respectively. *, contaminants from the MALDI-TOF DHB solution used to resuspend the solution. *B* and *C*, four minor molecular ions, $Hex_3(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1171), $Hex_4(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1375), $Hex_5(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1580), and $Hex_9(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 2396) corresponding, respectively, to $Man_3(GlcNAc)_2$, $Man_4(GlcNAc)_2$, $Man_5(GlcNAc)_2$, and $Man_9(GlcNAc)_2$ were also detected and are depicted in the *insets B* and *C* to view these minor peaks relative to the three major peaks. Ions that appear at *m/z* values slightly higher than those assigned to $Hex_{5-8}(HexNAc)_2$ in the spectrum correspond to species 30 Da larger than the fully methylated carbohydrate molecules (51). *D*, our proposed structures of *N*-glycans isolated from total extract glycoproteins of *T. gondii*. These fine *N*-glycan structures were determined twice in two independent productions of purified *T. gondii* materials by combining several enzymatic digestions, MALDI-TOF-MS, and GC-MS analyses. ■, *N*-acetylglucosamine; ●, mannose.

with fucose attached to the 3-position of the Asn-linked GlcNAc residue. Such PNGase F-resistant oligosaccharides have been found to be sensitive to PNGase A. PNGase F-released glycans were separated from peptides and were analyzed by MALDI-TOF-MS after permethylation and purification on a Sep-Pak C_{18} (Fig. 1). The permethylation derivatization of glycans increases the sensitivity of the detection of molecular ions. The peptide fraction was further digested with PNGase A, and the putative glycans released were analyzed by MALDI-TOF-MS after permethylation and purification on a Sep-Pak C_{18}. Fig. 1*A* shows the MALDI-TOF mass spectrum profile of the permethylated PNGase F-released glycans from *Toxoplasma* detergent extracts. Permethylated glycans give $[M + Na]^+$ species as the major ion. Three major molecular ions that correspond to $Hex_6(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1784), $Hex_7(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1988), and $Hex_8(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 2192) were observed. Four minor molecular ions corresponding to $Hex_3(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1171), $Hex_4(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1375), $Hex_5(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 1580), and $Hex_9(HexNAc)_2 + Na^+$ (*m/z* 2396) were also identified. Fig. 1, *insets B* and *C*, show enlargements of a spectrum that revealed these four minor species. Based on the MALDI-TOF-MS data and currently accepted models of *N*-glycan biosynthesis (10, 11), we conclude that the major *N*-glycans of *T. gondii* have compositions consistent with high mannose type structures ($Hex_{5-8}(HexNAc)_2$). Very minor *N*-glycans have compositions consistent with paucimannose type structures ($Hex_{3-4}(HexNAc)_2$). After PNGase F digestion, the peptide fraction was further digested with PNGase A. Putative PNGase A-released *N*-glycans were permethylated, purified on a Sep-Pak C_{18} cartridge, and analyzed by MALDI-TOF-MS. No signals corresponding to *N*-glycans were observed (data not shown). Thus, the PNGase F digestion was complete, and we could find no evidence that *N*-linked glycans with fucose attached to the 3-position of the Asn-linked GlcNAc were an important component of *Toxoplasma*. In addition, also no modification of terminal galactose and sialic acid was identified, suggesting that *T. gondii* may lack a part of the endoplasmic reticulum and Golgi trimming and maturation pathways that are highly conserved in other eukaryotes (10, 11).

Structural Analyses of N-Glycans Released by PNGase F—Linkage analyses on the PNGase F-released glycans by GC-MS shown in Table I are fully consistent with high mannose and paucimannose type structures being the constituents of the *N*-glycan population as terminal mannose and 2-linked mannose are the major residues. To define the anomeric configurations and also to confirm the presence of high mannose type structures, *N*-glycans released by PNGase F were subjected to treatment with α-mannosidase. An aliquot was taken after the digestion, permethylated, and examined by MALDI-TOF-MS after Sep-Pak C_{18} purification. After α-mannosidase treatment, the molecular ions at *m/z* 1171 ($Hex_3(HexNAc)_2$), 1375 ($Hex_4(HexNAc)_2$), 1580 ($Hex_5(HexNAc)_2$), 1784 ($Hex_6(HexNAc)_2$), 1988 ($Hex_7(HexNAc)_2$), 2192 (Hex_8-

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

TABLE I
GC-MS analysis of partially methylated alditol acetates obtained from the PNGase F-released N-glycans

Retention time	Characteristic fragment ions	Assignment	Relative abundance
min			
18.40	102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	Terminal mannose	0.81
22.34	129, 130, 161, 190	2-Linked mannose	1.00
28.36	118, 129, 189, 234	3,6-Linked mannose	0.58
33.30	117, 159, 233	4-Linked GlcNAc	0.38

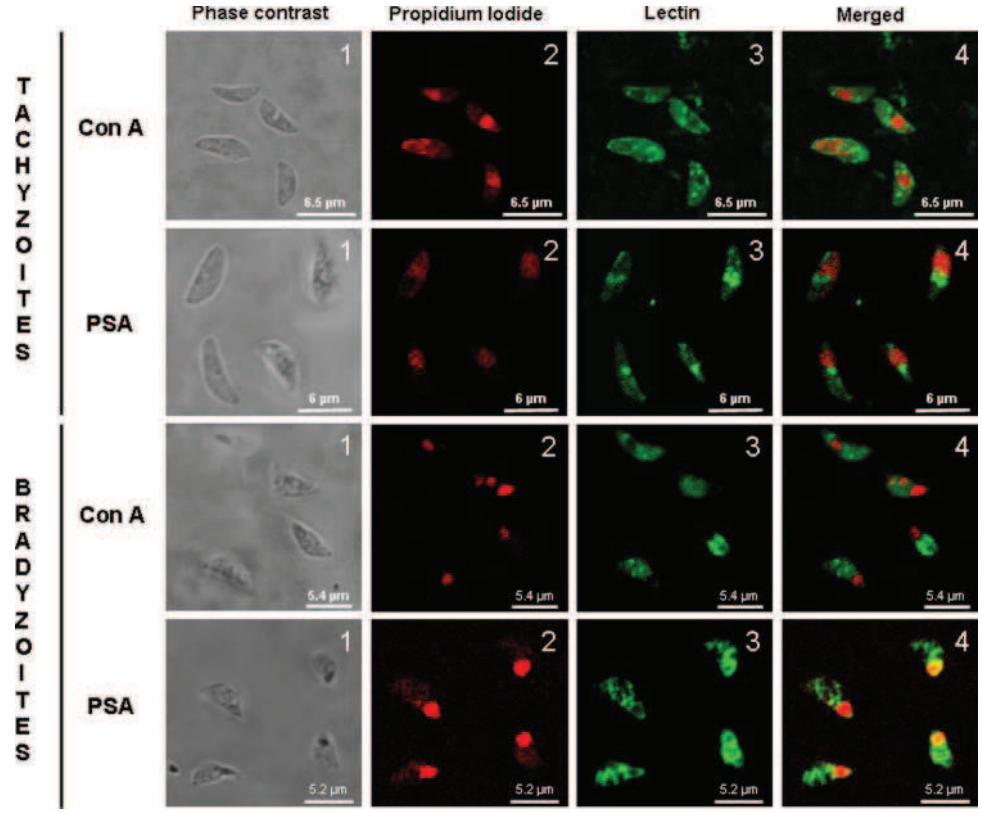


FIG. 2. **Confocal microscopy analysis of lectin-staining formaldehyde-fixed *T. gondii*.** Extracellular tachyzoites were purified from infected human foreskin fibroblasts, and bradyzoites were isolated from brains of mice chronically infected by *T. gondii*. ConA that is specific to α-D-mannose and α-D-glucose and PSA that exclusively recognizes α-D-mannose were used. The ConA signal was amplified by the FITC-conjugated streptavidin, whereas PSA was directly conjugated to FITC. *Panels 1*, phase-contrast. *Panels 2*, propidium iodide staining of nucleus (*red*). Note that mRNAs are also labeled by this dye, and the *yellow* signals around the nucleus (*panel 4*, *PSA*) indicate co-localization between the lectin signal and the endoplasmic reticulum-containing mannose-rich glycoproteins and lipid precursors and the propidium iodide staining. *Panels 3*, lectins. *Panels 4*, merged signal between propidium iodide staining and lectin labels.

$(HexNAc)_2$), and 2396 ($Hex_9(HexNAc)_2$) were abolished with a concurrent increase in signals consistent with the core of digested *N*-glycans $Hex_1(HexNAc)_2$ (*m/z* 763) and Hex_2-$(HexNAc)_2$ (*m/z* 967). Taken together, these detailed structural analyses indicated that the major *Toxoplasma N*-linked glycans are composed of high mannose ($Man_{5-8}(GlcNAc)_2$) and paucimannose ($Man_{3-4}(GlcNAc)_2$) type structures (Fig. 1*D*).

Subcellular Localization of Toxoplasma N-Glycoproteins—Indirect fluorescence staining of *T. gondii* was carried out to localize novel glycoproteins within extracellular parasites. Based on the structural data suggesting the apparent lack of complex type of *N*-glycans with sialic acid, fucose, and galactose residues in *T. gondii*, the two lectins ConA and PSA that recognize oligomannosidic glycans were tested. Although ConA is specific to both terminal α-D-mannose and α-D-glucose residues, PSA defines an exclusive terminal α-D-mannose-binding lectin. We decided to test both lectins to discriminate the signal of a polymer glucose named amylopectin that is abundantly present in the cytoplasm of bradyzoites and to a lesser extent in tachyzoites of *T. gondii* (28). When stained with ConA, the rapidly replicating tachyzoite forms that cause the acute phase of the disease (toxoplasmosis) revealed a fluorescence signal covering the entire body of the tachyzoites with a few dots of cytoplasmic punctate

Molecular & Cellular Proteomics
Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

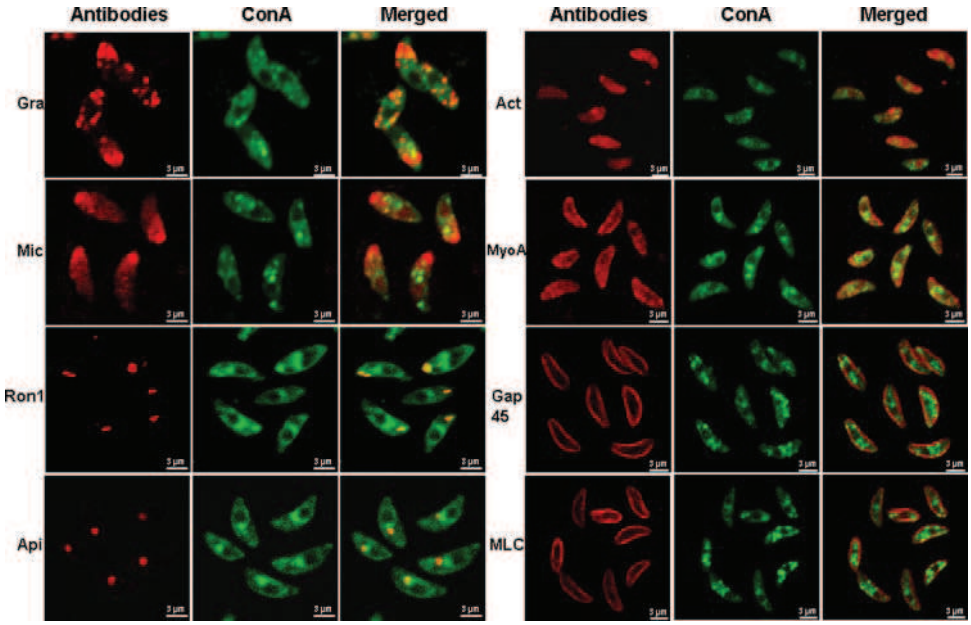


FIG. 3. **Colocalization of ConA fluorescence with different *T. gondii* organelle-specific markers.** Double fluorescence assays were performed using ConA revealed with FITC-conjugated streptavidin followed by incubation with monoclonal or polyclonal antibodies specific for protein markers of rhoptries (*Ron1*), microneme (*Mic1*), dense granules (*Gra1*), apicoplast (*Api*), actin (*Act*), MyoA, gliding-associated protein (*Gap45*), and myosin light chain 1 (*MLC*). The signals corresponding to monoclonal and polyclonal antibodies were revealed by a secondary goat Alexa Fluor 594-conjugated antibody (*red*). *Panel 1*, monoclonal or polyclonal antibody; *panel 2*, ConA; *panel 3*, merged signals between antibodies and ConA. The images were examined and photographed on a Zeiss confocal microscope.

fluorescence (Fig. 2, *panel 3*). No specific or obvious labeling of late secretory organelles could be distinctly observed (Fig. 2, *panel 3*). The lectin PSA also gave identical cytoplasmic patterns in tachyzoites (Fig. 2, *PSA*, *panel 3*) with the presence of pronounced staining of vesicles found close to the nucleus stained in red by propidium iodide (*panel 2*). We also investigated the presence of lectin-stained glycoproteins in the dormant encysted bradyzoite forms that are responsible for the chronic phase of the disease. The released bradyzoites obtained from 2-month-old cysts isolated from chronically infected mice also positively stained with both ConA and PSA, suggesting the presence of *N*-linked glycoproteins in the dormant form of *T. gondii* (Fig. 2, *Bradyzoites*, *Con A*, *panel 3*). The patterns of ConA and PSA showed clusters of scattered staining throughout the cytoplasm of bradyzoites (Fig. 2, *Bradyzoites*, *panels 3*), suggesting that these dormant parasite stages are still expressing *N*-linked glycans *de novo*. We cannot rule out that *N*-glycoproteins produced in tachyzoites or at the beginning of bradyzoite differentiation (in younger bradyzoites) are stably conserved throughout the life cycle of encysted bradyzoites. With the exception of lectin signals scattered throughout the whole body of the parasite and surrounding the nucleus (Fig. 2, *PSA*, *panel 4*, *yellow staining*) that suggest endoplasmic reticulum recognition, our experimental observations using a confocal microscope did not allow us to make a conclusion about the presence of *N*-glycoproteins in *T. gondii*-specific secretory organelles named rhoptries, micronemes, and dense granules that are known to be involved in the host cell attachment, invasion, and intracellular growth of *T. gondii.*

Colocalization of ConA Signal with Specific Markers of Subcellular Compartments of T. gondii—Indirect immunofluorescence and ConA staining of *T. gondii* tachyzoites were carried out to co-localize the lectin signal with that of several antibodies that are markers of different subcellular compartments. Fig. 3 shows diverse degrees of co-localization between ConA and markers of *T. gondii* late secretory organelles such as dense granules (mAb anti-GRA1, *Gra panel*) and micronemes (mAb anti-micronemal protein 1 (MIC1), *Mic panel*). Most importantly, a strong co-localization with *T. gondii* rhoptry neck protein 1 was revealed by a specific polyclonal antibody (*Ron1 panel*). Staining myosin A and actin with specific antibodies showed a pattern displaying weaker co-localization with ConA fluorescence (*Act* and *MyoA panels*) than that seen for RON1 (*Ron1 panel*). In addition, no convincing co-localization was observed when polyclonal antibodies specific to gliding-associated protein 45 (*Gap45 panel*) and myosin light chain (*MLC panel*), two markers of the glideosome located between the inner complex membrane and the parasite's plasma membrane, were tested. Because it has been described that one major component of the glideosome, TgGAP50 is *N*-glycosylated (19), the lack of convincing co-localization of lectin fluorescence with glideosome proteins might be explained by the weakness of the lectin signal. Alternatively the *N*-glycans carried by these proteins may be involved in protein-protein and/or glycan-protein interactions

Molecular & Cellular Proteomics

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

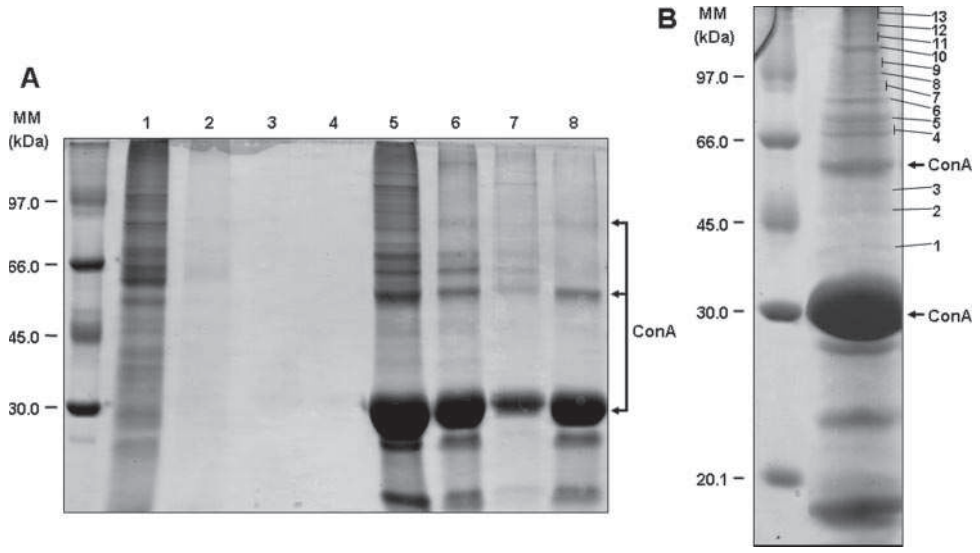


FIG. 4. **Purification of *T. gondii N*-linked glycoproteins using a ConA column.** *A*, the pilot experiment performed with detergent extract from 10^9 tachyzoites. *Lane 1*, total detergent extract used; *lanes 2–4*, efficacy of purity of glycoprotein-binding ConA column checked by taking three aliquots corresponding, respectively, to the first, third, and fifth/last washes; *lane 5*, eluate of ConA-binding glycoproteins using 2× SDS sample buffer; *lane 6*, competition assay performed by incubating the detergent protein extract in the presence of 0.5 M α-methylmannoside inhibitor before elution as described in *lane 5*; *lane 7*, elution of ConA-binding glycoproteins with 0.5 M α-methylmannoside; *lane 8*, elution of ConA beads alone by 2× SDS sample buffer. *B*, large scale purification of ConA-binding glycoproteins using detergent extract from 10^{10} tachyzoites. After elution with 2× SDS sample buffer and SDS-PAGE, 13 bands were excised and processed for proteomics analyses. The contaminated proteins corresponding to different ConA species eluted from the beads are indicated by *arrows*. *MM*, molecular mass in kilodaltons.

that may render these structures inaccessible to lectin recognition. Interestingly an apparent co-localization was observed with the apicoplast, a plastid-like organelle found in apicomplexan parasites (depicted in Fig. 9*C*) using a monoclonal antibody specific to this organelle (Fig. 3, *Api panel*). As it has been described that proteins translocated into apicoplast are transported across the endoplasmic reticulum (29), we hypothesize that some apicoplast proteins containing potential glycosylation sequons may in fact be *N*-glycosylated. This issue will be further discussed.

Nature of N-linked Glycoproteins Binding to ConA—It was difficult to firmly establish which of the parasite's specific organelles and *N*-glycoproteins were labeled by fluorescence using these lectins. Affinity purification therefore was carried out for the isolation of *N*-linked proteins that bind to ConA. A pilot experiment was performed using a total detergent extract of 10^9 tachyzoites, and the ConA-binding glycoproteins eluted were checked by SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining (Fig. 4*A*). After five successive washes were tested for efficiency (Fig. 4*A*, *lanes 2–4*), *N*-linked glycosylated proteins bound to ConA-beads were eluted by 2× SDS sample buffer. Interestingly only glycoproteins ranging from 45 kDa to higher than 100 kDa were identified (Fig. 4, *lane 5*). The specificity of *N*-glycosylated proteins binding to ConA was demonstrated by a competition assay performed by incubating detergent protein extracts in the presence of 0.5 M α-methylmannoside inhibitor (*lane 6*). Alternatively the elution was directly performed with the same inhibitor (*lane 7*) instead of SDS sample buffer (*lane 5*). The disappearance of numerous glycoproteins when the competition assay was performed or their appearance during the specific elution with 0.5 M α-methylmannoside suggested the presence of several *N*-glycosylated proteins ranging between 45 and >100 kDa. Then large scale preparation was performed using total detergent extract from 10^{10} tachyzoites. Thirteen gel slices (bands) were excised from the gel (as indicated in Fig. 4*B*) and digested with trypsin as described under "Experimental Procedures." The resulting peptides were analyzed by nano-LC-MS/MS, and the peak lists generated were submitted to classical protein database searches via the Mascot search engine that identified 26 proteins (proteins not footnoted in Tables II and III and supplemental data). Proteins were identified using a minimum of two matching peptides, and only unambiguous identifications with at least two matching peptides presenting high quality MS/MS spectra (MS/MS ion score higher than 40) were retained. As the predicted proteome of *T. gondii* was not fully represented and annotated in the available protein databases we decided to use a six-frame translation of the complete genome sequence in a second step for the protein identification. This approach allowed the identification of 11 additional proteins that were not present in the NCBI protein database of *T. gondii* (proteins footnoted in Table III and supplemental data). In many cases, the same protein was detected in multiple gel slices as mentioned above presumably due to carryover of high abundance proteins from one band to another during SDS-PAGE because of partial degra-

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

TABLE II
Proteins identified by mass spectrometry using nano LC-MS/MS analysis and the NCBInr databases

Protein name	Organism	Accession number	Molecular mass (theoretical)	Start-end	Sequences	Gel bands	Potential *N*-glycosylation sites in sequence
			Da				
MyoA (TgM-A)	*T. gondii*	gi|50400802	93,334	5–12	TTSEELKTATALK	2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	9 sites (67, 147, 184, 245, 246, 345, 489, 659, 672)
				35–56	GFQIWTDLAPSVKEEPDLMFAK		
				126–143	NQIYTTADPLVVAINPFR		
				144–155	DLGNTTLDWIVR		
				156–164	YRDTFDLSK		
				165–174	LAPHVFYTAR		
				176–185	ALDNLHAVNK		
				222–240	IQNAIMAANPVLEAFGNAK		
				253–260	FMQLDVGR		
				266–276	FGSVVAFLLEK		
				288–297	SYHIFYQMCK		
				307–316	FHILPLSEYK		
				317–342	YINPLCLDAPGIDDVAEFHEVCESFR		
				374–386	DGGIDDAAAIEGK		
				394–404	ACGLLFLDAER		
				413–422	VSYAGNQEIR		
				425–434	WKQEDGDMLK		
				440–455	AMYDKLFMWIIAVLNR		
				465–479	IFMGMLDIFGFEVFK		
				480–497	NNSLEQFFINITNEMLQK		
				498–509	NFVDIVFDRESK		
				520–531	ELIFTSNAEVIK		
				537–563	NNSVLAALEDQCLAPGGSDEKFLSTCK		
				577–602	VSPNINFLISHTVGDIQYNAEGFLFK		
				609–634	AEIMEIVQQSKNPVVAQLFAGIVMEK		
				676–684	KPLDWVPSK		
				685–701	MLIQLHALSVLEALQLR		
				709–719	RPFKEFLFQFK		
				756–761	TMVFLK		
				774–793	ECLSSWEPLVSVLEAYYAGR		
				803–808	TPFIIR		
				815–831	RHLVDNNVSPATVQPAF		
MyoB/C (TgM-B)	*T. gondii*	gi|50400803	132,672	132–149	SIIYTTAEPLLVAINPFK	13	B: 8 sites (83, 94, 180, 181, 304, 427, 619, 648); C: 9 sites (42, 153, 164, 250, 251, 374, 497, 689, 718)
				215–224	FFASASSEVR		
				225–245	TTIQDTIMAGNPILEAFGNAK		
				574–584	LEPSGFFLESR		
				823–836	HLEPDSINISPEER		
				1069–1080	DVSYLIGMLFQR		
Membrane skeleton protein IMC2A	*T. gondii*	gi|133990372	168,268	65–78	VLNIEVYTYLAGAK	11, 12, 13	5 sites (49, 363, 400, 409, 449)
				117–124	GLPYNVLR		
				152–159	TLNDLLLK		
				244–253	NAVETITVEK		
				261–273	LLLIGNTGIGEYK		
				288–303	FLWTNEFDQTVSALAK		
				337–343	WYDIFVK		
				347–369	LDIPWLMTLGEEEALVNPSASVR		
				475–483	LQYVDDLYK		
				555–566	GALYPILCWSGR		

Molecular & Cellular Proteomics

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

TABLE II— *continued*

Protein name	Organism	Accession number	Molecular mass (theoretical)	Start-end	Sequences	Gel bands	Potential *N*-glycosylation sites in sequence
			Da				
				590–599	FFAPVNSQYK		
				620–630	DYLVAEFIDSR		
				649–660	DIQFMDPVAEGR		
				700–711	FYQTEINDLVSK		
				744–760	IAQAVSEMNVLAGDYDK		
				767–782	ELIDLKDTMPAADDPR		
				783–791	YAQLFQLEK		
				826–834	MILNMQVIR		
				836–845	EIVAVENDIK		
				933–944	GTQEELAAMQQR		
				957–963	VWQLLQR		
				976–989	ILVNQVEKLPEETR		
				1041–1054	AELVLAQESLLSEK		
				1158–1168	VSPLLSPEER		
				1174–1185	LVGPVQDLPQKK		
Actin	*T. gondii*	gi|1703160	41,908	30–40	AVFPSIVGKPK	2, 3, 6, 8, 9, 11, 12	1 site (13)
				97–114	VAPEEHPVLLTEAPLNPK		
				149–178	TTGIVLDSGDGVSHTVPIY-EGYALPHAIMR		
				185–192	DLTEYMMK		
				198–211	GYGFTTSAEKEIVR		
				240–255	SYELPDGNIITVGNER		
				256–270	FRCPEALFQPSFLGK		
				317–327	ELTSLAPSTMK		
				361–373	EEYDESGPSIVHR		
Tubulin β chain (β-tubulin)	*T. gondii*	gi|135499	49,814	63–77	AILMDLEPGTMDSVR	13	2 sites (184, 370)
				78–103	AGPFGQLFRPDNFVFGQT-GAGNNWAK		
				163–174	IMETFSVFPSPK		
				253–262	LAVNLIPFPR		
				283–297	ALSVPELTQQMFDAK		
Membrane anchor for myosin XIV precursor	*T. gondii*	gi|46948064	46,607	54–68	FVGLGNWGSGSYGQK	1, 3	3 sites (101, 136, 228)
				105–121	WQSEFENVYSDANGALK		
				122–135	MPFFTVLGVDDWSR		
				144–156	TELTYAVTSEQIKDGK		
				160–178	LAPADATEAAAAENHGYPK		
				240–246	TLELAPK		
				247–257	ILDYIIVVADR		
				267–280	GDSMLQYYLQPLLK		
				322–347	HSGSLYYAGETGFCLFELTA-EGLVTR		

dation during sample preparation or because of the presence of multiple protein isoforms due to heterogeneity of *N*-linked glycans carried by these proteins. Where a protein was detected in multiple gel slices (column designated Gel bands) and multiple MS data sets were obtained, all the matching peptides identified are shown (column designated Sequences). The nature of *T. gondii* proteins identified during this proteomics study is in good agreement with the molecular masses in kilodaltons of proteins that specifically bind to the ConA as determined by SDS-PAGE (Fig. 4). Further experimental verification of proteomics data using Western blot analyses also validated the presence of different proteins such as myosin A, GAP45, and rhoptry proteins in the *T. gondii* material eluted by affinity purification using ConA beads (data not shown). The three surface proteins including the minor glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein gp23, which has been described previously as an *N*-linked glycosylated protein (17), were not detected in the ConA-binding glycoproteins (data not shown). This suggests that either lower amounts of gp23 or its particular *N*-glycan modifications might explain the absence of gp23 identification. These results also confirm the absence of co-localization between the ConA signal and the major surface antigen SAG1 using a specific monoclonal antibody (data not shown). Several proteins of dense granules and micronemes tested by Western blots using specific monoclonal antibodies were also

Molecular & Cellular Proteomics

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

TABLE III
Identification of additional ConA binding proteins by mass spectrometry

Protein name	Organism	Accession number	Molecular mass (theoretical)	Start - end	Sequences	Gel bands	Potential *N*-glycosylation sites in sequence
			Da				
Rhoptry neck protein 2	*T. gondii*	gi|71559160	155,451	248–259 507–520 616–629 995–1010	VAMIDAVPSGIR VVADPTAYGEIFER TFCAQPTSFLSSFR VPGFDTISAANEQLR	11	5 sites (275, 354, 393, 844, 1340)
Rhoptry neck protein 1	*T. gondii*	gi|71559158	127,355	900–914 1096–1107	DACVNQGYQSVSLTK GTLSSQQQAFMK	7	10 sites (69, 114, 632, 720, 738, 756, 774, 792, 810, 875)
Rhoptry protein 18	*T. gondii*	gi|84618297	62,342	241–250 423–432	FVSVTTGETR LFLGDFGTYR	3	1 site (377)
Rhoptry protein 7	*T. gondii*	gi|84618158	63,414	175–197 303–313 326–343 370–389 441–455 459–466 523–531 532–544	ERPQPVFTEGDPPDLETNSL-YYR- HQALAIGLFQK FLAPFDLVTIPGKPLVQK FVEELYELPTEDRPLADAAR VVAENAQGFSPPEVR GGLLFGPR LINPSVEAR LLALQATETPEYR	2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12	1 site (525)
Apical membrane antigen 1 homolog	*T. gondii*	gi|2293476	59,978	84–94 108–121 122–142 143–153 166–172 185–194 197–211 218–231 232–257 276–293 342–355 412–425	EPAGLCPIWGK NNFLEDVPTEKEYK QSGNPLPGGFNLNFVTPSG-QR ISPFPMELLEK CAEFAFK YRYPFVYDSK LCHILYVSMQLMEGK GEPPDLTWYCFKPR KSVTENHHLIYGSAYVGENP-DAFISK CLDYTELTDTVIERVESK NYGFYYVDTTGEGK FPDSFGACDVQACK	6	2 sites (58, 393)
Perforin-like protein 1	*T. gondii*	gi|118500931	124,646	423–435 448–458 797–813 1074–1088	QAVPQESVADLNR AAAPLSAVYTK AVGLTPQDLSALTGVTR TVNEPAMHVATDVGK	8	7 sites (246, 253, 333, 539, 607, 744, 1103)
Sortilin, putative[a]	*P. falciparum* (isolate 3D7)	gi|124809739	102,270		SWTEITDLLK SSEAATGTVAVDSIIVSPVDKR LVADYVVQFSWGDKK LGNTDHIFFTQHR NVDLMYTPDFGATITR QTVSLLVSTDGGK LPVEIEER YSLSLPNNIR TSTGECEFDKVLSLEGVYLAN-FK GGVWSYLK DGGVSWIEAHK LAPPRFDEDNVELL FLLSNGYFFVAK	10	8 sites (56, 112, 116, 123, 375, 869, 876, 881)
DNAJ domain protein[a]	*Plasmodium berghei*	gi|68072203	44,189		QNLYSVLGVK FKEISFAYEILNNAEK QVYDEYGEEGLER LNVSLEQLYK	2	1 site (44)

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

TABLE III—*continued*

Protein name	Organism	Accession number	Molecular mass (theoretical)	Start - end	Sequences	Gel bands	Potential *N*-glycosylation sites in sequence
			Da				
PfSec61[a]	*P. falciparum*	gi|3057044	52,228		VITQQMGPGFIVQNQIQDDT-CVDQGK LGHEPGDLVLVIQELPHKR IGDDLEMSIR ISLLEALVGFER SFIHLDNTPVR FMVSYPAALDEK SADPFYWMR GQQGSYPIK	2	2 sites (139, 241)

[a] These proteins were identified by our in-house constructed genome database generated using complete genome sequence, downloaded as a single text file from the TIGR and segmented into regular segments of 7500 bps with a determined overlap length of 2500 bps. These nucleic acid databases were imported into the local Mascot server, and the segments were translated in all possible six reading frames. The other proteins were identified as described in Table II.

not detected in the ConA-binding material (data not shown). Taken together, these data are consistent with the presence of a limited number of surface proteins, dense granules, and micronemes in the ConA-binding material analyzed by proteomics approaches. Nevertheless many novel potentially *N*-glycosylated proteins in *T. gondii* were identified.

Proteomics Analysis Reveals Many Constituents for Parasite Motility and Host-Parasite Interactions—The proteomics approaches resulted in the unexpected identification of proteins involved in gliding motility such as myosin A (30), membrane anchor myosin XIV (also named GAP50) (19), actin, and the membrane skeleton protein IMC2A. These components play key roles in the particular gliding motility of parasites that allows *T. gondii* to enter into host cells (31–33). Strikingly bioinformatics analyses indicated that these components of the glideosome contain between one and nine Asn-*X*-(Ser/Thr) sequons required for *N*-glycosylation (Table II). The second class of *N*-linked glycosylated proteins that we identified are components of the late apical secretory organelles, named rhoptries (Table III). These Asn-*X*-(Ser/Thr)-containing glycoproteins include RON2 and AMA1 involved in moving junction formation that is required for host cell invasion (34–36). RON1 contains 10 Asn-*X*-(Ser/Thr) sequons, the highest number of consensus sites identified during this study, whereas RON2 has only five consensus sites (Table III). Another category of secreted proteins present in the rhoptry was also identified (Table III and supplemental data). These are known to be released from the rhoptry during host cell invasion and participate in the formation of the vacuole in which the parasites multiply (37–39). These ROPs that bound to ConA include the protein kinase-related family members ROP2, ROP5, ROP7, and ROP18 (Table III and supplemental data). However, only ROP7 and ROP18 appeared to contain one genuine *N*-glycosylation sequon (Table III), suggesting that the other ROPs (ROP2, ROP4, and ROP5) are unlikely to be glycosylated but were pulled down together with other *T. gondii* ConA-binding *N*-linked glycoproteins. In addition, other proteins identified by proteomics also include myosin B/C known to be involved in parasite division (40) and the skeleton component tubulin (41) (Table II). Additional bioinformatics searches using our in-house genome database (see details under "Experimental Procedures") identified all potentially *N*-linked glycoproteins, and in addition to the putative partners described above, 11 novel proteins were detected (proteins marked by asterisk in Table III and supplemental data). Some of these novel putative *N*-glycoproteins are highly conserved in the Apicomplexa, implying that they fulfill parallel roles in the biology of these parasites. For example, we identified the *Plasmodium* homologue of perforin-like protein 1 (Ref. 42 and Table III) and a putative sortilin (Ref. 43 and Table III). Surprisingly HSP70, HSP90, elongation factor 1a, and eukaryotic translation initiation factor 4A were also detected (supplemental data). Finally some proteins that do not contain the Asn-*X*-(Ser/Thr) sequons were also found, confirming that unglycosylated partners can be co-precipitated with *T. gondii N*-glycoproteins (supplemental data). However, HSP70 and HSP90 may be involved in the folding and stabilization of genuine *N*-linked glycoproteins of the glideosome, moving junction, or other subcellular compartments of the parasites.

Deciphering the Precise Nature of N-Glycopeptides by Structural Analysis of Both N-Glycans and Peptides—We established the structures of *N*-linked glycopeptides of a major *T. gondii* glycoprotein, GAP50, identified by proteomics analysis by determining the nature of both *N*-linked glycans and trypsin-generated peptides. Two MS/MS spectra show the presence of typical diagnostic ions, MH^+ *m/z* 366.14 and 528.19 corresponding to glycan backbone internal fragments. Both are found in bands 1 and 3 (MS/MS spectra of doubly protonated parent ions at *m/z* 1248.10 and 1329.50). The MS/MS spectrum of the doubly protonated parent ion at *m/z* 1248.10 shows fragment ions, which correspond to sugar neutral losses on the glycopeptide. Therefore, one ion of mass MH^+ *m/z* 953.47 was observed, corresponding to the peptide

Molecular & Cellular Proteomics

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

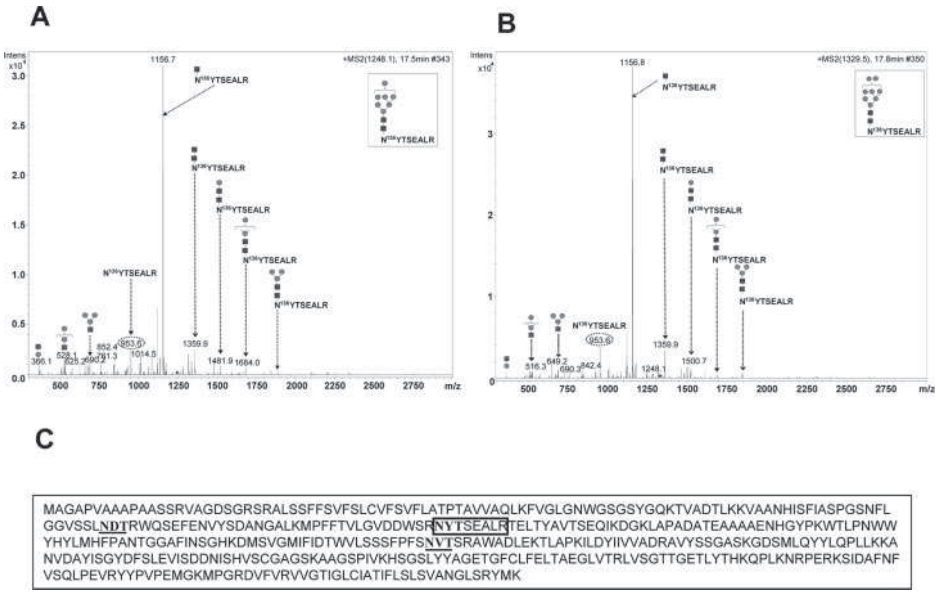


FIG. 5. **Identification of peptide and *N*-glycans from the membrane anchor myosin XIV also named GAP50.** *A*, the MS/MS spectrum from parent ion at $m/z = 1248.10$ corresponding to the peptide NYTSEALR with the *N*-glycosylation $Man_7(GlcNAc)_2$ in position Asn^{136}. *B*, the MS/MS spectrum from parent ion at $m/z = 1329.50$ corresponding to the peptide NYTSEALR with the glycosylation $Man_8(GlcNAc)_2$ in position Asn^{136}. *C*, the position of the peptide NYTSEALR with the consensus NYT alternatively modified by $Man_7(GlcNAc)_2$ and $Man_8(GlcNAc)_2$ is indicated (*boxed*) in the GAP50 protein sequence. The two additional *N*-glycosylation sequons are *underlined* and *bold*.

NYTSEALR that is a potential glycosylated tryptic peptide from the membrane anchor myosin XIV (GAP50), and was only identified in these two bands (Fig. 5). Combining the two data above allowed us to determine the glycan structure $Man_7(GlcNAc)_2$ at position Asn^{136} of GAP50 (Fig. 5*A*). In addition, the MS/MS spectrum of the doubly protonated parent ion at m/z 1329.50 is clearly similar to the MS/MS spectrum of parent ion m/z 1248.10 (same fragment ions and presence of the ion of mass MH^+ m/z 953.47). Only the doubly protonated parent ion masses show a mass difference of 162 Da corresponding to the mass of a mannose. These two data allowed us to define the glycan structure $Man_8(GlcNAc)_2$ at the same position, Asn^{136}, of the membrane anchor myosin XIV (GAP50) (Fig. 5*B*). Taken together, the data confirmed the presence of the following two high mannose structures, $Man_7(GlcNAc)_2$ or $Man_8(GlcNAc)_2$, on the peptide NYTSEALR with NYT as a consensus site in the membrane anchor myosin XIV. As mentioned, TgGAP50 is an integral membrane protein that anchors *T. gondii* myosin A (TgMyoA), its associated light chain (TgMLC1), actin, and TgGAP45 to the inner membrane complex, and these constitute the glideosome that is involved in motility required for host cell invasion (19). TgGAP50, which contains three Asn-*X*-(Ser/Thr) consensus sites (Fig. 5*C*, *underlined* and *bold*), has been reported previously as a genuine *N*-linked glycoprotein that can be cleaved off by PNGase F, and its mobility shift compared with PNGase F-untreated control suggested that the three consensus sites are likely occupied by *N*-glycans (19). We demonstrate here that the NYT sequon within the NYTSEALR peptide (*boxed* in TgGAP50 protein sequence in Fig. 5*C*) bears alternatively $Man_8(GlcNAc)_2$ and $Man_7(GlcNAc)_2$. The glycoprotein TgGAP50 represents a genuine pellicle component involved in the parasite's motile apparatus. However, the implication of *N*-glycosylation, not only in gliding motility but also in the biogenesis of the parasite's late secretory organelles, was further investigated in greater detail using both cell biology and pharmacological approaches.

The N-Glycosylation Inhibitor Tunicamycin Blocks T. gondii Growth within Mammalian Cells—The *N*-glycosylation inhibitor tunicamycin displayed an unexpected and intriguing mode of action on the intracellular tachyzoites of *T. gondii*. When parasite numbers were determined by a quantitative assay using the exogenous reporter enzyme β-galactosidase expressed by stable tachyzoites harboring the *lacZ* gene, we were surprised that 5 μg/ml or higher concentration of tunicamycin showed no significant inhibitory effect on the intracellular growth of *T. gondii* tachyzoites during the first round of drug treatment (Fig. 6*A*, *1st Cycle*). Instead the tunicamycin-treated tachyzoites displayed a normal replication rate until infected host cells were lysed at 48 h postinfection like the control tachyzoites treated with DMSO alone (Fig. 6*A*, *1st Cycle*). In sharp contrast, when the first round of treated tachyzoites were used to infect new host cells in the presence or absence of tunicamycin, only a 25–30% growth rate relative to untreated tachyzoites was observed, suggesting that parasites were now significantly altered in division rate during the second cycle of infection (Fig. 6*A*, *2nd Cycle*). A more drastic effect, up to 90% growth rate inhibition, was observed during the third cycle of host infection (Fig. 6*A*, *3rd Cycle*). As mentioned, the presence of tunicamycin was not required to

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

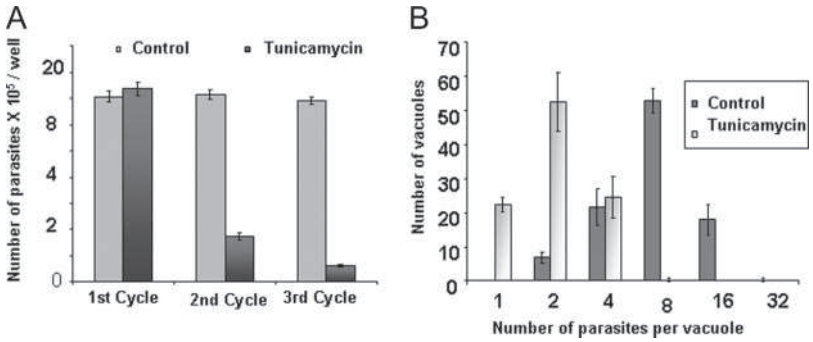


FIG. 6. **Inhibitory effect of tunicamycin on *T. gondii* growth.** *A*, the delayed effect of tunicamycin on *T. gondii* tachyzoites growth quantified using stable β-galactosidase-expressing 76K strain parasites. Four wells of 24-well plates containing HFF cells infected by tachyzoites were treated with 5 μg/ml tunicamycin or with DMSO alone. After 2 days of infection, one-fifth of each well of the first cycle treated or untreated parasites was used to infect new wells under tunicamycin or DMSO treatment. The remaining parasites of this first cycle experiment were recovered, washed with PBS, and frozen. After the second cycle of treatment, one-fifth of each well was used again to infect new monolayer HFF cells for the third cycle experiment. All parasite pellets were lysed and tested for β-galactosidase activity. Three independent experiments were performed, and data are expressed as mean ± S.D. *B*, comparison of the growth rate of tunicamycin-treated and untreated tachyzoites. Tachyzoites treated with tunicamycin or with DMSO alone during the first cycle of infection as described were loaded onto new monolayer of HFF cells and grown for 24 h in the absence of drug. The percent distribution of vacuole size (number of parasites per vacuole) was counted for 100 vacuoles in three independent experiments, and data are expressed as mean ± S.D.

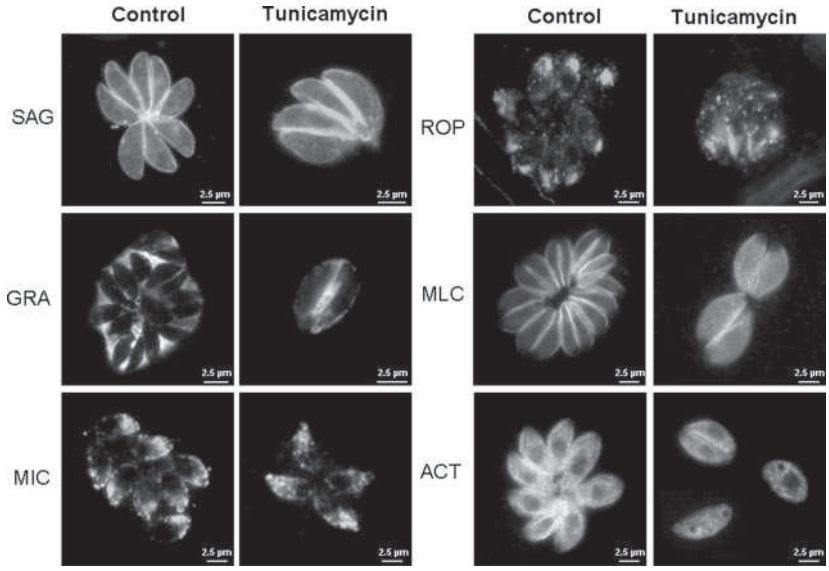


FIG. 7. **Tunicamycin alters the morphogenesis of *T. gondii* organelles.** Tachyzoites treated with tunicamycin or with DMSO alone for 48 h during the first cycle of infection were released and loaded on new monolayer HFF cells and grown for 24 h without drug. The morphology of different organelles verified by markers such as the monoclonal antibody anti-surface protein SAG1, anti-dense granule protein GRA1, anti-MIC1, anti-rhoptries ROP2/3/4, anti-MLC, and anti-actin (*ACT*) were compared between tunicamycin-treated and the control DMSO-treated *T. gondii* tachyzoites. Note the pronounced effect of tunicamycin on the morphogenesis of inner membrane complex.

obtain the significant effect on intracellular growth of the parasites during the second and third cycles. Because *T. gondii* divides by a unique binary division and because the number of parasites per vacuole reflects division rates, we examined the intracellular growth of tachyzoites after the first round of tunicamycin treatment. As can be seen in Fig. 6*B*, tachyzoites treated once with tunicamycin displayed a slower multiplication rate in their newly infected host cells. The control tachyzoites treated during the first cycle of infection with DMSO multiplied at normal rates, and 4–16 parasites/vacuole were obtained at 24 h postinfection (Fig. 6*B*). By comparison, first round tunicamycin-treated tachyzoites that received no further treatment during the second round of new host cell infection still grew more slowly. Values of one and four parasites/vacuole at 24 h post-infection were scored (Fig. 6*B*). This reduced multiplication rate that led to 1–4 parasites/vacuole in tunicamycin-treated tachyzoites *versus* untreated controls (8–16 parasites/vacuole) was also confirmed by direct visualization using immunofluorescence assays and different monoclonal antibodies (Fig. 7).

Tunicamycin Alters Biogenesis of Late Secretory Organelles and the Inner Membrane Complex—To determine whether tunicamycin could alter the morphogenesis of different secretory organelles and other subcellular compartments of *T. gondii*, tachyzoites, drug-treated for 48 h, were used to infect new monolayer HFF cells and grown for 24 h without drug. The morphology of different organelles was checked and compared with the control tachyzoites treated with DMSO and

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

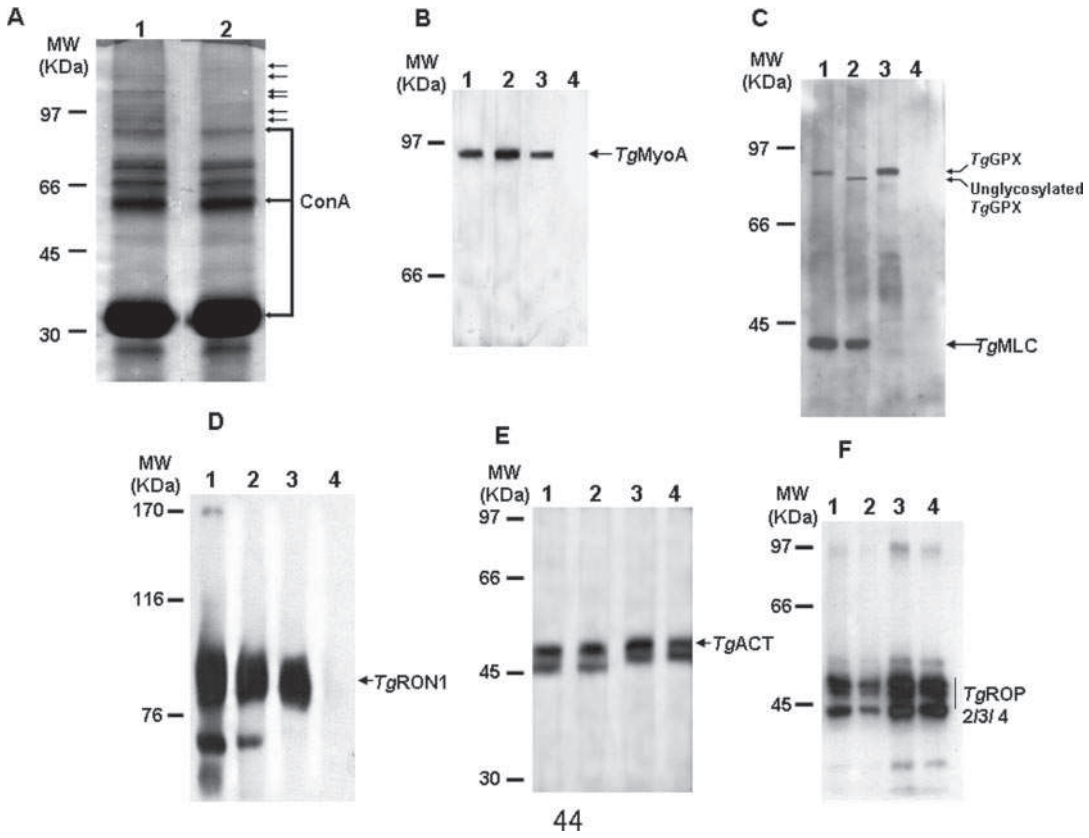


FIG. 8. **Effect of tunicamycin on ConA binding and identification of novel *N*-glycoproteins of *T. gondii.*** *A*, total detergent extract from the same number of tunicamycin-treated or untreated control (DMSO only) tachyzoites was incubated with ConA beads. After elution, the samples were analyzed by SDS-PAGE (7.5% polyacrylamide gel) followed by Coomassie Blue staining. The absence of glycoprotein binding to ConA is indicated by *arrows*. *B–F*, further verification of the tunicamycin effect on ConA binding by TgMyoA (*B*), TgMLC (*C*), TgRON1 (*D*), actin (*TgACT*; *E*), and TgROP2/3/4 (*F*) using lectin purification followed by Western blots. *Lane 1*, total detergent extract from the control tachyzoites; *lane 2*, total detergent extract from tunicamycin-treated tachyzoites; *lane 3*, presence of the parasite protein from the control tachyzoites detected in the ConA-binding material; *lane 4*, absence or presence of parasite protein from the material eluted from ConA beads when a lysate of tunicamycin-treated tachyzoites was used. Note the identification of a novel *N*-glycoprotein (*TgGPX*) that cross-reacted to anti-TgMLC antibodies. This TgGPX displayed an electrophoretic shift when the total lysate was prepared from tunicamycin-treated tachyzoites (*C*, *lane 3*) and could not bind to ConA (*C*, *lane 4*) confirming that TgGPX is *N*-glycosylated. The nature of this novel *N*-glycoprotein remains to be determined.

processed under the same experimental conditions. The plasma membrane appeared not to be affected in tunicamycin-treated tachyzoites (Fig. 7, *SAG panel*). Neither the constitutive secretion of dense granules within the vacuole nor the morphology of micronemes was affected in tunicamycin-treated tachyzoites (Fig. 7, *GRA* and *MIC panels*). In addition, the fluorescence pattern of rhoptries was not significantly changed after tunicamycin treatment (Fig. 7, *ROP panel*). In contrast, the classical fluorescence pattern of the inner membrane complex could not be visualized, suggesting that the morphogenesis of this compartment had been altered (Fig. 7, *MLC panel*). A more diffuse cytoplasmic staining was detected with anti-myosin, and the inner membrane complex that is known to be labeled by this myosin marker could not be distinguished (Fig. 7, *MLC panel*). Some treated tachyzoites also showed a few unknown structures when anti-actin was tested (Fig. 7, *ACT panel*). Collectively these data indicate that tunicamycin induces important alterations in the biogenesis of *T. gondii* inner membrane complex, suggesting that the function of the parasite's motile apparatus or glideosome that is located in this compartment may be impaired.

Inhibition of T. gondii N-Glycosylation by Tunicamycin—At the molecular level, we also demonstrated that binding of *T. gondii* glycoproteins to ConA was affected when protein extracts were derived from tunicamycin-treated tachyzoites prior to lectin affinity purification. As shown in Fig. 8*A*, several *N*-glycosylated proteins ranging from 45 to >100 kDa that specifically bound to ConA, as reported in Fig. 4*A*, were no longer detected (see Fig. 8*A*, *small arrows*). Western blots in Fig. 8*B* further validated the absence of TgMyoA from the tunicamycin-treated material eluted from ConA (*lane 4*). The polyclonal antibodies specific to myosin light chain (MLC) cross-reacted with a novel *T. gondii* glycoprotein of 85 kDa that displayed a difference in electrophoretic mobility be-

Molecular & Cellular Proteomics
Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

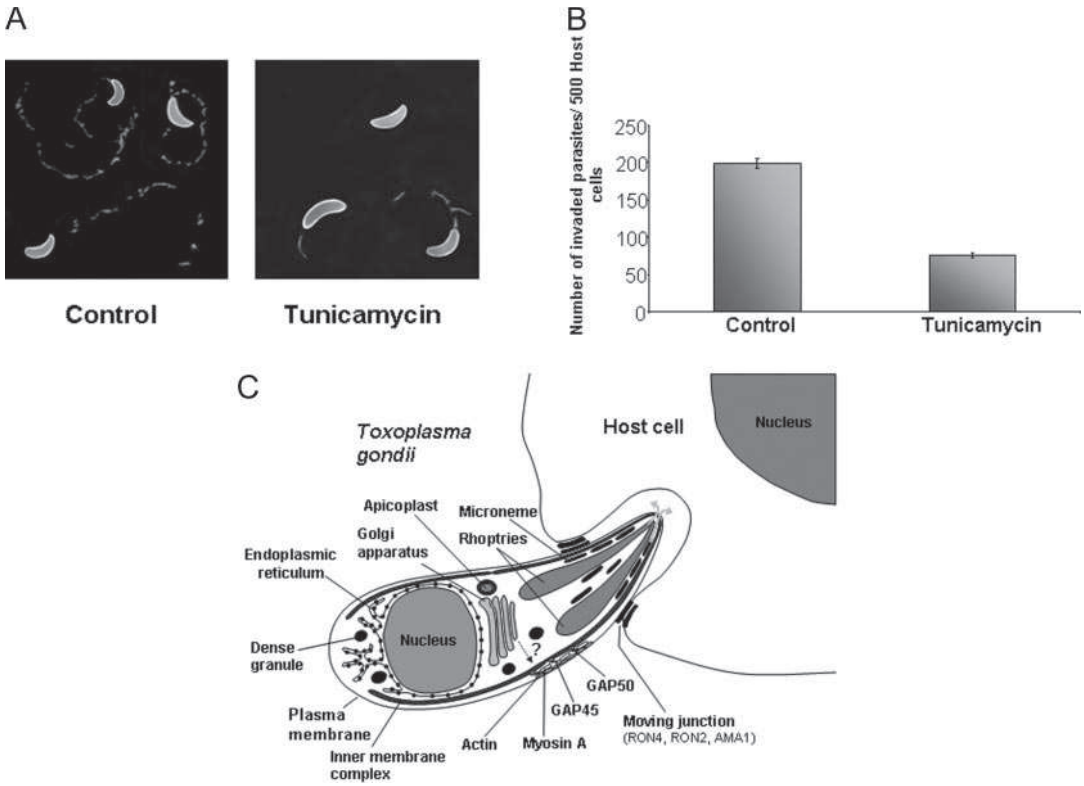


FIG. 9. **Effect of tunicamycin on *T. gondii* gliding motility and host cell invasion.** *A*, effect of tunicamycin on gliding motility of *T. gondii*. Tachyzoites treated with tunicamycin or with DMSO alone (*Control*) for 48 h during the first cycle of infection were released and allowed to glide on serum-coated slides. Trails were visualized by staining with anti-SAG1 antibodies followed by a fluorescent secondary antibody. *B*, effect of tunicamycin on host cell entry. The tunicamycin-treated and untreated tachyzoites during the first cycle of infection described above were also used to infect new monolayer HFF cells and grown for 24 h. The intracellular tachyzoites were paraformaldehyde-fixed and stained with anti-SAG1 or anti-GRA1 antibodies. 500 vacuoles were counted, and three different experiments were performed. The data are expressed as mean ± S.D. *C*, schematic drawing illustrating the host cell entry by *T. gondii*, the basic elements (ER, Golgi apparatus, and plasma membrane), and parasite-specific organelles (dense granules, micronemes, rhoptries, and apicoplast). The current accepted model of host cell entry or invasion proposes contributions from both the glideosome and the moving junction. The glideosome is composed of TgMyoA, actin filaments, and membrane anchor myosin XIV or GAP50 and GAP45, which are located between the plasma membrane and the inner membrane complex, whereas the moving junction contains rhoptry proteins that are secreted during host cell entry. These moving junction proteins include RON2, RON4, and the microneme AMA1. In light of the observations related in this study, we describe that several components of both glideosome and moving junction are potentially *N*-glycosylated or contain a number of consensus sites suggesting them to be *N*-glycosylated. We believe that this post-translational modification may be required for their proper intracellular transport to the pellicle and for protein-protein interactions.

tween tunicamycin-treated and untreated tachyzoites, respectively (Fig. 8*C*, *lanes 1* and *2*). As expected, when deglycosylated the 85-kDa protein was unable to bind ConA (*lane 4*). The precise nature of this novel 85-kDa glycoprotein remains to be determined. In addition, we demonstrated that the rhoptry neck protein RON1 was not capable of binding ConA when tunicamycin-treated (*lane 4*) compared with untreated lysate (*lane 3*). Because of the lower amount of rhoptry neck protein 2 detected by Western blots combined with our identification of only one peptide isolated by proteomics approaches, it was not surprising that we were unable to validate the *N*-glycosylated status of RON2 using total extract of tunicamycin-treated extracts (data not shown). In contrast, we were able to show that actin (Fig. 8*E*), ROP2/3/4 (Fig. 8*F*), and probably other cytoplasmic proteins can bind to ConA despite tunicamycin treatment, suggesting that these abundant proteins interact nonspecifically with the lectin. Nevertheless our proteomics data together with the direct evidence of the *N*-glycan structures $Man_7(GlcNAc)_2$ and $Man_8(GlcNAc)_2$ at position Asn^{136} of the peptide NYTSEALR of GAP50 and the lack of ConA binding by TgMyoA after tunicamycin treatment also suggest that several crucial proteins involved in the parasite's motility and host-parasite interactions are likely *N*-glycosylated.

Tunicamycin Blocks T. gondii Motility and Host Cell Invasion—To investigate the physiological role of *N*-glycosylation in the parasite's motility, we monitored the gliding of drug-treated and untreated tachyzoites using immunofluorescence staining to detect the trails left on slides by motile parasites (Fig. 9*A*). When intracellular tachyzoites were treated with 5 μg/ml tunicamycin for 40 h and purified, the freshly released and tunicamycin-treated tachyzoites were unable to display parasite-specific gliding as no characteristic trail motility was

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

visualized for individual parasites stuck to serum-coated glass (Fig. 9*A*, *Tunicamycin panel*). Only a few tachyzoites treated by tunicamycin showed smaller and aborted trails, whereas the untreated tachyzoites (incubated with DMSO only) that were analyzed under the same experimental conditions were entirely motile as demonstrated by the prominent trail length for each individual tachyzoite (Fig. 9*A*, *Control panel*). These data on the inhibition of *N*-glycosylation of components involved in parasite's gliding motility are consistent with tunicamycin treatment affecting the host cell invasion by *T. gondii.*

To establish whether tunicamycin was blocking the attachment or invasion of host cells, we monitored host cell reinfection after the first cycle of intracellular parasite treatment. To do this, we examined and quantified the number of parasites attached to or invading host cells. Invasion was scored during a 1-h pulse infection followed by 24 h of intracellular growth. Fig. 9*B* shows an approximately 70% decrease in tachyzoite numbers within host cells, suggesting that tunicamycin treatment impaired host cell invasion.

DISCUSSION

In this study, we have provided new evidence that *T. gondii* contains numerous *N*-glycosylated proteins that unexpectedly are components of the glideosome, moving junction, and other glycoproteins involved in host cell-parasite interactions. The cell wall or pellicle of apicomplexan parasites like *T. gondii* consists of the plasma membrane and the closely associated, flattened cisternae of the inner membrane complex. Both actin and myosin A homologues have been localized to the space between the plasma membrane and the inner membrane, and this glideosome is a key player in motility and host cell entry by *T. gondii* (see schematic model in Fig. 9*C*). Another essential element represents the moving junction, a structure built at the interface between the host cell and the parasite during its active entry into any kind of mammalian cell. The moving junction is a circumferential zone that forms at the apical tip of the parasite, moves backward, and pinches the vacuole from the host cell membrane (34, 36). Several components of the moving junction are secreted from late secretory organelles such as rhoptries (RON2) and micronemes (AMA1) (depicted in Fig. 9*C*). It is clear that the results presented here identified *N*-linked glycosylation on several key constituents involved in host-parasite interactions. The major *Toxoplasma N*-linked glycans released from total detergent extract proteins by PNGase F are oligomannosidic ($Man_{5-8}(GlcNAc)_2$) and paucimannosidic structures ($Man_{3-4}(GlcNAc)_2$), sugars that are rarely present on mature *N*-glycoproteins of higher eukaryotes. The three major *N*-glycans linked to proteins correspond to $Man_6(GlcNAc)_2$, $Man_7(GlcNAc)_2$, and $Man_8(GlcNAc)_2$, respectively. In addition, four other minor oligosaccharides, $Man_3(GlcNAc)_2$, $Man_4(GlcNAc)_2$, $Man_5(GlcNAc)_2$, and an extremely limited amount of $Man_9(GlcNAc)_2$, were also found. It has been shown that other eukaryotes can transfer structures other than the largest lipid-linked oligosaccharide precursor, Dol-PP-$Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ (12–14, 20). Thus, we postulate that the paucimannosidic *N*-linked glycan structures found on *T. gondii* glycoproteins could point to the transfer of $Man_5(GlcNAc)_2$ and its subsequent glucosylation as reported previously in *Trypanosoma brucei* (14). The genes encoding numerous endoplasmic reticulum-located glycosyltransferases, named *ALG* (asparagine-linked glycosylation), required for the biosynthesis of the lipid (dolichylpyrophosphate)-linked glycosyl donors and oligosaccharyltransferases needed for the *N*-glycan transfer to proteins, can be readily identified in the *T. gondii* genome (ToxoDB) using detailed bioinformatics and gene predictions.[3] All of these genes involved in both synthesis of lipid precursor and transfer of *N*-glycan structures are transcribed in *T. gondii* tachyzoites and bradyzoites.[4] In contrast, our biochemical analyses failed to detect sialylated, galactosyl, or fucosylated structures consistent with either the likely absence or the limited presence of complex glycan types containing sialic acid, galactose, and fucose residues in *T. gondii*. This also indicates that a part of the endoplasmic reticulum and Golgi trimming and maturation pathways that are highly conserved in other eukaryotes is absent in the parasite. However, only structures of major *N*-glycans were determined when the total detergent glycoprotein extracts were analyzed. We therefore cannot rule out the presence of other minor modifications and branching monosaccharides that escaped detection in this study.

We identified a number of known proteins that have not been suspected until now to be *N*-glycosylated. Conversely *N*-glycosylation is considered as a rare post-translational modification in apicomplexan parasites because most investigations have focused attention on surface and other antigens that are important for host cell-parasite interactions and future vaccine development. Our data confirmed that the key glideosome membrane anchor myosin XIV (also named GAP50), known to be involved in both parasite motility and host cell entry, contains *N*-glycosylated structures. From the mixed glycopeptide populations, we were fortunate to identify the trypsin-generated peptide NYTSRALR of the membrane anchor myosin XIV (GAP50) that is truly modified by two *N*-glycan structures at the same position, Asn^{136}. We report for the first time in *T. gondii* the fine *N*-glycan structures that are present on the GAP50 sequon NYT that is alternatively modified by $Man_8(GlcNAc)_2$ or $Man_7(GlcNAc)_2$. However, it was somewhat unexpected to find that TgMyoA, another component of the glideosome, was also capable of specifically binding to ConA. We have shown that TgMyoA failed to bind to ConA when the parasites were treated with the *N*-glycosylation poison tunicamycin. Neither the N-terminal signal peptide nor a transmembrane domain is present in TgMyoA.

[3] F. Dzierszinski, D. Ross, and S. Tomavo, unpublished data.
[4] S. Fauquenoy and S. Tomavo, unpublished data.

Molecular & Cellular Proteomics

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

These data therefore suggest that an *N*-glycosylated binding partner might bring TgMyoA into interaction with ConA. As stated, no obvious domains of TgMyoA presently explain how it might be translocated across the ER membrane to the lumen where the addition of *N*-glycans is expected to occur co-translationally (10). However, almost nothing is known about ER translocation machinery in *T. gondii*, and previous work on *Saccharomyces cerevisiae* has described that carboxypeptidase Y and an acid phosphatase can be translocated to the ER, enter the secretory pathway, and be *N*-glycosylated without having their N-terminal signal sequences (44, 45). In addition, it has been shown that cytoplasmic and nuclear proteins are *N*-glycosylated, suggesting the existence of post-translational *N*-glycosylation mechanisms in higher eukaryotes (46, 47). It remains to be determined whether such a non-conventional *N*-glycosylated biosynthetic pathway operates in *T. gondii*. To our knowledge, almost nothing has been reported on *N*-glycosylation of myosins and components involved in the motile apparatus in other eukaryotic cells. Gliding is a unique form of apicomplexan parasite motility that manifests as either circular spirals or a series of helical turns revolving around the long axis of the body of the parasite (30–32). It has been suggested previously that the soluble protoglideosome and membrane-associated TgGAP50 are transported separately and are assembled into the glideosome in the inner membrane complex of mature parasites (19). The *N*-linked glycosylation of glideosome components such as GAP50 suggests that this post-translational modification may be involved in their intracellular trafficking mechanisms or in their transport to the parasite's space where the glideosome are assembled. It is also interesting to note that two key components of the moving junction (RON2 and AMA1) required for host cell invasion (Fig. 9*C*) are also present in material purified by ConA. These moving junction proteins also contain putative *N*-glycosylation sites. In addition, we showed that another rhoptry neck protein, RON1, with presently unknown function may be *N*-glycosylated. It should be mentioned that RON1 displayed the strongest fluorescence that co-localized with the ConA signal, and its deglycosylation by tunicamycin prevented lectin binding. However, we cannot rule out that RON1 may indirectly bind to ConA via other *N*-glycan-bearing RONs. We were not able to confirm that RON2 and AMA1 are *N*-glycosylated using Western blots because of the limited amount of protein detected after lectin purification. Their glycopeptides modified by *N*-glycan structures were also not identified using MALDI-MS/MS analyses because only a few peptides (only one peptide from RON2) from these proteins were obtained. Further biochemical analyses including purification of higher amounts of RON2 and AMA1 by affinity purification with their respective specific antibodies followed by direct determination of *N*-glycan structures using mass spectrometry are required. Many other proteins have been isolated by ConA affinity purification and identified by proteomics analyses. Among these are also proteins that do not have any predicted *N*-glycosylation sites (supplemental data), suggesting that these proteins may interact with other genuine *N*-glycosylated proteins. This may be the case for MIC1 (supplemental data) that has been reported previously as a parasite lectin (48) that might be retained on ConA by interacting with *N*-glycan structures carried by other *N*-glycoproteins that specifically bind to ConA. Even if some proteins without *N*-glycosylated sites (supplemental data) may behave like MIC1, we cannot exclude that these components may also interact with ConA nonspecifically as further demonstrated during this study for actin and other rhoptry proteins such as ROP2/3/4.

It is intriguing that unlike all other eukaryotic cells, *T. gondii* tachyzoites treated with tunicamycin at conventional inhibitory concentrations did not display any obvious growth defect within its host cells during its first cycle of intracellular development that lasts 48 h. The growth defect appeared only during the second cycle of reinvasion of host cells with a very prominent effect during the third cycle. The effect of tunicamycin took place in the absence of drug during the second and third cycle of host cell infection, suggesting that this delayed effect, or unusual kinetics of tunicamycin on *T. gondii*, may reflect drastic differences in host cell re-entry by tunicamycin-treated relative to untreated tachyzoites. This conclusion is supported by the results that demonstrate the ability of tunicamycin to affect gliding motility of tachyzoites released after intracellular drug treatment. We cannot exclude that host cell attachment may also be affected by tunicamycin treatment. However, the lack of *N*-glycosylation of several SAGs and most MICs reported by lectin purification and proteomics analyses indicates that any interference of host cell attachment by tunicamycin may be marginal. Therefore, we suspect that it is the parasite's motility and new host cell invasion that are likely impaired in tunicamycin-treated tachyzoites. It remains to be determined whether moving junction formation is also inhibited by tunicamycin and absence of *N*-glycosylation. However, the delayed effect on intracellular replication of tunicamycin-treated parasites that have entered new host cells is highly reminiscent of the delayed death phenomenon seen with apicoplast inhibitors (49). It appears that ConA fluorescence co-localizes with the signal of apicoplast-specific monoclonal antibodies. Because it has been described that some apicoplast proteins transit through the ER (29, 50), it is likely that this plastid-like organelle may also contain *N*-glycosylated proteins and that the delayed effects seen with tunicamycin might be partially attributable to inhibition of apicoplast functions.

In summary, the current study illuminates a diverse repertoire of *N*-glycosylated proteins that contribute to parasite survival and pathogenesis during mammalian host cell infection. Novel parasite-specific *N*-glycoproteins identified here can significantly expand the number of potential targets for therapeutic intervention. We anticipate that ongoing in-depth exploration of biological functions of the identified *N*-linked

Molecular & Cellular Proteomics

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

glycans carried by components involved in gliding motility, moving junction, protein secretion, and protein-protein interaction would further unravel the invasive and pathogenic mechanisms developed by *T. gondii* and other apicomplexan parasites during infection.

Acknowledgments—We thank Drs. Dominique Soldati, Maryse Lebrun, Jean-François Dubremetz, Peter Bradley, and John Boothroyd for generous gifts of antibodies and Drs. Steven Ball and Gordon Langsley for a critical review of the manuscript. We acknowledge the *Toxoplasma* Genome Sequencing Consortium for making available the genome database. Preliminary genomic and/or cDNA sequence data were accessible via ToxoDB. The mass spectrometry facility used at the University of Lille was funded by the European Community (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the CNRS, and the Université des Sciences et Technologies de Lille.

* This work was supported by the CNRS and INSERM. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at http://www.mcponline.org) contains supplemental material.

‖ To whom correspondence should be addressed: Equipe de Parasitologie Moléculaire, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR 8576, Bâtiment C9, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: 33-3-20-43-69-41; Fax: 33-3-20-33-65-55; E-mail: Stan.Tomavo@univ-lille1.fr.

REFERENCES

1. Kim, K., and Weiss, L. M. (2004) Toxoplasma gondii: the model apicomplexan. *Int. J. Parasitol.* **34,** 423–432
2. Dubey, J. P. (1994) Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **205,** 1593–1598
3. Dubey, J. P. (1998) Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii. Int. J. Parasitol.* **28,** 1019–1024
4. Luft, B. J., Hafner, R., Korzun, A. H., Leport, C., Antoniskis, D., Bosler, E. M., Bourland, D. D., Uttamchandani, R., Fuhrer, J., Jacobson, J., Morlat, P., Vilde, J.-L., and Remington, J. S. (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
5. Dobrowolski, J. M., Carruthers, V. B., and Sibley, L. D. (1997) Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii. Mol. Microbiol.* **26,** 163–173
6. Carruthers, V., and Boothroyd, J. C. (2006) Pulling together: integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **10,** 83–89
7. Carruthers, V., and Sibley, L. D. (1997) Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* **73,** 114–123
8. Jewett, T. J., and Sibley, L. D. (2003) Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol. Cell* **11,** 885–894
9. Soldati, D., and Meissner, M. (2004) Toxoplasma as a novel system for motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16,** 32–40
10. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54,** 631–664
11. Aebi, M., and Hennet, T. (2001) Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol.* **11,** 136–141
12. Turco, S. J., and Pickard, J. L. (1982) Altered G-protein glycosylation in vesicular stomatitis virus-infected glucose-deprived baby hamster kidney cells. *J. Biol. Chem.* **257,** 8674–8679
13. Parodi, A. J. (1993) N-Glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology* **3,** 193–199
14. Jones, D. C., Mehlert, A., Güther, L. S., and Ferguson, M. A. J. (2005) Deletion of the glucosidase II gene in *Trypanosoma brucei* reveals novel N-glycosylation mechanisms in the biosynthesis of variant surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **280,** 35929–35942
15. Handman, E., Goding, J. W., and Remington, J. S. (1980) Detection and characterization of membrane of *Toxoplasma gondii. J. Immunol.* **124,** 2578–2583
16. de Carvalho, L., Souto-Padron, T., and de Souza, W. (1991) Localization of lectin-binding sites and sugar-binding proteins in tachyzoites of *Toxoplasma gondii. J. Parasitol.* **77,** 156–161
17. Odenthal-Schnittler, M., Tomavo, S., Becker, D., Dubremetz, J.-F., and Schwarz, R. T. (1993) Evidence for N-linked glycosylation in *Toxoplasma gondii. Biochem. J.* **291,** 713–721
18. Shans-Eldin, H., Blaschke, T., Anhlan, D., Niehus, S., Müller, J., Azzouz, N., and Schwarz, R. T. (2005) High-level expression of the *Toxoplasma gondii* STT3 gene is required for suppression of the yeast STT3 gene mutation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **143,** 6–11
19. Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., and Beckers, C. (2004) Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii. J. Cell Biol.* **165,** 383–393
20. Samuelson, J., Banerjee, S., Magnelli, P., Cui, J., Kelleher, D. J., Gilmore, R., and Robbins, P. W. (2005) The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 1548–1553
21. Dzierszinski, F., Popescu, O., Toursel, C., Slomianny, C., Yahiaoui, B., and Tomavo, S. (1999) The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. Implications for evolutionary origin of apicomplexans. *J. Biol. Chem.* **274,** 24888–24895
22. Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Dendouga, N., Popescu, O., and Tomavo, S. (2001) Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii. J. Mol. Biol.* **309,** 1017–1027
23. Seeber, F., and Boothroyd, J. C. (1996) *Escherichia coli* β-galactosidase as an *in vitro* and *in vivo* reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii. Gene* (*Amst.*) **169,** 39–45
24. Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **131,** 209–217
25. Carr, S., Aebersold, R., Baldwin, M., Burlingame, A., Clauser, K., and Nesvizhskii, A. (2004) The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data. Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data. *Mol. Cell. Proteomics* **3,** 531–533
26. Bradshaw, R. A. (2005) Revised draft guidelines for proteomic data publication. *Mol. Cell. Proteomics* **4,** 1223–1225
27. Wilkins, M. R., Appel, R. D., Van Eyk, J. E., Chung, M. C., Gorg, A., Hecker, M., Huber, L. A., Langen, H., Link, A. J., Paik, Y. K., Patterson, S. D., Pennington, S. R., Rabilloud, T., Simpson, R. J., Weiss, W., and Dunn, M. J. (2006) Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics* **6,** 4–8
28. Coppin, A., Varré, J.-S., Lienard, L., Dauvillée, D., Guérardel, Y., Soyer-Gobillard, M.-O., Buléon, A., Ball S., and Tomavo, S. (2005) Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *J. Mol. Evol.* **60,** 257–267
29. Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S., and McFadden, G. I. (1998) Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 12352–12357
30. Meissner, M., Schluter, D., and Soldati, D. (2002) Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* **298,** 837–840
31. Dobrowolski, J. M., and Sibley, L. D. (1996) *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* **84,** 933–939
32. Keeley, A., and Soldati, D. (2004) The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.* **14,** 528–532
33. Sibley, L. D. (2004) Intracellular parasite invasion strategies. *Science* **304,** 248–253
34. Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., and Boothroyd, J. C. (2005) Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma*

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

gondii: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* **1,** e17
35. 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., and 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
36. Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P. J., Vial, H., and Dubremetz, J.-F. (2005) The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell. Microbiol.* **7,** 1823–1833
37. El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu B., Galeotti, N., Fourmeaux, 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
38. El Hajj, H., Lebrun, M., Fourmaux, M. N., Vial, H., and Dubremetz, J.-F. (2007) Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. *Cell. Microbiol.* **9,** 54–64
39. Saeij, J. P., Boyle, J. P., Coller, S., Taylor, S., Sibley, L. D., Brooke-Powell, E. T., Ajioka, J. W., and Boothroyd, J. C. (2006) Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* **314,** 1780–1783
40. Delbac, F., Sänger, A., Neuhaus, E., Stratmann, R., Ajioka, W. J., Toursel, C., Herm-Götz, A., Tomavo, S., Soldati, T., and Soldati, D. (2001) Toxoplasma gondii myosins B/C: one gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. *J. Cell Biol.* **155,** 613–623
41. Morrissette, N. S., Murray, J. M., and Roos, D. S. (1997) Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* **110,** 35–42
42. Kadota, K., Ishino, T., Matsuyama, T., Chinzei, Y., and Yuda, M. (2004) Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 16310–16315
43. Nielsen, M. S., Madsen, P., Christensen, E. I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R., and Peterson, C. M. (2001) The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* **20,** 2180–2190
44. Blachy-Dyson, E., and Stevens, T. H. (1987) Yeast carboxypeptidase Y can be translocated and glycosylated without its amino-terminal signal sequence. *J. Cell Biol.* **104,** 1183–1191
45. Silve, S., Monod, M., Hinnen, A., and Haguenauer-Tsapis, R. (1987) The yeast acid phosphatase can enter the secretory pathway without its N-terminal signal sequence. *Mol. Cell. Biol.* **7,** 3306–3314
46. Tsai, B., Ye, Y., and Rapoport, T. A. (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3,** 246–255
47. Kane, R., Murtagh, J., Finlay, D., Marti, A., Jaggi, R., Blatchford, D., Wilde, C., and Martin, F. (2002) Transcription factor NFIC undergoes *N*-glycosylation during early mammary gland involution. *J. Biol. Chem.* **277,** 25893–25903
48. Lourenço, E. V., Pereira, S. R., Faça, V. M., Coelho-Castelo, A. A., Mineo, J. R., Roque-Barreira, M. C., Greene, L. J., and Panunto-Castelo, A. (2001) Toxoplasma gondii: micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology* **11,** 541–547
49. Fichera, M. E., and Roos, D. S. (1997) A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* **390,** 407–409
50. Parsons, M., Karnataki, A., Feagin, J. E., and DeRocher, A. (2007) Protein trafficking to the apicoplast: deciphering the apicomplexan solution to secondary endosymbiosis. *Eukaryot. Cell* **6,** 1081–1088
51. Robinson, S., Routledge, A., and Thomas-Oates, J. (2005) Characterization and proposed origin of mass spectrometric ions observed 30 Th above the ionised molecules of per-*O*-methylated carbohydrates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19,** 3681–3688

Molecular & Cellular Proteomics

Downloaded from www.mcponline.org at CNRS on June 8, 2008

Elucidation des fonctions biologiques des *N*-glycannes de TgGAP50 et TgAMA1 chez *Toxoplasma gondii*

Au cours de la seconde partie de ma thèse, nous avons décidé de caractériser les structures et les fonctions des *N*-glycannes de deux des *N*-glycoprotéines identifiés durant la première partie de nos travaux, TgGAP50 et TgAMA1.

I. Implications des *N*-glycannes de TgGAP50 dans sa localisation subcellulaire

Dans une étude précédente sur TgGAP50 (Luk *et al*., 2007), les auteurs ont émis l'hypothèse que cette *N*-glycoprotéine possèderait trois *N*-glycannes. Nos analyses bioinformatiques ont permis de déterminer la position des trois sites putatifs de *N*-glycosylation de TgGAP50, asparagine 101, 136 et 228, respectivement. Nous avons tout d'abord cloné l'ORF sauvage de *TgGAP50* dans un plasmide pMAH14, dans lequel le promoteur hétérologue *GRA1* a été remplacé par le promoteur putatif du gène *TgGAP50*. Des parasites transfectés transitoirement par ce vecteur plasmidique localise correctement TgGAP50 dans le complexe membranaire interne et comme attendu le signal de protéine ectopique TgGAP50-HAFLAG colocalise avec l'anticorps αIMC1, un marqueur du réseau membranaire sous-pelliculaire, apposé à la face cytoplasmique du complexe membranaire interne (Article n°2, figure 1A, page 148). Ce résultat démontre que la protéine ectopique TgGAP50-HAFLAG exprimée par le vecteur se comporte de manière identique que TgGAP50 endogène et elle peut donc servir pour étudier les structures et fonctions des *N*-glycannes. Par mutagenèse dirigée, nous avons donc remplacé chacune des asparagines 101, 136 et 228, par des alanines. Plusieurs constructions plasmidiques ont été réalisées, dans lesquelles chaque asparagine a été remplacée individuellement (TgGAP50 N_101-A, TgGAP50 N_136-A, TgGAP50 N_228-A) et une dernière dans laquelle les trois asparagines ont été remplacées par des alanines (TgGAP50 N_101_136_228-AAA). Nous avons observé que le remplacement des Asn 101 et 136 par des Ala, supprimant la possibilité d'un ajout de *N*-glycannes sur ces deux sites conduit à l'absence complète des TgGAP50 déglycosylées dans le complexe membranaire interne (Article n°2, figure 4F et 4J, page 151). En revanche, l'abolition de la *N*-glycosylation du troisième Asn 228 n'entraîne aucune conséquence (Article n°2, figure 4N, page 151), au contraire TgGAP50 déglycosylée est présente dans le complexe membranaire interne comme TgGAP50 sauvage démontrant que les deux premiers sites Asn 101 et 136 sont essentiels pour la localisation correcte de TgGAP50 dans le complexe membranaire interne. En effet, sans l'un ou l'autre de ces deux *N*-glycannes en position 101 et 136, TgGAP50 est délocalisée dans le cytoplasme du parasite avec un signal fluorescent plus fort autour du noyau. De même, l'absence

totale de *N-g*lycannes (triple mutant) sur TgGAP50 exogène conduit également à un signal cytoplasmique diffus de la protéine (Article n°2, figure 4R, page 151).

La présence du signal fluorescent de deux TgGAP50 mutants déglycosylés autour du noyau et dans le cytoplasme suggère une rétention plus forte de ces protéines déglycosylées par rapport aux protéines sauvages portant les trois *N*-glycannes dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans l'appareil de Golgi. Afin de tester cette hypothèse, nous avons transfecté et exprimé les différents plasmides dans les souches de tachyzoïtes HDEL-RFP, un marqueur du réticulum endoplasmique parasitaire et GRASP-RFP, un marqueur du cis-Golgi et médian-Golgi, qui expriment de manière stable ces deux marqueurs fusionnés avec la « red fluorescent protein ou RFP ». Nous avons observé une colocalisation d'une partie du signal des TgGAP50 transgéniques déglycosylées avec les marqueurs du RE et de l'appareil de Golgi pour les versions mutées de TgGAP50 N_101-A (Article n°2, figure 5F, page 151 et figure 6F, page 152) et TgGAP50 N_136-AAA (Article n°2, figure 5J, page 151 et figure 6J, page 152). L'absence de colocalisation de ces deux versions mutées TgGAP50 N_101-A (Article n°2, figure 7A.F, page 153) et TgGAP50 N_136-A (Article n°2, figure 7A.J, page 153) avec un anticorps anti-GRA3, marqueur des granules denses, ne nous a pas permis de déterminer la nature exacte des signaux fluorescents ponctuels qui sont présents dans le cytoplasme. Ces résultats nous ont permis de déterminer que le *N*-glycanne porté par l'asparagine 228 ne semble apparemment pas jouer un rôle évident ou déterminant dans la localisation de TgGAP50 alors que les deux premiers sites de *N*-glycosylation sont très importants dans le trafic et le transport de TgGAP50 jusqu'à sa destination finale, le complexe membranaire interne où elle doit s'associer avec ses partenaires pour former un glideosome fonctionnel.

Des parasites transféctés de manière transitoire exprimant des versions doubles mutées de TgGAP50 ont été observés en immunofluorescence. Les résultats obtenus démontrent que l'absence des deux *N*-glycannes portés par les Asn 101 et 136 d'un côté (Article n°2, figure S2, page 160), et les Asn 136 et 228 (Article n°2, figure S3, page 161) sur TgGA50 conduit également à une délocalisation totale de la protéine et à une rétention dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. De manière intéressante, nous avons observé que TgGAP50 N_101_228-AA n'est pas retenu dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Article n°2, figure S4, page 161).

Nos résultats attribuent pour la première fois chez *T. gondii,* une fonction précise pour des *N*-glycannes portés par une protéine parasitaire. Afin de vérifier que ces fonctions dans le trafic intracellulaire découvert pour ces *N*-glycannes sont valables pour une autre *N*-glycoprotéine qui est localisée dans un autre compartiment subcellulaire, les micronèmes, nous avons décidé de caractériser l'implication des *N*-glycannes de TgAMA1.

II. Implications des *N*-glycannes de TgAMA1 dans sa localisation subcellulaire

Aucune étude préalable n'a rapporté la *N*-glycosylation sur TgAMA1. Nous avions identifié cette *N*-glycoprotéine putative par chromatographie d'affinité avec la lectine ConA comme décrit dans la première partie de la thèse (Article n°1, tableau 2, page 899 à 902). Nous avons donc tout d'abord vérifié par Western blots, la présence de *N*-glycannes sur TgAMA1 en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre cette protéine. Les échantillons testés proviennent de lysats de parasites traités ou non traités par la tunicamycine, les endoglycosidases PNGase F et endo H. L'endo H coupe les *N*-glycannes dont la structure minimale est $Man_3GlcNAc_2$ avec une anomérie particulière (Man-α(1-3)-Man-α(1-6)-Man-β(1-4)-GlcNAc-β(1-4)-GlcNAc-Asn). La différence de migration électrophorétique observée entre les lysats témoins (Article n°2, figure S5A, piste 1 et 6, page 162) et les lysats de parasites traités par la tunicamycine (Article n°2, figure S5A, piste 7, page 162), ou les lysats parasitaires traités par la PNGaseF (Article n°2, figure S5A, piste 3, page 162) démontre la présence de *N*-glycannes sur TgAMA1 sans résidus de fucose sur le GlcNAc lié à l'asparagine. L'absence de différence de migration entre le lysat témoin et le lysat parasitaire traité par l'endo H (Article n°2, figure S5A, piste 5, page 162) détermine que le ou les *N*-glycannes de TgAMA1 sont résistants à cette enzyme, ce qui indique que la structure *N*-glycannique minimale, parfaitement susceptible à la PNGase F et à la tunicamycine, est possède probablement des monosaccharides terminaux qui empêchent la coupure ou digestion par l'endo H.

Ayant déterminé que TgAMA1 est également *N*-glycosylée comme TgGAP50, nous avons cherché à établir si comme TgGAP50, les *N*-glycannes seraient également déterminant pour la localisation et le transport de TgAMA1 vers les micronèmes de *T .gondii*. Des analyses bioinformatiques en utilisant le logiciel NetNGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) ont également montré que TgAMA1 possède un site putatif de *N*-glycosylation sur l'asparagine 86, et un second site potentiel sur l'asparagine 421. Cependant, l'asparagine 421 est immédiatement suivie par une proline, ce qui ne correspond pas au site consensus valide chez les Eucaryotes, -Asn-X-Ser/Thr- où X ne doit pas être une proline. En dépit de ces aspects nous avons remplacé par mutagenèse dirigée, les deux asparagines par des alanines comme décrit ci-dessus pour TgGAP50. La transfection transitoire et l'expression des plasmides codant respectivement la protéine TgAMA1-HAFLAG sauvage, TgAMA1-HAFLAG muté sur le premier site, TgAMA1-HAFLAG mutée sur le second site et TgAMA1-HAFLAG mutée sur les deux sites simultanément sont suivies par immunofluorescence indirecte en utilisant l'anticorps monoclonal αHA.11. Nos résultats ont montré que contrairement aux mutations dans TgGAP50 entraînant une délocalisation de la protéine déglycosylée, aucun effet sur la localisation de TgAMA1 dans les micronèmes n'est observé (Article n°2, figure S5B, page 162). Bien qu'il nous a semblé que le signal fluorescent de TgAMA1 doublement

mutée est plus fort dans le réticulum endoplasmique et probablement dans les vésicules post-golgiennes, correspondant aux pré-micronèmes, par rapport aux protéines sauvages et celles ayant une simple mutation, ces résultats montrent clairement que les fonctions des *N*-glycannes ne sont pas cruciales pour le trafic et l'adressage de TgAMA1 dans les micronèmes. C'est pour cette raison que nous n'avons pas poursuivi les travaux sur TgAMA1, tout en gardant à l'esprit que les *N*-glycannes pourraient avoir des fonctions possibles en aval, au moment de la sécrétion de la protéine et de l'interaction avec ses partenaires de la jonction mobile. Ces aspects n'ont pas été abordés parce que nous avons foclaisé nos travaux sur les N-glycannes de TgGAP50.

III. Effet de la surexpression des différentes versions glycosylées de TgGAP50 chez *T. gondii* exprimant les protéines de manière stable ou transitoire

Un de nos objectifs est également de caractériser la structure oligosaccharidique des *N*-glycannes de TgGAP50 et leurs fonctions dans les interactions entre les différents partenaires du glideosome et dans leur assemblage. C'est pour cela que nous avons décidé d'utiliser le promoteur hétérologue fort, *GRA1*, du plasmide pMAH14, afin de pouvoir produire des quantités importantes de protéines natives TgGAP50 dans *T. gondii*. Par des transfections transitoires, nous avons tout d'abord vérifié la localisation correcte de la protéine TgGAP50 exogène surexprimée dans le complexe membranaire interne en utilisant le promoteur *GRA1* (Article n°2, figure 7B.B, page 153). Nous avons ensuite obtenu par deux sélections à la phléomycine, des clones parasitaires sur-exprimant de manière stable et exogène la version sauvage de TgGAP50, possédant une étiquette HA-FLAG au niveau du domaine carboxy terminal (figure 30B, page 111).

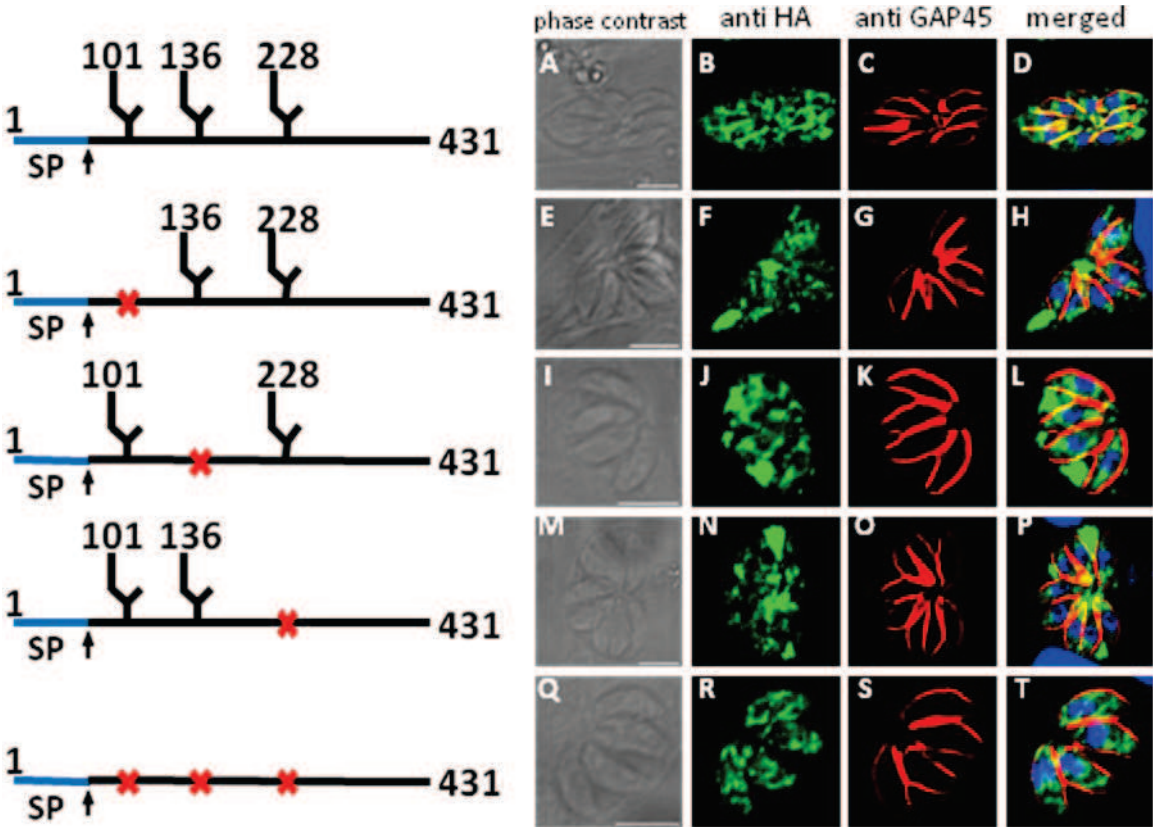


Figure 30 : Parasites stables exprimant les différentes versions de TgGAP50. A à D, TgGAP50 wt ; **E à H**, TgGAP50 N_101-A ; **I à L**, TgGAP50 N_136-A ; **M à P**, TgGAP50 N_228-A ; **Q à T**, TgGAP50 N_101_136_228-AAA. Les barres d'échelles sont de 5µm.

Afin de déterminer si la surexpression des versions mutées de TgGAP50 est possible de manière transitoire et stable chez le parasite en utilisant le promoteur *GRA1*, les mêmes expériences ont été menées avec les plasmides pMAH14 permettant de sur-exprimer TgGAP50 N_101-A (Article n°2, figure 7B.F, page 153), TgGAP50 N_136-AAA (Article n°2, figure 7B.J, page 153), TgGAP50 N_228-A (Article n°2, figure 7B.N, page 153) et TgGAP50 N_101_136_228-AAA (Article n°2, figure 7B.R, page 153), portant une étiquette HA-FLAG. L'expression transitoire des versions mutées TgGAP50 N_101-A, TgGAP50 N_136-A et TgGAP50 N_101_136_228-AAA démontre également l'absence de ces TgGAP50 déglycosylées de le complexe membranaire interne. La version mutée TgGAP50 N_228-A est correctement localisée dans le complexe membranaire interne. De plus, un signal additionnel dans la vacuole parasitophore, colocalisant avec la protéine TgGRA3, a été observé dans les parasites exprimant de manière transitoire les versions mutées TgGAP50 N_101-A, TgGAP50 N_136-A et TgGAP50 N_228-A. Toutefois, le signal dans la vacuole parasitophore pour les TgGAP50 partiellement déglycosylées n'est pas observé pour les parasites transgéniques exprimant la version triple mutée TgGAP50 N_101_136_228-AAA correspondant à une protéine totalement déglycosylée.

Des clones parasitaires sur-exprimant de manière stables les versions mutés TgGAP50 N_101-A (figure 30F, page 111), TgGAP50 N_136-A (figure 30J, page 111), TgGAP50 N_228-A (figure 30N, page 111) et TgGAP50 N_101_136_228-AAA (figure 30R, page 111) ont été obtenus, ce qui nous a permis de caractériser ces N-glycoprotéines mutantes et sauvages en utilisant des approches biochimiques. Nous avons confirmé par microscopie électronique l'absence de TgGAP50 déglycosylé sur l'Asn 101 dans le complexe membranaire interne des cellules filles lors de l'endodyogénie (Article n°2, figure 8B, page 154). De plus, nous avons observé la sécrétion d'un granule dense contenant TgGAP50 N_101-A, dans la vacuole parasitophore (Article n°2, figure 8A, page 154). TgGAP50 N_101-A dans la vacuole parasitophore est associé au réseau membranaire formé par les protéines de granules denses (Article n°2, figure 8C, page 154).

IV. Caractérisation biochimique des *N*-glycannes portés par TgGAP50

Afin de vérifier que TgGAP50 possède effectivement un *N*-glycanne sur chacun des trois sites putatifs de *N*-glycosylation prédits, nous avons analysé par Western blots, la différence de migration électrophorétique entre les différentes versions sauvage (TgGAP50wt), simples mutés (TgGAP50 N_101-A, TgGAP50 N_136-A et TgGAP50 N_228-AAA) et triple muté (TgGAP50 N_101_136_228-AAA). Une différence d'environ 2 kDa est observée entre la version sauvage et les versions simples mutées de TgGAP50, et d'environ 6 kDa entre la version sauvage et la version triple mutée (Article n°2, figure 9, page 155). Il est à noter que l'on peut observer des bandes protéiques supplémentaires correspondant à une dégradation plus accrue des protéines TgGAP50 mutées sur les asparagines 101 ou 136.

Des lysats parasitaires exprimant de manière stable les différentes versions sauvage et mutées de TgGAP50 ont été traités par l'endoglycosidase PNGaseF. Nous avons observé après ces traitements, que toutes les protéines TgGAP50 sauvage ou mutées partiellement déglycosylées par génétique inverse sont maintenant complètement déglycosylées par traitement endoglycosidasique (PNGase F), ce qui conduit à une même mobilité électrophorétique en conditions dénaturantes comme le triple mutant complètement déglycosylé (Article n°2, figure 9B, page 155). Ces résultats suggèrent fortement que TgGAP50 possède un *N*-glycanne sur chacune des trois asparagines 101, 136 et 228.

V. Implications des *N*-glycannes de TgGAP50 dans les interactions avec les partenaires du glidéosome

Du fait de la délocalisation dans le cytoplasme des versions mutées TgGAP50 N_101-A, TgGAP50 N_136-A et TgGAP50 N_101_136_228-AAA, nous nous sommes interrogés sur les

interactions de ces protéines mutés avec les composants du glidéosome. Des lysats de parasites exprimant de manière stable les différentes versions sauvage ou mutées de TgGAP50 ont été soumis à une chromatographie d'affinité sur des billes couplées à un anticorps αFLAG de souris. Ces parasites ont été lysés en conditions douces, comme décrit précédemment (Johnson *et al*., 2007). Les éluats sont analysés par Western blots en révélant par différents anticorps dirigés spécifiquement contre TgGAP45, TgMLC1 et TgMyoA. Nous avons observé que TgGAP45 est immunoprécipité avec TgGAP50, en quantité approximativement identique, quelque soit la version sauvage ou mutées de la protéine (Article n°2, figure 9G, page 155). Le signal observé aux alentours de 120 kDa correspondant au complexe du glidéosome, ceci a été déterminé par les expériences de protéomique qui ont identifiées les protéines TgGAP45, TgGAP40, TgMLC1, TgMyoA et TgActine dans ces bandes de haut poids moléculaire (Article n°2, figure 1B, page 148). Cependant, l'intensité du signal observé aux alentours de 120 kDa est plus faible pour les versions mutées TgGAP50 N_101-AAA, TgGAP50 N_136-A voire absente pour la version TgGAP50 N_101_136_228-AAA. En revanche, lorsque des lysats de parasites traités par un agent pontant, permettant de maintenir les interactions entre les protéines proches les unes des autres, sont soumis à une immunoprécipitation αFLAG, le signal correspondant à TgGAP45 a très nettement diminué, suggérant que l'absence de *N*-glycannes conduit à l'absence de co-immunoprécitation de TgGAP45 par TgGAP50 déglycosylée (Article n°2, figure 9F, page 155). La protéine TgMLC1 est également immunoprécipitée par TgGAP50 quelque soit la version sauvage ou mutées de la protéine (Article n°2, figure 9D, page 155) mais toutefois dans des proportions plus faibles avec les TgGAP50 déglycosylées sur les deux premiers sites de *N*-glycosylation ou par le triple mutant. En ce qui concerne TgMyoA, la protéine est immunoprécipitée par TgGAP50wt, de même que par TgGAP50 N_228-A (Article n°2, figure 9C, page 155), en revanche, très peu voire pas de protéine TgMyoA sont immunoprécipitées par les versions de TgGAP50 mutés sur le premier ou le deuxième site de *N*-glycosylation, de même que par la version triple muté (Article n°2, figure 9C, page 155).

VI. Effets différentiels de la tunicamycine sur les parasites sur-exprimant TgGAP50 sauvage et le triple mutant TgGAP50 N_101_136_228-AAA

TgGAP50 est impliquée dans la motilité parasitaire et dans l'invasion. Nous avons comparé les effets de la tunicamycine sur deux des parasites transgéniques, le sur-exprimant TgGAP50wt et le triple mutant TgGAP50 N_101_136_228-AAA, avec la souche parentale RH. Des parasites exprimant de manière stable la version sauvage TgGAP50wt et la version mutée TgGAP50 N_101_136_228-AAA, ont été traité 48 H par la tunicamycine et une partie des parasites fraichement sortis des cellules HFFs sont ensuite déposés sur des lamelles de verre afin de suivre leurs motilités ou « gliding ». Alors

que les trois types de parasites présentent une motilité normale en l'absence de tunicamycine (Article n°2, figure 10A, C et E, page 156), un prétraitement de 48h avec 10µg/mL de tunicamycine entraîne une diminution considérable de la motilité des parasites de la souche RH et triples mutées (Article n°2, figure 10B, F et G, page 156) alors que les parasites transgéniques sur-exprimant TgGAP50-HAFLAG *N*-glycosylées montrent une mobilité plus grande que ces deux premiers parasites transgéniques (Article n°2, figure 10D et G, page 156).

De plus, les parasites sur-exprimant TgGAP50 *N*-glycosylée présentent une capacité d'invasion des cellules hôtes et de réplication intracellulaire plus importantes que les parasites de la souche parentale RH et les triple mutants (Article n°2, figure 10H, page 156 et figure 11A et B, page 157). Ces résultats montrent que la surexpression de TgGAP50 conduit à une résistance substantielle à la tunicamycine.

VII. Détermination de la structure des *N*-glycannes de TgGAP50

Afin de déterminer la structure de chacun des *N*-glycannes de TgGAP50, une très grande quantité de parasites exprimant de manière stable la version sauvage TgGAP50wt ont été produite. Les parasites ont été lysés et soumis à une chromatographie d'affinité αFLAG. Les éluats sont ensuite concentrés et déposés en grand gel d'acrylamide. Le gel est coloré au bleu de Coomassie et la bande correspondant à TgGAP50wt HA-FLAG est découpée. La suite des résultats a été réalisée en collaboration avec Agnès Hovasse et le Docteur Christine Schaeffer (Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Université de Strasbourg UMR 7178 du CNRS, Directeur : Alain Van Dorsselaer) et le Docteur Willy Morelle (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université de Lille 1 UMR 8576 du CNRS, Directeur : Jean-Claude Michalski). L'analyse de la structure et la composition des *N*-glycannes déterminées par MALDI-TOF MS nous ont permis d'identifier des structures oligosaccharidiques de type $Hex_6HexNAc_2$ à $Hex_8HexNAc_2$ (Article n°2, figure2D, page 149). Après digestion des *N*-glycannes par l'α-mannosidase, des structures de type $Hex_{2-3}HexNAc_2$ sont mise en évidence (Article n°2, figure 2B et C, page 149). Le pic correspondant à la structure type $Hex_6HexNAc_2$ a diminué en intensité alors que ceux correspondant aux structures types $Hex_7HexNAc_2$ et $Hex_8HexNAc_2$ sont retrouvés avec la même intensité, démontrant la présence de structures oligomannosidiques tronquées de type $Man_6GlcNAc_2$ et de structures oligosaccharidiques tronquées de type $Hex_{6-8}GlcNAc_2$ contenant du mannose et du glucose, sur la protéine mature TgGAP50wt HA-FLAG. Une faible proportion de structures oligomannosidiques de type $Man_{7-8}GlcNAc_2$ a également été identifiée.

La position de chaque *N*-glycanne sur la protéine sauvage TgGAP50wt HA-FLAG a été déterminée (Article n°2, figure 3, page 150). Les protéines contenues dans les fragments de gels sont

réduites et alkylées et ensuite digérés par la trypsine ou la chymotrypsine. Les échantillons sont analysés en nanoLC-MS/MS et les spectres de masse ont permis de déterminer que :

- l'asparagine 101 porte des structures oligosaccharidiques de type $Hex_6HexNAc_2$ à $Hex_8HexNAc_2$
- l'asparagine 136 porte des structures oligosaccharidiques de type $Hex_5HexNAc_2$ à $Hex_7HexNAc_2$
- l'asparagine 228 porte des structures oligosaccharidiques de type $Hex_6HexNAc_2$ et $Hex_7HexNAc_2$

Nous avons conclu que TgGAP50 possède trois *N*-glycannes de type riche en mannose avec pour certains d'entre eux probablement des résidus de glucose en position terminale. Il existe également au sein de ces *N*-glycannes une hétérogénéité entre les sites de *N*-glycosylation ainsi que dans la composition des *N*-glycannes au sein du même site de *N*-glycosylation.

VIII. Identification des partenaires de TgGAP50 sauvage et déglycosylée

L'identification des partenaires de TgGAP50-HA-FLAG sauvage a été réalisée par spectrométrie de masse (nanoLC-MS/MS). Les spectres de masse obtenus ont été comparés à deux bases de données, MASCOT et OMSSA (Open Mass Spectrometry Search Algorithm) et de nombreuses protéines connues et inconnues ont été identifiées (Article n°2, tableau 1, page 158). Parmi ces protéines, nous avons identifié les composants du glidéosome (TgGAP45, TgMLC1 et TgMyoA), l'actine et des enzymes de la glycolyse, ainsi que des protéines intervenant dans le trafic intracellulaire. Un certain nombre de protéines inconnues ont également été obtenues, certaines possèdent des sites putatifs de *N*-glycosylation et d'autres non, de même certaines possèdent des segments transmembranaires putatifs (Article n°2, tableau S2, page 165). La récente mise à disposition des profils d'expression des ARNm de *T. gondii* nous a permis de déterminer que seulement certaines protéines hypothétiques suivent le profil d'expression de TgGAP50 (Article n°2, figure S1, page 160).

En comparant les protéines identifiées par spectrométrie de masse après immunoprécipitation par TgGAP50 sauvage d'un côté et par TgGAP50 N_101_136_228-AAA de l'autre, nous avons déterminé que certaines d'entre elles sont absentes dans l'immunoprécipitation par TgGAP50 N_101_136_228-AAA, notamment TgGAP45 (Article n°2, tableau 2, page 159). Ces immunoprécipitations comparatives ont été réalisées en incubant les colonnes anti-FLAG avec une concentration en sel plus importante que lors des premières immunoprécipitations avec les lysats de parasites sur-exprimant TgGAP50wt-HAFLAG. Nous nous sommes apperçus que toutes les protéines de la voie de la glycolyse ainsi que la calmoduline, ne sont alors plus retrouvées. De même de très nombreuses protéines inconnues ne sont plus immunoprécipitées (Article n°2, tableau 2, page 159).

ARTICLE 2

Fauquenoy, S., Hovasse, A., Morelle, W., Tchilabalo-Alayi, E., Slomianny, C., Schaeffer, C., Van Dorsselear, A., and Tomavo, S. *N*-glycosylation is essential for trafficking of *Toxoplasma gondii* GAP50 to the inner complex membrane and binding to key gliding factors.

N-glycosylation is essential for trafficking *Toxoplasma gondii* GAP50 to the inner membrane complex and for binding to key gliding factors

Sylvain Fauquenoy[#], Agnès Hovasse[§], Willy Morelle[&], Elie Tchilabalo-Alayi[§], Christian Slomianny[@], Christine Schaeffer[§], Alain Van Dorsselaer[§], and Stanislas Tomavo[#,*]

[#]Center for Infection and Immunity of Lille, CNRS UMR 8204, INSERM U 1019, Institut Pasteur de Lille, Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

[§]Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bioorganique, IPHC, CNRS UMR7178, 67087 Strasbourg, France

[&]Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, CNRS UMR 8576, IFR 147, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

[@]Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U 1003, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

[*]Corresponding author: Stan.Tomavo@pasteur-lille.fr

Running title: Crucial roles of *Toxoplasma N*-glycans

ABSTRACT

Toxoplasma gondii motility, which is essential for host cell entry, migration through host tissues and invasion, is a unique form of actin-dependent gliding. It is powered by a motor complex mainly composed of myosin heavy chain A (MyoA), myosin light chain 1 (MLC1), gliding associated proteins GAP45 and GAP50, the only integral membrane anchor so far described. In the present study, we show that all three potential *N*-glycosylated sites of GAP50 are occupied by unusual *N*-glycan structures that are rarely found on mature mammalian glycoproteins. Using site-directed mutagenesis, we demonstrate that *N*-glycosylation is a prerequisite for GAP50 transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus and for its subsequent delivery into the inner complex membrane. Assembly of key partners into the gliding complex, and parasite motility are severely impaired in the unglycosylated GAP50 mutants. Furthermore, comparative affinity purification using *N*-glycosylated and unglycosylated GAP50 as bait identified novel hypothetical proteins including the recently described gliding associated protein GAP40, suggesting that more components are likely involved in glideosome formation and regulation than initially thought. Collectively, these results provide the first molecular description of *T. gondii N*-glycosylation functions that are vital for parasite motility and host cell entry.

INTRODUCTION

Apicomplexans are protozoan intracellular parasites which cause many life threatening diseases of humans and animals including malaria (*Plasmodium* spp.), chicken coccidiosis (*Eimeria* spp.), lymphoproliferative diseases of cattle (*Theleria* spp.), as well as some of the opportunistic infections associated with AIDS patients (*Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii*). Among apicomplexan parasites, *T. gondii* is uniquely adapted to infect a wide range of hosts, including virtually all warm blooded animals. Like all other apicomplexan parasites, the ability of *T. gondii* to invade host cells is critical for its survival and its ability to egress from host cells is equally essential to ensure its survival and proliferation through host tissues. Therefore, the apicomplexan parasites require motility to migrate through distinct invertebrates and/or vertebrate hosts and internationalize themselves within targeted host cells. Yet, these parasites lack the classical means of motility such as flagellum, cilia, pseudopodia and lamellipodia. Instead, they move by a unique form of actin-based locomotion called gliding motility, which is characterized by circular, forward twisting and rolling movements (Sibley *et al*., 1998; Hakanson *et al*., 1999).

Gliding motility requires apical organelles such as micronemes for efficient release of micronemal adhesine proteins (MIC2) onto the parasite surface for directional attachment (Huynh and Carruthers, 2006). The cytoplasmic tail of extracellular *T. gondii* adhesin MIC2 is linked internally to an anchor, the glycolytic enzyme aldolase, which in turn mediates association with actin filaments underlying the plasma membrane (Jewett and Sibley, 2003, also depicted in Figure 11C). Ultimately, the unique mechanism of parasite gliding motility is dependent on the interaction of actin filaments and the type XIV myosin (TgMyoA) located between the plasma membrane and its underlying outer flattened membrane cisternae, called the inner membrane complex (IMC) (Figure 11C). The motor essential for gliding motility in apicomplexan parasites is composed of a tetrameric complex encompassing MyoA, a myosin tail interacting protein also called myosin light chain 1 (MLC1), (Dobrowolski and Sibley, 1996; Meissner *et al*., 2002; Opitz and Soldati, 2002) and the two glideosome-associated proteins GAP45 and GAP50, which are anchored to the outer IMC membrane (Keeley and Soldati, 2004; Gaskins *et al.*, 2004). GAP50 is firmly immobilized in the IMC and considered to act as a fixed anchor for the motor complex (Johnson *et al*., 2007). To power the forward movement of apicomplexan parasites, myosin pulls the actin filaments and their attached adhesins rearward. This requires the GAP-myosin complex to be anchored to the IMC and the underlying cytoskeleton (Gaskins *et al.*, 2004; Johnson *et al*., 2007; Bullen *et al*., 2009), in addition to energy and diverse regulatory events. Most importantly, the gliding machinery (including MyoA, MLC1, GAP45 and GAP50) appears to be highly and exclusively conserved across Apicomplexa species (Baum *et al*., 2006). Therefore, the elucidation of molecular mechanisms controlling gliding motility and, ultimately the invasion of and egress from host cells could be valuable for the development of new therapeutic strategies against these major human and animal pathogens. A recent study focusing on TgMLC1 demonstrated that the mechanical activity of Class XIV myosins (TgMyoA) can be modulated by a small-molecule inhibitor of myosin motor activity, which interferes with the post-translational modifications of its associated light chains (Heaslip *et al*., 2009). The regulation of gliding motility can also be controlled at additional stages, including actin polymerization (Wetzel *et al*., 2003) and calcium-mediated secretion of adhesins (Wetzel *et al*., 2004). The final assembly of the gliding motor is controlled by phosphorylation of pre-assembled TgGAP45-MyoA-MLC1 complex (Gilk *et al*., 2009). In addition, the gliding associating protein GAP45 is modified by acylation, whereas GAP50 is an integral membrane protein of the IMC. Both GAP45 and GAP50 were proposed to anchor MyoA to the IMC (Gaskins *et al*., 2004). The pre-complex MyoA-MLC1-GAP45 is anchored to the IMC through association with GAP50 and GAP45, whose acylation by both myristoylation and palmitoylation appears as potentially important translational modifications (Rees-Channer *et al*., 2006). *T. gondii* is also capable of mobilizing its main source of energy by differential sub-localization of glycolytic enzymes, which are located between the plasma membrane and IMC, instead of being

normally present in the parasite cytoplasm (Pomel *et al*., 2008). This novel location of glycolytic enzymes, which remain pellicle-associated until parasites have completed host cell invasion, probably optimizes ATP delivery required for gliding motility.

Despite the importance of *N*-glycosylation of proteins, a relatively common post-translational modification of eukaryotic proteins translocated into the endoplasmic reticulum, several studies have suggested that this is a rare event in apicomplexan parasites (Samuelson *et al*., 2005; Bushkin *et al*., 2010). Indeed, the presence of *N*-glycosylation for the gliding associated protein TgGAP50, which was initially suspected by Gaskins *et al.* (2004), has only recently been demonstrated by us and others (Luk e*t al*. 2007; Fauquenoy *et al.* 2008). Beyond a very limited number of *N*-glycoproteins discovered in the parasite, the precise functions of *N*-glycans are still unknown in *T. gondii*. Here, we present evidence that the unusual *N*-glycan structures on the TgGAP50 protein are crucial for its trafficking through ER/Golgi apparatus to a final loading into the IMC, and for its subsequent interactions with other key gliding partners. Our study provides insight into how *N*-glycosylation regulates the trafficking of GAP50 and its association to other members of the actin-myosin motor complex and also demonstrates that *N*-glycosylation is essential for parasite motility and host cell entry.

RESULTS

Ectopic expression of the integral membrane anchor GAP50 of the *T. gondii* gliding motor

We and others have previously shown that GAP50, the membrane anchor for the gliding motor complex in *T. gondii*, contains potential *N*-linked oligosaccharides (Gaskins *et al*., 2004, Luk *et al*., 2007, Fauquenoy *et al*., 2008). We have previously investigated the *N*-glycosylation status of *T. gondii* by exploring the presence of *N*-glycosylated peptides isolated from trypsin-digested total detergent extract proteins followed by extensive glycomic and proteomic analyses. During this study, we identified one *N*-glycopeptide of GAP50, which carries immature oligomannosidic glycans (Fauquenoy *et al*., 2008). To gain more insight into protein *N*-glycosylation functions in *T. gondii*, we decided to determine the fine structures of *N*-glycan chains of all three potential *N*-glycosylation sites: Asn residues at position 101, 136 and 228. Towards this goal, we engineered stable *T. gondii* transgenic parasites, ectopically expressing HAFLAG-tagged GAP50 protein, using both endogenous GAP50 and heterologous dense granule *GRA1* gene promoters. We chose the heterologous *GRA1* promoter because the weak expression driven by GAP50 promoter yields an insufficient amount of protein for further biochemical analyses. To ascertain if, like the wild type GAP50 protein, the ectopically expressed GAP50-HAFLAG protein (under *GRA1* promoter control) localizes in the inner membrane complex (IMC), we first investigated the localization of GAP50-HAFLAG protein using

specific anti-HA antibodies and indirect immunofluorescences visualized by confocal microscopy. This confirmed that the ectopically expressed GAP50-HAFAG protein (green) was strongly detected in the inner membrane complex, as demonstrated by staining with monoclonal antibodies specific to IMC1 (red), a major component of the sub-pellicular network that tightly apposes the cytoplasmic face of the IMC (Mann and Beckers, 2001) (Figure 1A). Although the GAP50-HAFLAG protein was somewhat present as a significant cytoplasmic signal, its association with the newly formed parasite IMC was demonstrated in early (stages 2 and 3) and later (stages 4 and 5) daughter cell IMC membranes (Figure 1A, yellow). In addition, western blots on affinity purified GAP50-HAFLAG, using total protein extract and a specific anti-FLAG column, identified all major known gliding partners, such as myosin A (MyoA), myosin-light chain (MLC1) and glideosome associated protein (GAP45). This demonstrated that the ectopic HAFLAG-GAP50 fusion protein was full-length, had been properly tagged and retained its ability to bind to gliding partners. These data were confirmed by the analysis of a large scale affinity purification of the HAFLAG-tagged GAP50 and its binding partners by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining (Figure 1B) and mass spectrometry (Table 1).

Glideosome proteins are present in both monomer forms and large stable complexes

Among proteins identified by proteomic analysis (Table 1) are all the well-known glideosome-associated proteins. These include MyoA, MLC1, GAP45, actin and two previously reported gliding regulators, actin depolymerizing factor (Wetzel *et al*., 2003) and a calmodulin domain protein (Wetzel *et al*., 2004), indicating that the ectopically expressed GAP50-HAFLAG is capable of interacting physically with other glideosome partners. Unexpectedly, we found that GAP45, MyoA, MLC1 and actin detected as monomeric bands with their respective and correct molecular masses are also present in a protein band higher than 120 kDa (Figure 1B) and the composition of this high-molecular mass component named glideosome multicomplex complex was confirmed by mass spectrometry (Table 1). These data suggested that under non-ionic detergent (Triton X-100) extraction, immunopecipitation at low-salt stringency (150 mM of NaCl) and SDS-PAGE analysis under non-reducing conditions, the five major glideosome proteins can also be detected as a large and stable complex, which migrates as molecular mass higher than 120 kDa. This unanticipated large and stable complex encompassing GAP45, GAP50, MyoA, MLC1 and actin was reproducibly identified. In addition, the numbers of peptides identified and the percentage of sequence coverage for each glideosome member in the large multi-complex are similar to those detected in each individual and monomeric GAP50, GAP45, MyoA, MLC1 and actin (Table 1). Other proteins identified were enolase, fructose-1,6-bisphosphatase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, lactate dehydrogenase and phosphofructokinase (Table 1). Although these abundant glycolytic enzymes could be nonspecific contaminants, these findings are consistent with their dual

role in both glycolysis and specific relocation from the cytoplasm to IMC prior to host cell egress, presumably to provide ATP to the actin-myosin motor (Pomel *et al*., 2008). Of the remaining proteins precipitating with GAP50-HAFLAG, are 16 hypothetical proteins with unknown functions. Among these, one hypothetical protein (TGME49_049850) corresponds to the novel, nine-spanning transmembrane protein, GAP40, which was recently described as an additional glideosome component (Frénal *et al*., 2010). Although some of these hypothetical proteins could be genuine GAP50 binding proteins, we cannot exclude the possibility that some of these proteins were nonspecific contaminants. More importantly, the proper localization of GAP50-HAFLAG in the IMC, together with its ability to bind to numerous partners, indicate that the HAFLAG tagged GAP50 has been correctly trafficked through the different sub-cellular compartments, validating this construct as a tool that can be used to decipher *T. gondii N*-glycosylated structures and functions.

The integral membrane anchor GAP50 of the *T. gondii* gliding motor contains unusual *N*-glycan structures

The nature of GAP50 *N*-glycans, excised and purified from SDS-PAGE (Fig. 1B), was determined after reduction, carboxyamidomethylation, digestion with PNGase F, purification on a non-porous graphitized carbon column followed by MALDI-TOF-MS analyses. The predominant molecular ion corresponding to $Hex_6HexNAc_2 + Na^+$ (m/z 1419) and two additional weaker ions, $Hex_7HexNAc_2 + Na^+$ (m/z 1581), and $Hex_8HexNAc_2 + Na^+$ (m/z 1743) were identified (Figure 2A). To discriminate the oligomannosylated type *N*-glycans from the glucose-containing truncated glycans, the glycans were submitted to on-plate α-mannosidase digestion followed by MALDI-TOF-MS analysis (Figure 2B). After this treatment, two new molecular ions were observed at m/z 771 ($Hex_2HexNAc_2$) and 933 ($Hex_3HexNAc_2$). The intensity of ion at m/z 1419 ($Hex_6HexNAc_2$) was reduced, which suggests the existence of an oligomannosylated type *N*-glycans with 6 mannose residues. However, a significant □-mannose resistant signal was also present (see enlarged insert in Figure 2B). These data suggest that other isomeric structures, which probably correspond to terminal glucose-containing *N*-glycans that are unaffected by α-mannosidase, are also present on GAP50. We also checked whether □-mannose digestion under our experimental conditions is optimal on a positive control using on-plate α-mannosidase digestion applied to free *N*-glycans of bovine ribonuclease B that contains well-characterized oligomannosylated *N*-glycans composed of $Hex_5HexNAc_2$, $Hex_6HexNAc_2$, $Hex_7HexNAc_2$, $Hex_8HexNAc_2$, and $Hex_9HexNAc_2$. Similarly, two major molecular ions were also observed at m/z 771 ($Hex_2HexNAc_2$) and 933 ($Hex_3HexNAc_2$) and a minor one at m/z 609 ($Hex_1HexNAc_2$) (Figure 2C). The ions at m/z 1257 ($Hex_5HexNAc_2$), 1419 ($Hex_6HexNAc_2$), 1581 ($Hex_7HexNAc_2$), 1743 ($Hex_8HexNAc_2$) and 1905 ($Hex_9HexNAc_2$) disappeared after the □-mannosidase

treatment, which demonstrates that these oligomannosylated *N*-glycans of ribonuclease B were efficiently and similarly digested by □-mannosidase as for GAP50. We therefore conclude that biochemical properties of *N*-glycans at m/z 1581 ($Hex_7HexNAc_2$) and 1743 ($Hex_8HexNAc_2$), shown to be unaffected by □-mannosidase, are consistent with the assignment of terminal glucose-containing *N*-oligomannosidic chains to these ions (Figure 2D). In agreement with this statement, no shift in electrophoretic migration was observed after SDS-PAGE and Western blotting when GAP50 was incubated with endo H, an exoglycosidase known to specifically cleave off oligomannosylated glycans from *N*-glycoproteins, confirming the occupancy of GAP50 *N*-glycans by terminal glucose or other sugars (Luk *et al*. 2007). In contrast, we demonstrated that GAP50 was sensitive to PNGase F, resulting in a mobility shift. Thus, we propose that *N*-glycan structures composed of oligomannosylated type *N*-glycans ($Hex_6HexNAc_2$) and glucose-containing truncated glycans ($Hex_{6-8}HexNAc_2$) are both linked to *T. gondii* GAP50 protein even though we cannot rule out the presence of additional minor *N*-glycans with 7 mannose (m/z 1581) or 8 mannose residues (m/z 1743) (Figure 2D).

Positioning *N*-glycan structures on Asn-X-Ser/Thr sequons of *T. gondii* GAP50 and glycoform heterogeneity

In order to determine which *N*-glycan structure is precisely carried by each individual *N*-glycosylation site in the GAP50 glycoprotein, the in-gel purified protein was separately subjected to trypsin and chymotrypsin digestions. Both digests were first analyzed by LC-MS under conditions which generate glycan-specific fragment ions (m/z 204.09 from $HexNAc^+$ and m/z 366.14 from $HexHexNAc^+$) indicating the location of the glycopeptides in the chromatogram. Based on the glycopeptide fragmentation pattern, high-level confidence assignment for each glycosylated site was identified by LC-MS/MS (Figure 3, panels A-C). In the MS/MS spectrum of the doubly protonated parent ion at m/z 1150.48 (Figure 3A), the most intense fragment ion at m/z 1123.55 (1+) corresponds to peptide sequence ^{227}SNVTSRAW^{234} with one HexNAc. This interpretation is based on the previous observation indicating that often the MS/MS spectrum of doubly charged ion of a glycopeptide is dominated by a fragment ion corresponding to the peptide carrying a single HexNAc (Wuhrer *et al*., 2007). This allows the identification of peptide carrying the *N*-glycopeptide at Asn228 since only one chymotryptic peptide is expected at mass 919.46 Da. The corresponding spectrum displayed a series of single protonated ion fragments higher than molecular ion at m/z 1150.48 and a series of lower double protonated ion fragments, most of them corresponding to successive sugar neutral losses. The other fragment ions are oxonium ions which correspond to internal glycan fragmentations. Taken together, these data demonstrate the $Hex_6HexNAc_2$ structure at position Asn228 of GAP50. In

addition, MS/MS spectra of molecular ions m/z 1329.03 (2+) and m/z 1414.31 (3+) displayed intense ion fragments respectively at m/z 1156.54 (1+) and m/z 1532.26 (2+), which represent the two other *N*-glycosylated sites of the tryptic peptides ^{136}NYTSEALR^{143} and ^{77}VAANEHISFIASPGSNFLGGVSSLNDTR^{104} carrying one HexNAc on Asn136 and Asn101, respectively (Figure 3B and 3C). These MS/MS spectra also revealed the structures of the *N*-linked glycans, $Hex_8HexNAc_2$ at position Asn136 and $Hex_6HexNAc_2$ at position Asn101, respectively. It should be noted that this MS-based approach led to the identification of 8 distinct glycopeptides assigned to the 3 glycosylation sites as follows: Hex_{5-7} $HexNAc_2$ (3 *N*-glycan chains) at position Asn101, Hex_{6-8} $HexNAc_2$ (3 *N*-glycan chains) at position Asn136 and Hex_{6-7} $HexNAc_2$ (2 *N*-glycan chains) at position Asn228. We showed that there was also heterogeneity of oligosaccharides at each three *N*-glycosylation sites. A better picture of the relative abundance of the different glycoforms present on each of the 3 *N*-glycosylated sites was given by an LC-MS experiment (Figure 3D-3G). The *N*-glycan $Hex_6(HexNAc)_2$ is the most predominant sugar on Asn228 and Asn101 whereas $Hex_6(HexNAc)_2$ and $Hex_7(HexNAc)_2$ are present in equal amount on the *N*-glycosylation site Asn136. Together, these data provide insights into the structures, length, heterogeneity and topology of *N*-glycans present on each Asn-X-Ser/Thr sequon of *T. gondii* GAP50.

N*-glycosylation is required for proper targeting of GAP50 into the inner membrane complex of *T. gondii

Previous studies have reported that *N*-glycosylation inhibition using tunicamycin can affect parasite gliding (Luk *et al*., 2007; Fauquenoy *et al*., 2008). We speculated that the effect of tunicamycin on *N*-glycans of GAP50 may occur either by direct inhibition of *N*-glycosylation synthesis or through indirect and non-specific effect, as tunicamycin-treatment of mammalian cells can also result in global decrease of cellular protein synthesis (Elbein, 1981). In the light of these two possibilities, we first decided to determine whether unglycosylated GAP50 can be utilized *in vivo* for proper targeting into IMC and gliding motor assembly using reverse genetic approaches instead of biochemical assays with *N*-glycosylation inhibitors. To address this issue, *T. gondii* GAP50 mutants lacking one, two or three of the normally occupied *N*-glycosylation sites were constructed by site directed mutagenesis (replacement of Asn of the sequon to Ala) and the corresponding expression vectors, under the control of homologous GAP50 promoter, were transfected into the parasites. The localisation of mutated GAP50 proteins tagged with HAFLAG was analyzed by indirect immunofluorescence and confocal microscopy. A schematic depicting the position and number of sites mutated in GAP50 is shown on the left corner of Figure 4. As expected, wild type GAP50-HAFLAG protein expressed under the control of the same promoter and GAP45 perfectly colocalized

in the IMC (Fig. 4, A-D). The mutation of the first Asn at the position 101 in GAP50, however, revealed a confocal fluorescence signal restricted to the parasite cytoplasm with no clear co-localization with GAP45, its important partner of the glideosome located in the IMC (Figure 4, E-H). It is worth noting that despite the presence of the two other sequons that were demonstrated by glycomic approaches to be readily occupied by *N*-glycans (Figure 3), a single replacement of the first *N*-glycosylation site Asn101 by Ala prevents targeting of GAP50 into the IMC. Moreover, the single mutation of the second *N*-glycosylation site Asn136 behaves similar to the first Asn101 mutant, with the mutated GAP50 protein detected only in the parasite cytoplasm, despite the presence of the two other sites Asn101 and Asn228 occupied by *N*-glycans (Figure 4, I-L). In constrast, the mutation of the third *N*-glycosylation site Asn228 reveals no changes in the subcellular localization of mutated GAP50, perfectly colocalizing with GAP45 in the IMC (Figure 4, M-P), similarly to the wild type GAP50 (Figure 4, A-D). The mutants lacking all three *N*-glycosylated sites show behaviour similar to the single first or second Asn-x-Ser/Thr sequon with a stronger fluorescence signal surrounding the nucleus and more intra-cytoplasmic vesicles (Figure 4, Q-T). Taken together, these results strongly suggest that mutation of either first, second or all three *N*-glycosylation sites may cause the partial or complete unglycosylated GAP50 protein to remain in the perinuclear compartment defining *T. gondii* endoplasmic reticulum and Golgi apparatus.

The deglycosylation of GAP50 impaired intracellular trafficking in *T. gondii*

We next focused on the intracellular trafficking of unglycosylated GAP50 to know if the different mutated GAP50 proteins reside in specific sub-cellular compartments of *T. gondii*. Therefore, we transfected the expression vectors corresponding to wild type and each deglycosylated GAP50 protein into the transgenic parasite line, which stably expressed a marker of the endoplasmic reticulum, named HDEL, tagged to red fluorescent protein (RFP) (Nishi *et al*., 2008). The confocal images demonstrate that mutants at the first (Figure 5, E-H), second (Figure 5, I-L) and all three (Figure 5, Q-T) *N*-glycosylated sites displayed fluorescence signals (green) that colocalized with HDEL-RFP (red), suggesting that significant levels of deglycosylated GAP50 are retained in the parasite ER. In contrast, the wild type GAP50 protein (Figure 5, A-D) and the third *N*-glycan mutant (Figure 5, M-P) were mostly found in the IMC, thereby undetectable in the ER. In addition, when GAP50 protein mutants at the first (Figure 6, E-H), second (Figure 6, I-L) and all three (Figure 6, Q-T) *N*-glycosylated sites were replaced by Ala, the transgenic parasites displayed fluorescence signals (green) that also strongly colocalized with GRASP protein, a RFP-tagged Golgi marker (red), which is stably expressed in the Golgi apparatus of *T. gondii* (Pelletier *et al*., 2002). In the case of the wild type and third *N*-glycan GAP50 mutant, again the deglycosylated and wild type proteins, which are correctly transported to the IMC cannot be detected in the Golgi apparatus (Figure 6, A-D and M-P).

In addition, we also created three independent double mutants GAP50N101_N136AA (Figure S1), GAP50N136_N228AA (Figure S2) and GAP50N101_N228AA (Figure S3), which lead to simultaneous deglycosylation of GAP50 protein at two Asn sites. Consistently, these double mutations prevent the transport and insertion of their respective deglycosylated GAP50 protein into the IMC (Figure S1 to S3), as for the single deglycosylated GAP50 at N101 or N136. However, whereas GAP50N101_N136AA and GAP50N136_N228AA proteins were shown to be retained significantly in the ER and Golgi apparatus (Figure S1 and S2), GAP50N101_N228AA protein cannot be detected in the ER and Golgi. Instead, this double deglycosylated protein localized to the cytoplasm (Figure S3), suggesting that the *N*-glycan at Asn228, which was replaced by Ala in the single mutant GAP50N228_A, has no obvious effect in GAP50 targeting into IMC and may have functions beyond protein trafficking and transport through ER and Golgi apparatus. However, it appears that the two first *N*-glycosylation sites are more critical for proper trafficking of GAP50 than the third *N*-glycosylated site.

Having established that mutations of two *N*-glycosylated sites in GAP50 prevent its delivery into the IMC, we decided to investigate whether *N*-deglycosylation would systematically lead to a trafficking blockade for another *N*-glycoprotein that is localized in a different subcellular compartment from the IMC of *T. gondii*. TgAMA1, a micronemal major apical antigen, was chosen for two reasons: 1) TgAMA1 is localized in the parasite apical organelle, named the 'microneme', from where its secretion and insertion into the plasma membrane is essential for moving junction formation and for host cell invasion (Alexander *et al*., 2005; Mittal *et al*., 2005; Besteiro *et al*., 2009); and 2) TgAMA1 has also been previously identified as putative *N*-glycosylated protein by us after the lectin Con A pull-down and proteomic analyses (Fauquenoy *et al*., 2008). Because only little is known about the glycosylation status of TgAMA1 except its ability to bind to Con A, we first combined enzymatic digestions with PNGase F and endoH inhibitor treatment with tunicamycin followed by affinity pull-down with Con A to demonstrate that TgAMA1 is readily *N*-glycosylated (Figure S4, panel A) and its *N*-glycan structures are likely related to that described herein for GAP50. The presence of *N*-glycans on TgAMA1 prompted us to investigate their implications in protein trafficking by generating constructs that replaced individually or simultaneously the two potential *N*-glycosylation sites on Asn residues (N86 and N421) using the same strategy described for GAP50. Intriguingly, these mutants failed to prevent the trafficking of deglycosylated TgAMA1 proteins and their localization into the micronemes appears to be normal like the wild type protein (Figure S4, panel B). Even though, fluorescence signal of deglycosylated TgAMA1 can be faintly seen in the ER and Golgi, it is clear that the absence of *N*-glycans is not detrimental for the delivery of AMA1 into the micronemes. These results also suggest that functions of TgAMA1 *N*-glycans may occur upstream of the trafficking pathway, for instance when it is secreted and interacts with other partners of the

moving junction. The crucial functions of GAP50 *N*-glycans in protein trafficking may be specific to the transport from ER/Golgi to the IMC. However, more parasite *N*-glycoproteins need to be studied before we can firmly confirm this phenomenon. We conclude that *N*-glycosylation allows GAP50 to reach the IMC and its partial and complete deglycosylation dramatically affects intracellular trafficking, as evidenced by the retention of unglycosylated GAP50 in both the ER and Golgi apparatus. In contrast to the third *N*-glycosylation site of GAP50, we demonstrated that a single mutation of either the first or the second *N*-glycosylation site is sufficient to prevent intracellular trafficking and targeting into the parasite inner membrane complex, which correlates with its inability to reach the IMC, a sub-cellular compartment where the glideosome is assembled.

N-glycosylation of *T. gondii* GAP50 is required for trafficking through the constitutive secretory pathway

To determine whether the confocal fluorescence showing that substantial signals of partial and full deglycosylated GAP50 beyond the ER and Golgi apparatus correspond to parasite organelles in the cytoplasm, we stained the transfected parasites with antibodies specific to the dense granules. These parasite organelles are involved in the constitutive secretion of proteins into the parasitophorous vacuole in which the parasites replicate inside the infected host cell. We found that the fluorescence corresponding to anti-GRA3 antibodies (red) does not significantly colocalize with the signal of wild type and deglycosylated mutants of GAP50 protein (green) when homologous GAP50 promoter was used (Figure 7A). The partial deglycosylated and fully unglycosylated GAP50 remained in the ER-Golgi-post Golgi compartments inside the parasites (Figure 7A). In contrast, when the expression of the GAP50 mutants at N101 was driven by the heterologous GRA1 promoter, the deglycosylated GAP50 proteins strongly colocalized with GRA3 (Fig. 7B, E-H), suggesting that this mutant GAP50 protein is secreted outside the parasites into parasitophorous vacuole (PV) where tachyzoites are actively replicating within the cytoplasm of the host cells. A weaker co-localization with GRA3 was also observed for GAP50 mutant at N136 (Figure 7B, I-L). In contrast, the fully unglycosylated GAP50, derived from mutation at all three *N*-glycosylation sites, shows no significant colocalization with GRA3 (Figure 7B, Q-T). Instead, the fluorescence signal of the triple deglycosylated protein was strongly detected in the ER and Golgi. Under the same GRA1 promoter, wild type GAP50 and mutated GAP50 protein at N228 were normally detected in both IMC mature and nascent daughter IMC membranes, except for co-localization of fluorescent signals of degenerated dense granules and IMC of mother material in the residual bodies (Figure 7B, A-D and M-P). In addition, we used immuno-electron microscopy to confirm the absence of deglycosylated GAP50 protein (at N101) in the nascent IMC membranes of daughter parasites and mature IMC

(Figure 8B). Interestingly, we also fortuitously evidenced one dense granule that is newly fused to plasma membrane and is releasing GAP50 into the PV, as demonstrated with antibodies specific to HA tag and gold labeling (Figure 8A). In addition, the secreted GAP50 mutated protein at N101 is properly inserted into the intravacuolar membrane network, which is located in the space between the actively dividing tachyzoites, in a similar manner as other classical transmembrane domain containing dense granule antigens (Mercier *et al*., 2005; Rome *et al*., 2008). Because the triple mutations in GAP50N101_136_228-AAA under GRA1 promoter resulted in a fully deglycosylated GAP50 protein, which is not secreted into PV (Figure 7B, Q-T), this indicates an involvement of at least one *N*-glycan chain on GAP50 to ensure its targeting into the constitutive secretory pathway through dense granules. Taken together, our data support the notion that *N*-glycosylation is a key post-translational modification for the proper intracellular trafficking of GAP50 and the lack of *N*-glycans on GAP50 is detrimental to its correct trafficking through the parasite's secretory pathway.

N-glycosylation is critical for association of GAP50 with other components of *T. gondii* glideosome

To investigate whether the lack of *N*-glycans on GAP50 might have a direct consequence in the formation of multi-complex proteins assembled as glideosome components, stable transgenic parasites expressing GAP50 mutants and wild type proteins tagged to HAFLAG were generated. We first have checked the *N*-glycosylation status of all four stable mutant lines expressing transgenic GAP50 protein using crude protein extracts and Western blots. Figure 9A shows that all three GAP50 mutants lacking respectively the first (GAP50N_101-A), second (GAP50N_136-A) and third (GAP50N_228-A) of the normally occupied *N*-glycosylated sites shifted similarly and migrate faster than the wild type GAP50 protein (GAP50 WT). These electrophoretic mobility shifts and co-migration patterns were consistent with the molecular weight estimated at 52 kDa of the single mutated proteins lacking only one *N*-glycans since the triple GAP50 mutant (lacking all three *N*-glycans) displayed faster mobility shift with a molecular mass estimated at 45 kDa (Figure 9A) relative to the wild type protein with a molecular mass of 55 kDa. Consistent with this conclusion, all three single mutants treated with PNGase F, which removed the two remaining *N*-glycans, lead to fully deglycosylated GAP50 species that co-migrate with the genetically engineered triple GAP50 mutant (Figure 9B). Moreover, digestion of the wild type GAP50 protein with PGNase F confirmed the electropheretic mobility behavior of triple deglycosylated GAP50 mutants. Altogether, these data demonstrated that the GAP50 fusion proteins were full-length, had been tagged as predicted and, most importantly, that effective transfer of the two other *N*-glycans occurs on each single mutant protein. We also noticed that the level of the triple mutant GAP50 protein is significantly weaker

than both wild type and single GAP50 mutant proteins, as the same amounts of the control housekeeping actin were analyzed for all samples by Western blots (Figure 9A). In addition, we also observed that the two single mutants lacking the first (GAP50_N101-A) and second (GAP50N_136-A) *N*-glycosylation sites showed few degradation products with slower molecular weight bands (Figure 9A), suggesting that *N*-glycans may also be involved in the stability of GAP50 protein. This latter observation may explain why the level of triple-mutated GAP50 protein is usually weaker than that of the wild type protein. To examine the potential of partial or fully deglycosylated GAP50 proteins to interact with glideosome proteins, the stably transgenic expressing wild type and GAP50N_101-A, GAP50N_136-A, GAP50N_228-A and GAP50N_101_136_228-AAA proteins were lysed with non-ionic detergent (Triton X-100) and immunoprecipated using anti-FLAG beads. Figure 9C shows that the mutations of the first, second or all three *N*-glycosylation sites, which prevent targeting of GAP50 into the IMC, dramatically reduced the ability to co-immunoprecipate the key gliding partner, TgMyoA. A significant reduction in the level of Myosin A-associated light chain 1 (MLC1, another actin-myosin motor) pulled down by the three deglycosylated GAP50 proteins was also noticed (Figure 9D). To ensure that the wild type and mutated HAFLAG-tagged GAP50 proteins, used to co-immunoprecipitate partners, would reflect the association of glideosome components *in vivo*, living transgenic parasites were cross-linked with the reduction sensitive, cell-permeable cross-linker dithiobis succinimidyl propionate (DSP), which has a bond length of 7.7 Ängström. After cross-linking, parasites were lysed with Triton X-100 followed by immunoprecipitation using anti-FLAG column. The binding protein complexes were reduced by dithiothreitol before SDS-PAGE and Western blots confirmed that the mutations of the first, second or all three *N*-glycosylation sites prevent the ability of these mutated proteins to co-immunoprecipitate GAP45, one of its important partners involved in glideosome formation (Figure 9E). As expected, the mutation of the third *N*-glycosylated site, which has no critical effect on trafficking and IMC localization, readily immunoprecipitated GAP45 in a manner similar to the wild type GAP50 (Figure 9E, lanes GAP50WT and GAP50N_228-A). Taken together, these data are in good agreement with the two-step assembly of the glideosome: first, the transmembrane type I GAP50 protein is inserted in the nascent IMC during daughter parasite formation and, second, GAP45, TgMyoA and TgMLC are pre-formed cytoplasmic complexes, which associate to GAP50, already present in the IMC (Gaskins *et al.*, 2004). Therefore, we interpreted that the faint binding of MyoA, MLC and GAP45 to deglycosylated GAP50, which remained in the ER/Golgi, is likely due to the detergent lysis of transgenic parasites. This disrupts the ER/Golgi compartment where deglycosylated GAP50 was stuck, bringing GAP50 to the pre-formed cytoplasmic GAP45-MyoA-MLC complexes to close vicinity for binding. Thus, the single GAP50 mutant at the first and second *N*-glycosylation site and the triple GAP50 mutant protein, which result in partial

deglycosylation or unglycosylation status of GAP50 proteins, preventing proper trafficking to IMC, also implies the absence of association with the other glideosome partners.

Glideosome proteins are present in larger and more stable complexes that are disrupted by the absence of *N*-glycans on GAP50

We discovered that, in contrast to previous studies (Gaskins *et al*., 2004), a mild detergent extraction (1% Triton X-100) followed by SDS-PAGE analysis under unreduced conditions (without β-mercaptoethanol or dithiothreitol) in SDS-containing buffers was insufficient to completely dissociate all of the glideosome proteins, even after sample boiling at 100°C, suggesting that the glideosome proteins are components of large, stable complexes (Figure 9F). When wild type GAP50 and third *N*-glycan GAP50 mutant were extracted with mild detergent, followed by co-immunoprecipitation using anti-FLAG beads, Western blots probed with antibodies specific to GAP45 reveal one strong positive band of 50 kDa, corresponding to monomers of GAP45 under non-reduction conditions (Figure 9F). Another stronger high molecular weight smear (>120 kDa), probably representing GAP45 associated with other glideosome partners associated as a large macromolecular complex, was also observed (Figure 9F). It should be noticed that a strong band of 55 kDa is equally present in immunoprecipated materials derived from the wild type and deglycosylated mutants tested with the rabbit polyclonal anti-GAP45 antibodies (Figure 9F). The nature of this band, which could represent a cross-reacting protein is not presently known and was not further investigated. The detection of the upper large macromolecular complex by Western blot was confirmed by the proteomic analyses shown in Table 1. To further investigate the implications of *N*-glycosylation in forming this large macro-complex glideosome, we have compared wild type and single and triple deglycosylated GAP50 proteins in pull down assays using anti-FLAG beads. In contrast to wild type GAP50 and the GAP50N_228-A mutant, we found that the partially deglycosylated GAP50N_101-A, GAP50N_136-A and fully deglycolylated GAP50N_101_136_228-AAA mutants were not able to form strongly detectable levels of this high molecular weight smear (Figure 9F), indicating that the first and second *N*-glycan chains of GAP50 are required for the formation and stability of these high molecular weight structures, which contained most glideosome components. Under higher salt stringency (500 mM NaCl), the glideosome components were still present as both monomeric forms and large macromolecular complexes, suggesting that, in this case, the interaction between the different glideosome partners composed of MyoA, MLC, actin, GAP50 and GAP45, is more robust and, hence, *N*-glycosylation dictates the association as a large multi-complex proteins of higher molecular mass (Table 2). Consistent with this view, the pull down of glideosome partners using triple deglycosylated GAP50 results in the complete absence (or a drastic decrease) of identified peptide numbers of the both monomeric and large

macromolecular complexes (Table 2), suggesting that glideosome proteins may be associated *in cellulo* as a larger multicomplex proteins and that this association may depend on the *N*-glycosylation status of GAP50. Among the glideosome proteins identified in Table 2 is also GAP40, a polytopic protein of the IMC, which has been recently validated as an additional glideosome component (Frénal *et al*., 2010). Our comparative proteomic analyses also indicated that GAP40 (here named hypothetical protein TGME49_049850) is present in both monomeric and large macromolecular complexes pulled down with wild type GAP50, whereas the triple deglycosylated mutant failed to immunoprecipitate GAP40 (Table 2). Even if fewer hypothetical proteins are immunoprecipitated under higher salt stringency, two novel hypothetical proteins (TGME49_020950 and TGME49_058060) are still pulled down and the later hypothetical protein and GAP40 (TGME49_049850) are only immunoprecipitated when GAP50 is *N*-glycosylated (Table 2). As mentioned above, the mass spectrometry-based protein identification revealed 15 novel proteins that reproducibly co-precipitate with wild type GAP50 (Table 1). Even if our extensive bioinformatic analyses failed to find any known biological functions for these proteins, we found that the majority of these proteins are well-conserved in other apicomplexan parasites such as *Plasmodium falciparum*, *Eimeria*, *Neospora* and *Cryptosporidium* (Table S1), as expected for putative components of glideosome, which is well-conserved across apicomplexan species. In addition, we found that genes encoding four hypothetical proteins (TGME49_115610, TGME49_110420, TGME49_089970 and TGME49_037180) are transcribed through two cycles (S, M, C and G1) of parasite replication with mRNA profiles (from http://www.toxodb.org), which peak at M phases (Figure S5), similarly to GAP50 and the two novel GAP40 and GAP70 protein (Frénal *et al*., 2010). These data indicate that transcription of these genes and protein synthesis occur concomitantly to that of GAP50 during the parasite cell cycle, at the appropriate time points corresponding to inner membrane complex and glideosome formations, when the new IMC membranes are formed in the daughter cells. Thus, it is tempting to conclude that some of these hypothetical proteins could represent novel members of the glideosomes. Indeed, as for GAP50, some of these hypothetical proteins have one or several potential *N*-glycosylation sites and four of these hypothetical proteins also contain putative transmembrane domains (Table S2). Collectively, these data suggested that more components are likely associated directly or indirectly to the gliding acto-myosin-GAP50-GAP45 motor than initially thought.

Ectopic expression of *N*-glycosylated GAP50-HAFLAG increases resistance to tunicamycin blockade of parasite motility

We and others have previously reported that tunicamycin, an inhibitor which prevents the addition of *N*-glycans to the Asn residues of *N*-glycoproteins, acts in a peculiar manner in *T. gondii* (Luk *et al*., 2007, Fauquenoy *et al*., 2008) compared to other eukaryotic cells. While no obvious effects can be seen during the first round of intracellular development of tachyzoites inside the host cells, the tunicamycin-treated parasites were considerably reduced in motility and host cell invasion when they ruptured from the cell and are engaged in a second infection cycle. We observed that tunicamycin induces important alterations in the biogenesis of *T. gondii* inner membrane complex (IMC) and the parasite motile apparatus are impaired. To determine whether the effect of tunicamycin observed specifically involved *N*-glycosylation of GAP50, we first wanted to knock-out the gene encoding wild type GAP50 in the transgenic parasites already containing a second mutant copy of the gene, which ectopically expressing either *N*-glycosylated or unglycosylated GAP50 protein. As previously reported (Gaskins *et al.,* 2004), our attempts to knock-out GAP50 gene, despite the presence of the second gene copy, has also been unsuccessful. Therefore, we decided to investigate how the wild type and mutant parasites ectopically expressing wild type and unglycosylated GAP50-HAFLAG protein behave in the presence of tunicamycin. It should be noted that we chose to study a transgenic line where fluorescence and Western blot signals of ectopic GAP50-HAFLAG were roughly comparable to endogenous signals (Gaskin *et al*., 2004). In the transgenic parasites the sum of GAP50 levels is made up of both ectopically expressed GAP50-HAFLAG plus endogenous GAP50 and, as a consequence, the overall GAP50 protein levels are higher than in wild type parasites. We then monitored the gliding of drug-treated and untreated parasites using immunofluorescence staining to detect the trails left on slides by motile parasites (Figure 10). When intracellular parasites expressing GAP50-HAFLAG ectopically in addition to wild type GAP50 protein were incubated with tunicamycin, the freshly released ectopic expressers were able to display linear trail motility that was longer (Figure 10D) than those of the normal wild type (Figure 10B and triple deglycosylated GAP50 mutant (Figure 10F), also treated by the same concentration of tunicamycin. We estimated that the parasites expressing two copies of *N*-glycosylated GAP50 gene trailed twice or three time longer than the two other parasites lines (Figure 10G). In the absence of tunicamycin, these ectopically expressing GAP50 parasites displayed a normal circular gliding (Figure 10C), a behavior typical of either wild type (Figure 10A) or fully deglycosylated GAP50-expressing parasites (Figure 10E). Interestingly, we notice that the circular trail, another characteristic of parasite motility, is completely abolished in all parasite lines (Figure 10, compare left (A, C and E) and right (B, D and F) panels), suggesting that tunicamycin may block other *N*-glycoproteins involved in

the circular and clockwise movement of *T. gondii*. To establish whether tunicamycin could inhibit the host cell invasion of the three parasite lines, we monitored host cell reinfection after the first cycle of intracellular parasite treatment. Figure 10H shows that the capability of the ectopic GAP50-expressers to display longer trails or motility in the presence of tunicamycin is consistent with these transgenic parasites being able to invade new host cells more efficiently than wild type parasites and unglycosylated GAP50 mutants. In comparison with wild type and unglycosylated mutants, the GAP50 ectopic expressers successfully re-infected new host cells and grew faster after tunicamycin treatment (Figure 11A) while in the absence of tunicamycin, all three parasite lines displayed similar replication rates (Figure 11B). This suggests that *N*-glycosylation may play key roles in the trafficking of gliding components to the IMC, in the assembly of functional glideosome that is required for parasite motility, host cell invasion and pathogenesis during mammalian infection.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate that *N*-linked glycosylation plays two important roles in *T. gondii* GAP50. First, *N*-linked glycans are essential for the correct intracellular trafficking of GAP50 and for its insertion into the inner membrane complex (IMC), a structure that powers parasite motility, migration through host tissues, host cell invasion and egress. Second, the interactions between components of the multi-complex gliding machinery can be influenced by the *N*-glycosylation status of GAP50. Although the third *N*-glycosylation site is apparently not crucial, both the first or second *N*-glycosylation sites has to carry at least one *N*-linked sugar for GAP50 to be properly trafficked to the IMC. This seems to be a specific and important post-translational modification for targeting GAP50 into the inner membrane complex because mutations of *N*-glycan sites of another glycoprotein, TgAMA1, the apical major antigen 1 involved in moving junction formation, do not seem to be critical for its delivery to parasite micronemes. In this case, it remains to be determined whether unglycosylated TgAMA1 is still involved in the initial contact between parasite and host cell membranes, occurring in the form of a ring-shaped moving junction which migrates down the parasite as invasion proceeds, resulting to creation of a parasitophorous vacuole that completely envelops the intracellular parasites (Mital *et al*., 2005, Besteiro *et al*., 2008). In addition, our results provide new evidence that GAP50 also exists in a larger macromolecular complex containing GAP50, GAP45, MyoA, MLC1 and actin, which cannot be dissociated under mild detergent, boiling and unreduced electrophoretic conditions. When drafting this paper, we were aware about the discovery of GAP40, a novel glideosome component recently validated by Frénal *et al* (2010), thereby defining this motor machinery as being composed of five proteins (MyoA-MLC1-

GAP45-GAP50-GAP40). We independently identified GAP40 during our study as a hypothetical protein (TGME49_049850), which is present in both monomeric protein and is associated with the large macromolecular glideosome complex pulled down using higher salt stringency. We showed that removal of *N*-glycans from GAP50 results in dissociation of the larger complex of glideosome proteins and losses of several key glideosome components, including GAP40 and other novel hypothetical proteins. The functional significances of *N*-glycosylation on GAP50 can be observed by a single mutation of the first Asn101 or second Asn136, whereas the third *N*-glycosylated site (Asn228) appears to have no impact on GAP50 trafficking to IMC. However, this latter N-glycosylated site (Asn228) seems to have a role in the context of a double mutant, GAP50N_101_228-AA protein, because the doubly *N*-deglycosylated GAP50 protein is exclusively detected in cytoplasmic vesicles and no retention in the parasite ER and Golgi apparatus was observed. This also suggests that the third *N*-glycosylation site could be involved in the quality control and correct folding of fully *N*-glycosylated GAP50 (Cabral *et al*., 2001; Helenius and Aebi, 2004; Banerjee *et al*., 2007). Interestingly, we also found that the first and second *N*-glycosylation sites are well-conserved in two other related apicomplexan parasites, *Neospora caninum* and *Eimeria tenella*, while the third *N*-glycosylation site, apparently not be essential in GAP50 protein trafficking in *T. gondii*, is absent in *E. tenella* (Article n°2, figure S6, page 163). Our present study provides for first time insights into how *N*-glycosylation could regulate correct protein folding and trafficking of *N*-glycoproteins in a model of apicomplexan parasites. In addition, we established that in *T. gondii* these functions are ensured by unusual *N*-glycan chains, which are present on the three potential glycosylated sites of GAP50. These *N*-glycan chains are composed of immature and truncated oligomannose-rich sugars, which in some cases contain abnormally uncleaved terminal glucoses that are rarely present on *N*-glycoproteins of higher eukaryotes. In addition, our studies also provide evidence on the degree of *N*-glycan heterogeneity and site occupancy on GAP50. The absence of these *N*-glycans on the first two sites of GAP50 held the mutated protein in the ER/Golgi or in other vesicles. Thus, the partial or full deglycosylated GAP50 cannot reach the IMC and participate in glideosome formation. Previous studies have recently proposed models of how the glideosome is inserted in the IMC and this is schematically depicted in Figure 11C, updated according to the potential of *N*-glycosylation functions reported herein. This model suggests that GAP50 functions as the protein that anchors the glideosome *via* its transmembrane domain, with the much larger *N*-terminal part of the protein being located in the lumen of the IMC, except the last C-terminal six amino acids that is involved in binding to GAP45, the novel GAP40 and the motor MyoA-MLC1-Actin. Even though the simplest interpretation of *N*-glycans functions on GAP50 protein could be that unglycosylated GAP50 is stuck in the trafficking ER and Golgi pathway, thereby preventing its interactions with other glideosome partners, we also demonstrated that deglycosylated GAP50 cannot physically bind to partners. This supports the

notion that glycan-glycan or glycan-protein interactions may be involved in the glideosome formation and parasite's motility. Because the three *N*-glycans of GAP50 protein are located inside the lumen of the IMC, we hypothesize that these *N*-glycan chains may impact glideosome assembly and functions at the opposite side of the outer IMC membrane through glycan-glycan and/or glycan-protein interactions (Figure 11C). One of these GAP50 interacting partners that could cross the outer IMC is the novel GAP40, which contains 9 spanning transmembrane domains and one potential *N*-glycosylation site. Some of the other novel hypothetical proteins containing transmembrane domains and/or potential *N*-glycosylated sites could also represent good candidates that might be involved in glycan-glycan and/or glycan-protein interactions with *N*-glycosylated GAP50. However, the exact topology of these hypothetical proteins and their *N*-glycosylation status and contribution to the glideosome's functions will await further experimental investigations. Nevertheless, we have been able to show that *N*-glycosylation status of GAP50 is important for parasite gliding and host cell invasion. This conclusion is partially supported by the failure to generate a knock out mutant, which would contain a gene coding the unglycosylated GAP50 exclusively. Alternatively, the stable integration of a second gene into the parasite genome, leading to ectopic expression of *N*-glycosylated GAP50, rendered these transgenic parasites resistant to tunicamycin, a powerful inhibitor of *N*-glycosylation. These results suggest that *N*-glycosylation may be involved in the linear gliding trails, one of the three peculiar gliding forms (linear, circular and clockwise), itself sufficient to ensure host cell entry. The conservation of the motor complex across apicomplexan parasites is further supported by the recent demonstration that gliding motility of these pathogens to invade host cells can be inhibited in *T. gondii* (Dobrowolski *et al*., 1997), *Cryptosporidium* (Wetzel *et al*., 2005), *Theleria* (Shaw, 1999) and *Babesia* (Carreno *et al*., 1999). Together with the presence of glideosome in *Plasmodium falciparum* (Baum *et al*., 2006; Bullen et al., 2009), we conclude that a generic motor complex is used across the phylum Apicomplexa and has been adapted to the variety of post-translational modifications that can control glideosome functions, such as phosphorylation (Gilk *et al*., 2009), acylation (Rees-Channer *et al*., 2006; Frénal *et al*., 2010) and *N*-glycosylation (Luk *et al*., 2007; Fauquenoy *et al*., 2008; this study). A detailed understanding of the biological functions of factors that modulate parasite motility, such as the unusual *N*-glycan structures identified in *T. gondii*, and the conservation of this motor complex with numerous hypothetical proteins exclusively found in apicomplexan parasites highlights potential chemotherapeutic targets that may be applicable for a wide variety of these important human and livestock pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Culture of parasites

Human foreskin fibroblasts (HFFs) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen), 2mM *L*-glutamine, Invitrogen) and 10 000 U/mL Penicillin-Streptomycin (Invitrogen). Tachyzoites from *T. gondii* RH strain were grown in monolayers of HFF cells until they lysed the host cells spontaneously. Freed tachyzoites were harvested and purified using glass wool columns and 3-mm pore filters followed by centrifugation at 2200 rpm for 15 min.

Cloning of TgGAP50 into *T. gondii* expressing vector and site-directed mutagenesis

The gene encoding TgGAP50 protein was obtained in http://www.toxodb.org and the following forward and reverse primers, 5'-ccggctgcagATGGCAGGCGCCCCCGTC-3' and 5'-ccggctgcagTTTCATGTAGCGAGAGAGACCGTTC-3', were designed to amplify the complete ORF of TgGAP50 using cDNA from tachyzoites of RH strain and Accuprime *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). The PCR product was purified and cloned in pMAH14 plasmid using *PstI* restriction site and nucleotide sequence accuracy was checked by DNA sequencing. The pMAH14 vector allows fusion at the C-terminus with the HAFLAG tag and expression of TgGAP50-HAFLAG was under the control of the GRA1 promoter (Saksouk *et al*., 2005). The selectable marker, bleomycin, was amplified from pTub5Bleo plasmid by PCR, sequenced and subcloned via *KpnI* restriction sites into pTgGAP50-HAFLAG, resulting in a pMAH14-TgGAP50-HAFLAG vector containing the bleomycin-selectable marker (under the control of tubulin promoter) for the cloning of transgenic stable parasites. The replacement of individual and all three potential *N*-glycosylation sites (Asn101, 136 and 228) of TgGAP50 to Ala was performed by PCR using QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). The plasmid pMAH14TgGAP5-HAFLAG encoding the wild type GAP50 protein was used as template with the following primer pairs, which allow mutation of Asn residues (underlined): 5'-GGCG GAGTTTCCAGCCTGGCGGACACCAGGTGGCAATCC-3', 5'-GGATTGCCACCTGGTGT CCGCCAG GCTGGAAACTCCGCC-3' for the first potential *N*-glycosylation site (the mutant was designated pMAH14TgGAP50 N_101A-HAFLAG); 5'-GTCGATGACTGGAGTA GAGCGTACACCTCTGAGGCCCTG-3', 5'-CAGGGCCTCAGAGGTGTACGCTC TACTCCAGTC ATCGAC-3' for the second potential *N*-glycosylation site (pMAH14TgGAP50 N_136-A-HAFLAG); 5'-TCGTCGTTCCCGTTCTCGGCGGTGACGAGTCGCGCCTGG-3', 5'-CCAGGCGCGACTCGTCACCGCCGAGAACGGGAACGACGA-3' for the third potential *N*-glycosylation site (pMAH14TgGAP50N_228-A-HAFLAG). The following double mutants were also generated: pMAH14TgGAP50N_101_136-AA-HAFLAG, pMAH14TgGAP50 N-101_228-AA-HAFLAG, pMAH14TgGAP50N_136_228-AA-HAFLAG. Finally, the triple mutant pMAH14TgGAP50

N_101_136_228_AAA-HAFLAG plasmid was made by successive PCR and site-directed mutation that sequentially replaced all three Asn to Ala. In addition, the GRA1 promoter was replaced by a putative TgGAP50 promoter using genomic DNA corresponding to 2.2 kb chosen upstream of the ATG of the gene coding GAP50. The following forward and reverse primers were used to amplify the promoter region of TgGAP50 and PCR product was cloned between *BamHI* and *SmaI* restriction sites: 5'-ccggcccgggTTTGGAGTTGGCCGAGAGCAG-3' and 5'-ccgggagctcGCAAAGCATTGGTAAGCACGTGC-3'.

Transient and stable *T. gondii* transfections and Immunofluorescence assay

Transient transfection was performed using 100 µg of circular plasmids corresponding to wild type and mutated TgGAP50 into 10^7 tachyzoites of the RH strain. After transfection, the parasites were loaded onto confluent monolayers of HFF and 24 hours later the intracellular tachyzoites were fixed and processed for immunofluorescence assay. Stable *T. gondii* transformants were obtained by two selections of transfected tachyzoites in DMEM supplemented with 10mM Hepes and 50 µg/mL phleomycin (InvivoGen) for 4 hours at 37°C or 5µg/mL phleomycin for 10 hours at 37°C and the resistant parasites were cloned by limiting dilution. Intracellular transfected tachyzoites were fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS and permeabilized and saturated in PBS containing 0.2% Triton X-100 and 0.1M glycine at room temperature for 15 min. Samples were blocked with 5% FCS in the same buffer and mouse monoclonal anti-HA.11 antibodies (Covance), diluted at 1:1000, were added to parasites in the same buffer for one hour at 37°C. Rabbit secondary antibody coupled to Alexa-488 (Molecular Probes), diluted at 1:1000 was added in addition to DAPI for nucleus staining. For co-localization assays, the rabbit antibodies specific to IMC1 (generous gift of Dr G Ward, University of Vermont, USA), anti-GAP45, anti-MLC1 (kindly provided by Dr D Soldati, University of Geneva, Switzerland) and anti-GRA3 (from Dr JF Dubremetz, University of Montpellier, France) and the goat secondary antibody coupled to Alexa-594 (Molecular Probes) were used at the same dilution. Fluorescence was visualized with a ZEISS Axiophot microscope while confocal imaging was performed with a LSM710 microscope (Zeiss) and a Plan Apochromat objective (Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27, Zeiss). The associated software (Zen 2008) enabled the adjustment of acquisition parameters. Overlay images were assembled with Image J (NIH).

Electron microscopy and immunodetection. For immuno-electron microscopy, the intracellular transgenic tachyzoites expressing ectopic deglycosylated GAP50 grown in HFF cells were fixed overnight at 4°C in 8% paraformaldehyde in PBS buffer, then thoroughly washed in the same buffer and infused in sucrose 2.3 M containing 20% polyvinyl pyrrolidone 10000 in 0.1 M phosphate buffer. The pellets were mounted on ultracryotome supports and rapidly frozen in melting nitrogen. Ultrathin sections of about 90-100 nm were obtained using Reichert UltraCut E ultramicrotome equipped with a FC4 device. Before mounting in methyl cellulose, sections were incubated in

blocking medium (0.05 M glycine, 5% fish gelatine in 0.1 M PBS buffer) for 30 min. The grids were incubated with the polyclonal antibody specific to HA for 1 hour at 37°C or overnight at 4°C. After washing, sections were incubated at room temperature for 30 min in the corresponding secondary gold conjugates (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) diluted in the same buffer. Following a final wash in PBS alone, the grids were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature and washed in water. After staining with 0.5 % uranyl acetate in 1.5 % methyl cellulose, sections were observed on a Hitachi H600 transmission electron microscope at 75kV accelerating voltage.

Affinity purification using anti-FLAG chromatography

For pilot experiments, immunopurification of the different TgGAP50-HAFLAG tagged proteins was performed using anti-FLAG M2 Affinity beads (Sigma-Aldrich) and 10^8 stable transformants were lysed in TBS (50mM Tris.HCl, pH 7.4 containing 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1mM EDTA) for 1h at 4°C. After centrifugation, lysates were cleared at 14000 rpm at 30 min and incubated overnight at 4°C with 50µL of anti-FLAG M2 beads under agitation. After five washes in TBS, bound proteins were eluted with 2X SDS Laemmli buffer and subjected to SDS-PAGE followed by Western blots. A large scale purification of TgGAP50 partners was performed with lysate from 5 x 10^{10} stable transformants expressing the wild type TgGAP50-HAFLAG and incubated with 1 mL of anti-FLAG beads. After five washes with TBS, the bound proteins were eluted with 0.1 M glycine.HCl pH 2.5 and neutralized with 0.1 M Tris.HCl pH 9.4. Following SDS-PAGE and Coomassie blue staining, the band corresponding to GAP50-HAFLAG was excised and processed for glycomic and proteomic analyses. Comparative proteomic analyses were also performed using lysates from equal numbers (10^{10}) of parasites from stable wild type expressing triple *N*-glycosylated GAP50-HAFLAG tachyzoites and completely *N*-deglycosylated GAP50-HAFLAG parasites. In this case, the affinity chromatography was performed under higher salt stringency using TBS containing 0.5 M NaCl and bound proteins were also eluted with 0.1 M glycine.HCl pH 2.5 and neutralized with 0.1 M Tris.HCl pH 9.4. The eluted proteins were dialyzed and concentrated before SDS-PAGE analysis followed by Coomassie blue staining.

Protein identification and *N*-glycopeptide analysis by mass spectrometry

Reduction, alkylation and tryptic in-gel digestion were performed as previously described (Fauquenoy *et al.*, 2008). For N-glycopeptide analysis, the band corresponding to TgGAP50-HAFLAG was also treated overnight with 1.25 µg of chymotrypsin (Roche, Mannheim, Germany) at room temperature. Both digests were analyzed by C18 reversed phase nanoHPLC on a nanoACQUITY Ultra-Performance-LC system coupled to a Q-TOF maXis (Bruker Daltonics) mass spectrometer. For tandem

MS experiments, the system was operated in the data-dependant mode with 3 MS/MS scans. For N-glycopeptides analysis, oxonium ions for glycopeptide detection were generated using alternate collision energy in the collision cell (10/28 eV). Glycopeptides were highlighted by searching MS data for the presence of the 204.09 m/z HexNAc and the 366.14 m/z Hex(HexNAc) and confirmed by fragment ions generated by CID from LC-MS/MS data. The glycopeptide sequences were validated by manual assignment of peptide fragment ions as previously described (Castro *et al*., 2010). For protein identifications, MS and MS/MS data were analyzed using the MASCOT 2.2.0. algorithm (Matrix Science, London, UK) and OMSSA (Open Mass Spectrometry Search Algorithm) (Geer *et al*., 2004) for searches against an in-house generated protein database composed of protein sequences of *Toxoplasma gondii* downloaded from NCBInr (February 17, 2010) concatenated with reversed copies of all sequences (total 51258 entries). The target-decoy database search allowed us to control and estimate the false positive identification rate of our study (Peng *et al*., 2003; Elias and Gygi, 2007). Thus, the final catalogue of proteins presents an estimated false positive rate below 0.5%.

Determination of *N*-glycan structures using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)

The Coomassie-stained bands were excised from the gel, destained and the protein was then reduced and alkylated with iodoacetamide as previously described (Morelle and Michalski, 2007). After PNGase F digestion, *N*-glycans were eluted from the gel pieces and desalted on minicolumns with 10 mg of nonporous graphitized carbon followed by mass spectrometry. MALDI-TOF MS experiments were carried out on Voyager Elite DE-STR Pro instrument (PersSeptive Biosystem, Framingham, MA, USA) equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. The spectrometer was operated in positive reflectron mode by delayed extraction with an accelerating voltage of 20 kV and a pulse delay time of 200 nsec and a grid voltage of 66%. All spectra shown represent accumulated spectra obtained by 500 laser shots. Sample was prepared by mixing a 1 µL aliquot (5 to 10 picomoles) with 1µL of matrix solution, on the MALDI sample plate. The matrix solution was prepared by saturating methanol-water (1:1) with DHB (10 mg/mL). The on-target □-mannosidase digestion was performed on desalted *N*-glycans dissolved with water at 5 to 10 picomoles/µL and incubated with Jack bean *α*-mannosidase (EC 3.2.1.24, Sigma Chemicals (St. Louis, MO). One µL of the sample was spotted on the MALDI sample plate and 1 µL of 10 mM ammonium acetate (pH 4.5), and 35 mU of □-mannosidase were added. The MALDI plate was then placed in a crystallization beaker containing water, at 37°C for 6 hours. The enzymatic reaction was terminated by addition of 1 µL of a matrix solution (DHB) and the sample was analyzed by MALDI-TOF-MS. Ribonuclease B (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) was used as control *N*-glycoprotein.

Biochemical analyses of glycoform heterogeneity using LC-MS

5 µl of chymotrypsin GAP50 digest were analyzed by nanoLC-MS using the nanoACQUITY Ultra-Performance-LC system (UPLC, Waters, Milford, MA) coupled to a SYNAPT High Definition Mass Spectrometry (HDMS) quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (Waters, Milford, MA) equipped with a nano-electrospray source. Extraction of the current ions corresponding to the different glycoforms, identified by preliminary MS/MS experiments, was performed (m/z 1150.0, 1231.0, 1245.5, 1326.5, 1407.5, 1261.0, 1342.1, 1423.1, ± 0.2 Da) and for each glycosylation site, MS spectra of glycopeptides elution zone were combined.

In Vitro gliding assay, host cell invasion and proliferation assay

The wild type parasites, ectopic GAP50-HAFLAG expressers and completely deglycosylated GAP50-HAFLAG parasites, treated or untreated with 5-10 µg/ml of tunicamycin, were released 30 hours post-infection and filtered in DMEM containing 10mM Hepes and 1mM EGTA. After centrifugation at 1000 rpm for 10 minutes, the parasite pellet was resuspended in the same medium and the parasites were allowed to move for 15min at 37°C on slides previously coated overnight with 50% FCS prepared in PBS. Slides were immediately fixed with 4% PFA and processed for immunofluorescence assays using antibodies specific to the major surface antigen SAG1 in PBS. Trails of gliding parasites were visualized with a Zeiss Axiophot microscope. These treated or untreated wild type, ectopic expresser and completely deglycosylated GAP50 expressing parasites were also resuspended with DMEM medium containing 10% FCS, 2mM *L*-glutamine and 10 000 U/mL Penicillin-Streptomycin, loaded onto confluent monolayer HFF cells and grown for 24 hours at 37°C. The intracellular parasites were fixed and stained with monoclonal antibody specific to SAG1 for immunofluorescence as above and intracellular tachyzoites were counted under Zeiss Axiophot microscopy.

ACKNOWLEGMENTS

We thank Dr D Roos (University of Pennsylvania) for providing HDEL-RFP and GRASP-RFP parasite lines, Dr D Soldati for rabbit polyclonal antibodies specific to MLC1, MyoA and GAP45, Dr G Ward for monoclonal antibodies specific to IMC1, Dr JF Dubremetz for polyclonal antibodies anti-GRA3 and Dr JC Boothroyd for polyclonal anti-AMA1 antibodies. We are grateful to Drs M Gissot and Rob Walker for critical reading of the manuscript. We would also like to thank Dr E Wermeister for helpful advice on confocal microscopy, E Dewailly for excellent technical help in electron microscopy and all other laboratory members for fruitful discussions. This work was supported by the CNRS, INSERM and

Pasteur Institute of Lille. SF was supported by a fellowship from the French Ministry of Research. The Mass Spectrometry facility used in this study for released glycan studies was funded by the European Community (FEDER), the "Region Nord-Pas de Calais", France, the CNRS and the University of Sciences and Technology of Lille. Proteomic and glycopeptides studies were supported by the CNRS, the GIS IBiSA, the "Agence National de la Recherche" (ANR) the "Fondation de la Recherche Médicale" (FRM) and the "Region Alsace".

LEGENDS

Figure 1. Ectopic expression of GAP50-HAFLAG protein in *T. gondii*. **(A)** GAP50-HAFLAG expression in stable transgenic tachyzoites, revealed by a rabbit polyclonal antibody specific to the HA tag, demonstrated an association with inner membrane complex (IMC) in forming daughter cells. GAP50-HAFLAG signal is concentrated in the vicinity of daughter IMC as revealed by colocalization with anti-IMC1 fluorescence detected by mouse mAb 45.15. Characteristic stages (1-5) of parasite cell cycle progression are diagrammed in the model to the left. The parasite nuclei (blue) were stained with DAPI. Scale bar, 5 μm. **(B)** Immunoprecipitation of GAP50-HAFLAG using Triton X-100 extract from $5x10^{10}$ of stable transgenic tachyzoites and anti-FLAG beads pulled down numerous binding proteins, which have been demonstrated as key GAP50 partners involved in glideosome formation. The image corresponds to pull down proteins eluted by 0.1M glycine.HCl pH 2.5 after extensive washing with TBS, a lower strength buffer containing 0.15 M NaCl. Bound proteins were resolved by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Bands were excised and subjected to proteomic analyses (Table 1). Only the major glideosome components are indicated by arrows on the right.

Figure 2. *T. gondii* GAP50 contains unusual oligomannose-rich *N*-glycan with terminal glucose residues. MALDI-TOF-MS spectra of the in-gel PNGase F released *N*-glycans from *T. gondii* GAP50-HAFLAG before **(A)** and after α-mannosidase digestion **(B)**. Purified GAP50 (as described in Fig.1A) was excised, de-stained and the protein was reduced and alkylated with iodoacetamide. After in-gel deglycosylation by treatment with PNGase F, the extracted glycans were purified on non-porous graphitized carbon solid phase extraction cartridge and characterized by MALDI-TOF-MS analysis, as $[M+Na]^+$ pseudomolecular ions, before (A) and after on-plate α-mannosidase digestion (B). Mass spectra were recorded in positive ion reflective mode. **(C)** MALDI-TOF-MS spectrum of the PNGase F released *N*-glycans from ribonuclease B after on-plate α-mannosidase digestion was used as positive control. **(D)** Proposed structures of *N*-glycans on *T. gondii* GAP50. The data do not exclude

the presence of *N*-glycans with seven or eight mannose residues. Symbols were as follows: ■, N-acetylglucosamine; ●, mannose; ○, glucose.

Figure 3. Deciphering *N*-glycan structures and positioning on GAP50 protein. (A) GAP50 glycopeptides were identified using nanoLC-MS/MS. The MS/MS spectrum from the parent ion m/z = 1150.48 corresponds to the chymotryptic peptide ^{227}SNVTSRAW^{234} with the *N*-glycosylation $Hex_6(HexNAc)_2$ in position Asn228. **(B)** The MS/MS spectrum from parent ion at m/z = 1329.03 corresponds to the tryptic peptide ^{136}NYTSEALR^{143} with the *N*-glycosylation $Hex_8(HexNAc)_2$ in position Asn136. **(C)** The MS/MS spectrum from parent ion at m/z = 1414.31 corresponds to the tryptic peptide ^{77}VAANEHISFIASPGSNFLGGVSSLNDTR^{104} with the *N*-glycosylation $Hex_6(HexNAc)_2$ in position Asn101. Symbols were as follows: P = peptide; ■ = N-acetylglucosamine; ● = mannose; ◯ = hexose. (D-G) Chymotryptic digestion of GAP50-HAFLAG profile using nanoLC-MS. **(D)** Extracted ion chromatograms (m/z 1150.0, 1231.0 for peak 1; 1245.5, 1326.5, 1407.5 for peak 2; 1261.0, 1342.1, 1423.1, for peak 3; ± 0.2 Da) indicated the elution zone of glycopeptides assigned by MS/MS. **(E)** Combined mass spectrum of the glycopeptides containing Asn228 eluting at 17 min (peak 1). **(F)** Combined mass spectrum of the glycopeptides containing Asn136 eluting at 19 min (peak 2). **(G)** Combined mass spectrum of the glycopeptides containing Asn101 eluting at 23 min (peak 3).

Figure 4. Ectopic expression of wild type and *N*-deglycosylated GAP50-HAFLAG protein using GAP50 gene promoter. Schematic representations showing the GAP50 gene sequences corresponding to the three potential *N*-glycosylated sites in the wild type GAP50-HAFLAG and the different mutants used for transient transfection and IFA are shown on left. (A-D) Expression and localization of wild type GAP50-HAFLAG (green) in intracellular tachyzoites with another glideosome partner, GAP45, localized in the IMC (red). (E-H) Absence of co-localization between GAP50N_101-A-HAFLAG (green) and the glideosome partner GAP45 (red). (I-L) Absence of co-localization between GAP50N_136-A-HAFLAG (green) and the glideosome partner GAP45 (red). (M-P) Perfect co-localization between GAP50N_228-A-HAFLAG (green) with the glideosome partner GAP45 (red). (Q-T) Absence of co-localization between GAP50N_101_136_228-AAA-HAFLAG (green) and the glideosome partner GAP45 (red). Scale bar, 5 µm.

Figure 5. Mutations of *N*-glycosylation site on GAP50 increased its presence and retention in the endoplasmic reticulum. Schematic representations of vectors containing GAP50 promoter transiently transfected in tachyzoites expressing the ER marker HDEL. (A-D) The wild type GAP50-HAFLAG (green) was exclusively present in the IMC (green) and no GAP50 signal was observed in the

ER (red). (E-H) The mutation of the first *N*-glycosylation site of GAP50N_101-A-HAFLAG (green) leads to a strong co-localization with HDEL-RFP (yellow), indicating that this single *N*-deglycosylated GAP50 protein is strongly enriched in the ER (red). (I-L) The mutation of the second *N*-glycosylation site of GAP50N_136-A-HAFLAG (green) leads to a strong co-localization with HDEL-RFP (yellow), indicating that this single *N*-deglycosylated GAP50 protein is also strongly enriched in the ER (red). (M-P) The mutation of the third *N*-glycosylation site of GAP50N_228-A-HAFLAG (green) had no effect on sub-cellular localization. Instead, the deglycosylated GAP50 at the third site leads to a strong localization in the IMC, similarly to wild type GAP50-HAFLAG. (Q-T) The mutation of all three *N*-glycosylation sites of GAP50N_101_136_228-AAA-HAFLAG (green) leads to a co-localization with HDEL-RFP (yellow), indicating that this triple *N*-deglycosylated GAP50 protein is strongly retained in the ER (red), similar to mutants of the first (GAP50N_101-A-HAFLAG) and second (GAP50N_101-A-HAFLAG) *N*-glycosylation sites. The fluorescence of GAP50 (green) was detected using monoclonal antibodies specific to the HA tag while HDEL-RFP signal (red) was directly captured. Scale bar, 5 µm.

Figure 6. Mutations of *N*-glycosylation sites on GAP50 cause retention of the deglycosylated protein in the Golgi apparatus. Schematic representations of vectors containing GAP50 promoter transiently transfected in tachyzoites stably expressing *T. gondii* Golgi marker, GRASP. (A-D) The ectopic fully *N*-glycosylated GAP50-HAFLAG (green) is present in the IMC and no signal can be observed in the Golgi (indicated in red by the GRASP-RFP marker) of the intracellular tachyzoites. (E-H) The mutation of the first *N*-glycosylation site of GAP50N_101-A-HAFLAG (green) leads to a strong co-localization with GRASP-RFP (yellow), indicating that this single *N*-deglycosylated GAP50 protein is strongly enriched in the Golgi apparatus (red). (I-L) The mutation of the second *N*-glycosylation site of GAP50N_136-A-HAFLAG (green) leads to a strong co-localization with GRASP-RFP (yellow), indicating that this single *N*-deglycosylated GAP50 protein is also strongly enriched in the Golgi (red). (M-P) The mutation of the third *N*-glycosylation site of GAP50N_228-A-HAFLAG (green) had no effect on sub-cellular localization. Instead, the deglycosylated GAP50 at the third site also leads to a strong localization in the IMC, similar to wild type GAP50-HAFLAG. (Q-T) The mutation of all three *N*-glycosylation sites of GAP50N_101_136_228-AAA-HAFLAG (green) leads to a co-localization with GRASP-RFP (yellow), indicating that this triple *N*-deglycosylated GAP50 protein is being strongly retained in the Golgi (red), similarly to mutants of the first and second *N*-glycosylation sites. The fluorescence of GAP50 (green) was also detected using monoclonal antibodies specific to the epitope HA while HDEL-RFP signal (red) was directly captured. Scale bar, 5 µm.

Figure 7. Mislocalization of deglycosylated GAP50 into the PVM. (A) The stable expression of wild type GAP50-HAFLAG and GAP50N_101-A-HAFLAG, GAP50N_136-A-HAFLAG, GAP50N_228-A-HAFLAG and GAP50N_101_136_228-A-HAFLAG mutants under control of homologous GAP50 promoter. No co-localization with GRA3 was detected in the PVM. **(B)** Under the control of GRA1 gene promoter, the wild type GAP50-HAFLAG stably expressed in the newly formed daughter parasite's IMC (green), with a dense granule marker GRA3 (red) using specific monoclonal antibodies (A-D). (E-H) The mutation of the first *N*-glycosylation site of GAP50N_101-A-HAFLAG (green) leads to a strong co-localization with GRA3 signal (yellow), indicating that this single *N*-deglycosylated GAP50 protein is misdirected into the parasitophorous vacuole (PV) through the constitutive secretion of dense granules (red). (I-L) The mutation of the second *N*-glycosylation site of GAP50N_136-A-HAFLAG (green) leads to a similar presence in the PV (yellow). (M-P) The mutation of the third *N*-glycosylation site of GAP50N_228-A-HAFLAG (green) had no effect on sub-cellular mislocalization. (Q-T) The mutation of all three *N*-glycosylation sites of GAP50N_101_136_228-AAA-HAFLAG (green) prevents co-localization with GRA3 fluorescence (red). Scale bar, 5 μm.

Figure 8. The secretion of the single deglycosylated GAP50N_101-A-HAFLAG into the PVM through the dense granules is evidenced by immuno-electron microscopy. (A) Electron micrograph of intracellular parasites stably expressing the first *N*-deglycosylated site GAP50N_101-A-HAFLAG evidenced a dense granule that had fused to the plasma membrane and is releasing its contents, including the mutated deglycosylated GAP50 protein (gold), into the PV. Bar, 500 nm. **(B)** Electron micrograph confirmed the absence of the mutant GAP50N_101-A-HAFLAG expressed under GRA1 promoter control in the newly formed daughter IMC membranes. Bar, 1 μm. **(C)** Discharge of mutant GAP50N_101-A-HAFLAG into the PVM. Bar, 500 nm. **(D)** Enlargement of the electron micrograph of the single *N*-deglycosylated GAP50 mutant line revealed the insertion of deglycosylated GAP50 protein into the membrane of the tubulo-vesicular network of the PV, probably through its type I transmembrane domain. Bar, 250 mm.

Figure 9. Analysis of *N*-glycan site occupancy of TgGAP50-HAFLAG by selective removal of the potential *N*-glycan sites. (A) Western blots of lysates expressing wild type GAP50-HAFLAG (GAP50 WT) or mutants lacking one potential *N*-glycosylation site (GAP50N_101-A**,** GAP50N_136-A, GAP50N_228-A) or all three *N*-glycosylation site (GAP50N_101_136_228-AAA). The samples were reduced prior to electrophoresis. The absence of one or all three *N*-glycans was confirmed by the mobility shift of partial or fully deglycosylated GAP50 relative to wild type GAP50-HAFLAG. The housekeeping actin was used as a loading control. **(B)** Analysis of *N*-glycan site occupancy in wild

type GAP50-HAFLAG (GAP50 WT) or mutants lacking one potential *N*-glycosylation site (GAP50N_101-A**,** GAP50N_136-A, GAP50N_228-A) or all three *N*-glycosylation site (GAP50N_101_136_228-AAA) after PNGase F digestion. Tachyzoite lysates were treated with PNGase F (lanes 3) or with buffer alone (lanes 2) and compared with untreated control (lanes 1). The samples were reduced prior to electrophoresis followed by Western blots as above. After PNGase F treatments, all single deglycosylated mutants (GAP50N_101-A**,** GAP50N_136-A, GAP50N_228-A) collapse into one major and faster mobility band that co-migrates with the triple deglycosylated mutant (GAP50N101_136_228-AAA, itself insensitive to PNGase F, as expected (right panel, lane 3). **(C-D)** Parasites expressing wild type GAP50-HAFLAG (GAP50 WT) or mutants lacking one potential *N*-glycosylation site (GAP50N_101-A**,** GAP50N_136-A, GAP50N_228-A) or all three *N*-glycosylation sites (GAP50N_101_136_228-AAA) were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-FLAG beads. Under non-reducing electrophoretic conditions, these Western blots (revealed with polyclonal antibodies specific to MyoA and MLC1) showed that the mutations of the first two *N*-glycan sites reduced or completely abolished MyoA (C) and MLC1 (D) pull-down. **(E)** Cross-linking parasites expressing wild type GAP50-HAFLAG (GAP50 WT) or mutants lacking one potential *N*-glycosylation site (GAP50N_101-A**,** GAP50N_136-A, GAP50N_228-A) or all three *N*-glycosylation sites (GAP50_N101_136_228-AAA) with DSP followed by IP and Western blots under reduced electrophoretic conditions demonstrated that the partial deglycosylated GAP50 in GAP50N_101-A**,** GAP50_N136-A and in the complete unglycosylated GAP50N_101_136_228-AAA transgenic prevent interactions with key glideosome partners *in vivo*. Note that the lack of *N*-glycan in the third site Asn (GAP50N_228-A) has no consequence on partner binding, instead this partial deglycosylated GAP50 behaves similar to wild type GAP50. **(F)** Western blots of parasites expressing wild type GAP50-HAFLAG (GAP50 WT) or mutants lacking one potential *N*-glycosylation site (GAP50N_101-A**,** GAP50N_136-A, GAP50N_228-A) or all three *N*-glycosylation sites (GAP50N101_136_228-AAA) after IP with anti-FLAG beads and staining with polyclonal antibodies specific to GAP45. Note the presence of GAP45 assembled with other glideosome components as oligomeric heterocomplexes under non-reduced electrophoretic conditions.

Figure 10. Assessment of gliding motility by trail deposition. (A, C and E) Tachyzoites from wild type RH strain, ectopic GAP50-HAFLAG expressers and triple mutant (GAP50N101_136_228-AAA-HAFLAG) lines were treated with DMSO as a control. **(B, D and F)** The three transgenic lines treated with tunicamycin were released and allowed to glide on serum-coated slides and visualized by staining with anti-SAG1 antibodies. Scale bar, 5 μm. **(G)** Quantification of the length of linear trails of tachyzoites from wild type RH strain, ectopic GAP50-HAFLAG expressers and triple mutant

(GAP50N101_136_228-AAA-HAFLAG) parasite lines treated with tunicamycin during the first cycle of host cell infection as above. Results are mean +/- s.e.m. of at least three experiments. **(H)** Effect of tunicamycin on host cell entry by tachyzoites from wild type RH strain, ectopic GAP50-HAFLAG expressers and triple mutant (GAP50N101_136_228-AAA-HAFLAG). The percentage of invaded host cell was calculated by comparing that of the untreated (DMSO control) and tunicamycin-treated parasites, which were allowed to invade new HFF, fixed and stained with anti-SAG1 for IFA.

Figure 11. Invasion phenotypes associated with ectopic GAP50-HAFLAG expression. (A) Quantification of invading parasites from wild type RH strain, ectopic GAP50-HAFLAG expressers and triple mutant (GAP50N101_136_228-AAA-HAFLAG) parasites after tunicamycin treatment. (**B**) Quantification of invading parasites from wild type RH strain, ectopic GAP50-HAFLAG expressers and triple mutant (GAP50N101_136_228-AAA-HAFLAG) parasites after DMSO treatment used as a control. (**C**) Proposed model of *N*-glycan functions of *T. gondii* GAP50 in trafficking and binding key glideosome partners. According to the currently accepted model, which has been recently revisited and improved by Frénal *et al*. (2010) during the course of writing our paper, our data indicate that *N*-glycosylation may be a key post-translational modification for GAP50 transport through the classical ER-Golgi secretory pathway (left panel) until its final destination, the IMC, where it will associate with other glideosome partners (right panel). The *N*-glycans on GAP50 are not only essential for proper trafficking but probably also important for direct or indirect interactions with other glideosome partners. We hypothesize that some of the hypothetical proteins pulled down by GAP50 (including the novel GAP40) with potential *N*-glycosylation sites and transmembrame domains and especially those that are not co-immunoprecipitated with the complete unglycosylated GAP50 may be involved in connecting the N-terminal part of *N*-glycosylated GAP50 located in the IMC lumen to the other glideosome partners (GAP45-MLC1-MyoA-Actin), which are localized at the opposite site. We conclude that more components are likely involved in glideosome formation and regulation than initially thought.

Table 1. Proteins binding to *N*-glycosylated GAP50-HAFLAG identified by nanoLC-MS/MS. The affinity purification was performed under low stringency conditions and protein identity was determined using a protein database of *T. gondii* downloaded from NCBInr databases. The corresponding identity in *T. gondii* databases (http://www/toxodb.org) is shown.

Table 2: Comparison of proteins binding to *N*-glycosylated and unglycosylated GAP50-HAFLAG identified by nanoLC-MS/MS. The affinity purification was performed under high

stringency conditions and protein identity was determined using a protein database of *T. gondii* downloaded from NCBInr databases. The corresponding identity in *T. gondii* databases (http://www/toxodb.org) is shown. We identified four novel GAP50 binding proteins including GAP40, which has been independently reported and validated as a novel glideosome component that interacts with GAP45 (Frénal *et al*., 2010). The presence of potential *N*-glycosylated sites, transmembrane domains and gene mRNA profiles identical to that of the GAP50 gene suggest that these novel GAP50 binding proteins may be involved in glideosome formation and/or regulation.

Table S1. Identification of orthologues in other apciomplexan parasites of the novel hypothetical proteins that bind to GAP50-HAFLAG.

Table S2. Identification of transmembrane domain and *N*-glycosylation sites in the novel hypothetical proteins that are pulled down by GAP50-HAFLAG.

Figure S1. Expression of double mutant GAP50N_101_136-AA-HAFLAG protein and colocalization experiments using RE marker, HDEL-RFP and Golgi marker, GRASP-RFP.

Figure S2. Expression of double mutant GAP50N_136_228-AA-HAFLAG protein and colocalization experiments using RE marker, HDEL-RFP and Golgi marker, GRASP-RFP.

Figure S3. Expression of double mutant GAP50N_101_228-AA-HAFLAG protein and colocalization experiments using RE marker, HDEL-RFP and Golgi marker, GRASP-RFP.

Figure S4. Evidence for *N*-glycosylation on TgAMA1 protein. (A) Enzymatic deglycosylation using PNGase F digestion and inhibition of *N*-glycan addition by tunicamycin demonstrated by electrophoretic mobility shift that TgAMA1 contain at least one *N*-glycan chain on its protein. This was also confirmed using Con A, which specifically pulled down the native TgAMA1 whereas no protein was precipitated using detergent lysates of tunicamycin-treated parasites. (**B**) Ectopic expression of wild type and *N*-deglycosylation mutated AMA1-HAFLAG protein. Schematic representations showing the AMA1 gene sequences corresponding to the two potential *N*-glycosylated sites in the wild type AMA1-HAFLAG and the different mutants used for transient transfection and IFA are shown on left. (**A-D**) Expression and localization of wild type AMA1-HAFLAG (green) in the micronemes of intracellular tachyzoites transiently transfected and stained with anti-HA antibodies. (**E-L**) The mutation of the first (E-H) or the second (I-L) *N*-glycan site in AMA1-HAFLAG

protein has no effect on targeting into the parasite micronemes. (M-P) The double mutants lacking both potential *N*-glycosylation sites showed a weak increase of deglycosylation AMA1 in the ER but most signal was still present in the parasite micronemes. Bar, 5 μm.

Figure S5. Comparison of mRNA synthesis profiles of genes encoding proteins involved in glideosome components and those coding the novel hypothetical proteins.

Figure S6. Amino acid alignment of GAP50 proteins highlights the conservation of the first two canonical *N*-glycosylation sites in the coccidian parasites (see stars)**.** The third *N*-glycosylation site is not present in *Eimeria*.

REFERENCES

Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., and Boothroyd, J.C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS pathogens *1*, 137-149.

Banerjee, S., Vishwanath, P., Cui, J., Kelleher, D.J., Gilmore, R., Robbins, P.W., and Samuelson, J. (2007). The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *104*, 11676-11681.

Baum, J., Richard, D., Healer, J., Rug, M., Krnajski, Z., Gilberger, T.W., Green, J.L., Holder, A.A., and Cowman, A.F. (2006) A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. J. Biol Chem. *281,* 5197-5208.

Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.F., and Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. PLoS. Pathog *5*, e1000309.

Bullen, H.E., Tonkin, C.J., O'Donnell, R.A., Tham, W.T., Papenfuss, A.T., Gould, S., Cowman, A.F., Crabb, B.S., and Gilson, P.R. (2009) A novel family of apicomplexan glideosome-associated proteins with an inner membrane-anchoring role. J. Biol. Chem. *284*, 25353-25363.

Bushkin, G.G., Ratner, D.M., Cui, J., Banerjee, S., Duraisingh, M.T., Jennings, C.V., Dvorin, J.D., Gubbels, M.J., Robertson, S.D., Steffen, M., O'Keefe, B.R., Robbins, P.W., Samuelson, J. (2010) Suggestive evidence for Darwinian Selection against asparagine-linked glycans of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii*. Eukaryot Cell. *9*, 228-241.

Cabral, C.M., Liu, Y., and Sifers, R.N. (2001). Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. Trends. Biochem. Sci *26*, 619-624.

Carreno, R.A., Martin, D.S., and Barta, J.R. (1999) Cryptosporidium is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol. Res. *85*, 899-904.

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

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

Elbein, A.D. (1981). The tunicamycins: useful tools for studies on glycoproteins. Trends Biochem. Sci. *6*, 219-221.

Elias, J.E., and Gygi, S P. (2007). Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. Nat. Meth. *4,* 207-214

Frénal, K., Polonais, V., Marq, J-B., Stratmann, R., Limenitakis, J., and Soldati-Favre, D. (2010) Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. Cell Host & Microbe *8,* 343-357.

Fauquenoy, S., Morelle, W., Hovasse, A., Bednarczyk, A., Slomianny, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Tomavo, S. (2008). Proteomics and glycomics analyses of *N*-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*-host cell interactions. Mol Cell Proteomics *7*, 891-910.

Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., and Beckers, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. J. Cell. Biol *165*, 383-393.

Geer, L.Y., Markey, S.P., Kowalak, J.A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D.M., Yang, X., Shi, W. and Bryant, S.H. (2004). Open mass spectrometry search algorithm. J. Proteome Res. *3*, 958-964.

Gilk, S.D., Gaskins, E., Ward, G.E., and Beckers, C.J. (2009). GAP45 phosphorylation controls assembly of the Toxoplasma myosin XIV complex. Eukaryot. Cell *8*, 190-196.

Hakansson, S., Morisaki, H., Heuser, J., and Sibley, L.D. (1999). Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. Mol. Biol. Cell *10*, 3539-3547.

Huynh, M.H., and Carruthers, V.B. (2006) *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. Plos Pathogens. *2,* e84.

Heaslip, A.T., Leung, J.M., Carey, K.L., Catti, F., Warshaw, D.M., Westwood, N.J., Ballif, B.A., and Ward, G.E. (2009). A small-molecule inhibitor of *T. gondii* motility induces the posttranslational modification of myosin light chain-1 and inhibits myosin motor activity. PLoS. Pathog *6*, e1000720.

Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of *N*-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu. Rev. Biochemistry *73*, 1019-1049.

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

Johnson, T.M., Rajfur, Z., Jacobson, K., and Beckers, C.J. (2007). Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biol. Cell *18*, 3039-3046.

Keeley, A., and Soldati, D. (2004). The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. Trends. Cell. Biol*14*, 528-532.

Luk, F.C., Johnson, T.M., and Beckers, C.J. (2008). *N*-linked glycosylation of proteins in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol *157*, 169-178.

Mann, T., and Beckers, C. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. *115*, 257-268.

Mercier, C., Adjogble, K.D., Däubener, W., and Delauw, M.F. (2005) Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? Int. J. Parasitol. *35*, 829-849.

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

Mital, J., Meissner, M., Soldati, D., and 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.

Morelle, W., Michalski, J.C. (2007) Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. Nat. Protoc. *2*, 1585-602.

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.

Opitz, C., and Soldati, D. (2002). 'The glideosome: a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Mol. Microbiol *45*, 597-604.

Peng, J., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Licklider, L.J. and Gygi, S.P. (2003). Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. J. Proteome Res. *2*, 43-50.

Pelletier, L., Stern, C.A., Pypaert, M., Sheff, D., Ngô, H.M., Roper, N., He, C.Y., Hu, K., Toomre, D., Coppens, I., Roos, D.S., Joiner, K.A. and Warren, G. (2002) Golgi biogenesis in Toxoplasma gondii. Nature. 418, 548-552.

Pomel, S., Luk, F.C., and Beckers, C.J. (2008). Host cell egress and invasion induce marked relocations of glycolytic enzymes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. PLoS. Pathog *4*, e1000188.

Rees-Channer, R.R., Martin, S.R., Green, J.L., Bowyer, P.W., Grainger, M., Molloy, J.E., Holder, A.A. (2006) Dual acylation of the 45 kDa gliding-associated protein (GAP45) in *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol. Biochem. Parasitol. *149*, 113-116.

Rome, M.E., Beck, J.R., Turetzky, J.M., Webster, P., and Bradley, P.J. (2008) Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. *76*, 4865-4875.

Samuelson, J., Banerjee, S., Magnelli, P., Cui, J., Kelleher, D.J., Gilmore, R., Robbins, P.W. (2005) The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. *102*, 1548-1553.

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

Shaw, M.K. (1999) *Theileria parva*: sporozoite entry into bovine lymphocytes is not dependent on the parasite cytoskeleton. Exp. Parasitol. *92*, 24-31.

Sibley, L.D., Hakansson, S., and Carruthers, V.B. (1998). Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. Curr. Biol *8*, R12-14.

Wetzel, D.M., Håkansson, S., Hu, K., Roos, D., Sibley, L.D. (2003) Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. Mol. Biol. Cell. *14*, 396-406.

Wetzel, D.M., Chen, L.A., Ruiz, F.A., Moreno, S.N., Sibley, L.D. (2004) Calcium-mediated protein secretion potentiates motility in *Toxoplasma gondii*. J. Cell Sci. *117*, 5739-5748.

Wetzel, D.M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M.S., Dubey, J.P., and Sibley, L.D. (2005) Infect. Immun. *73*, 5379-5387.

Wuhrer, M., Catalina, M. I., Deelder, A. M. and Hokke, C. H. (2007). Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. J. Chromatogr. B. *849*, 115-128.

FIGURE 1

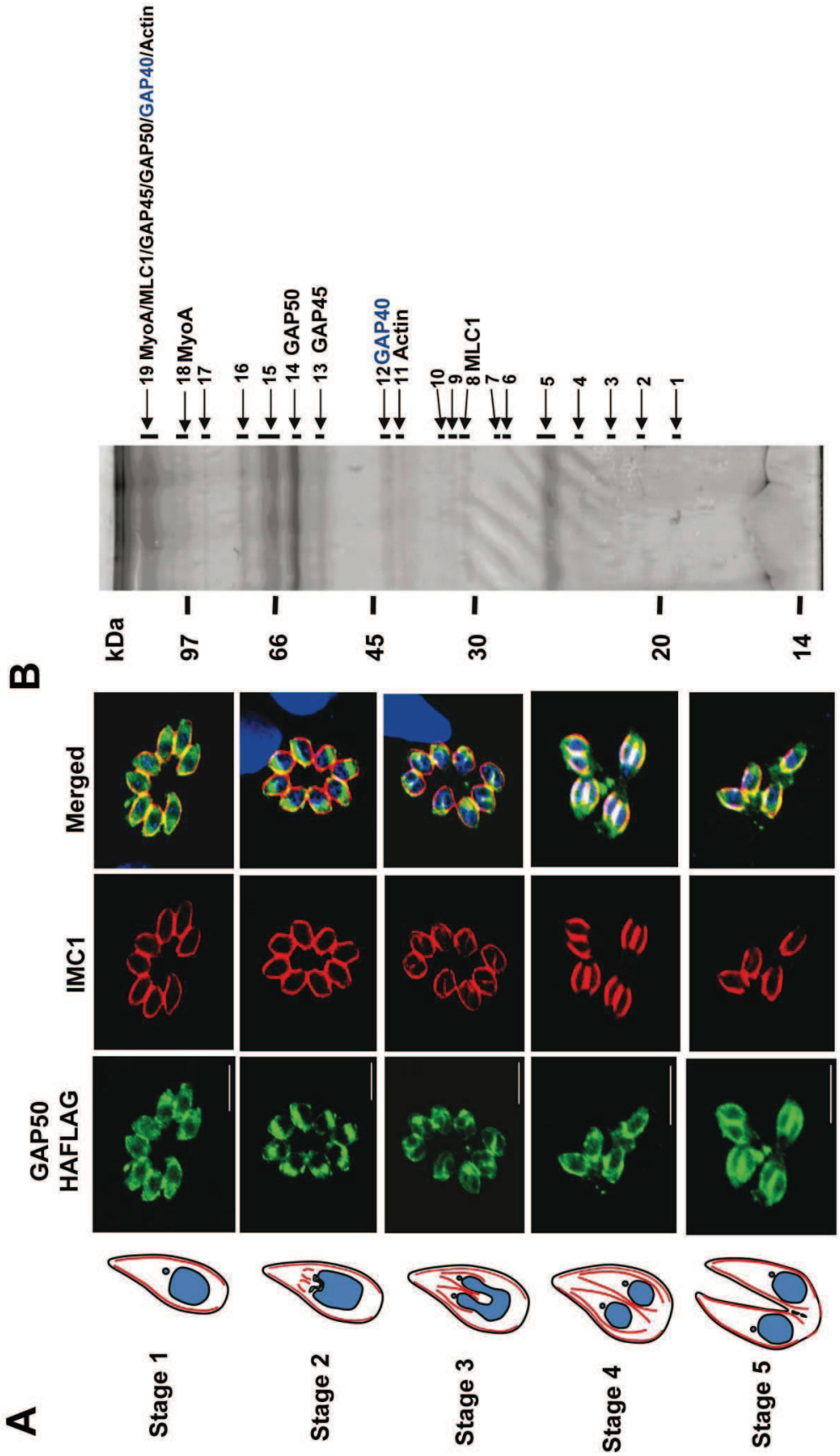

A
GAP50 HAFLAG
IMC1
Merged
Stage 1
Stage 2
Stage 3
Stage 4
Stage 5
B
kDa
97
66
45
30
20
14
19 MyoA/MLC1/GAP45/GAP50/GAP40/Actin
18 MyoA
17
16
15
14 GAP50
13 GAP45
12 GAP40
11 Actin
10
9
8 MLC1
7
6
5
4
3
2
1

FIGURE 2

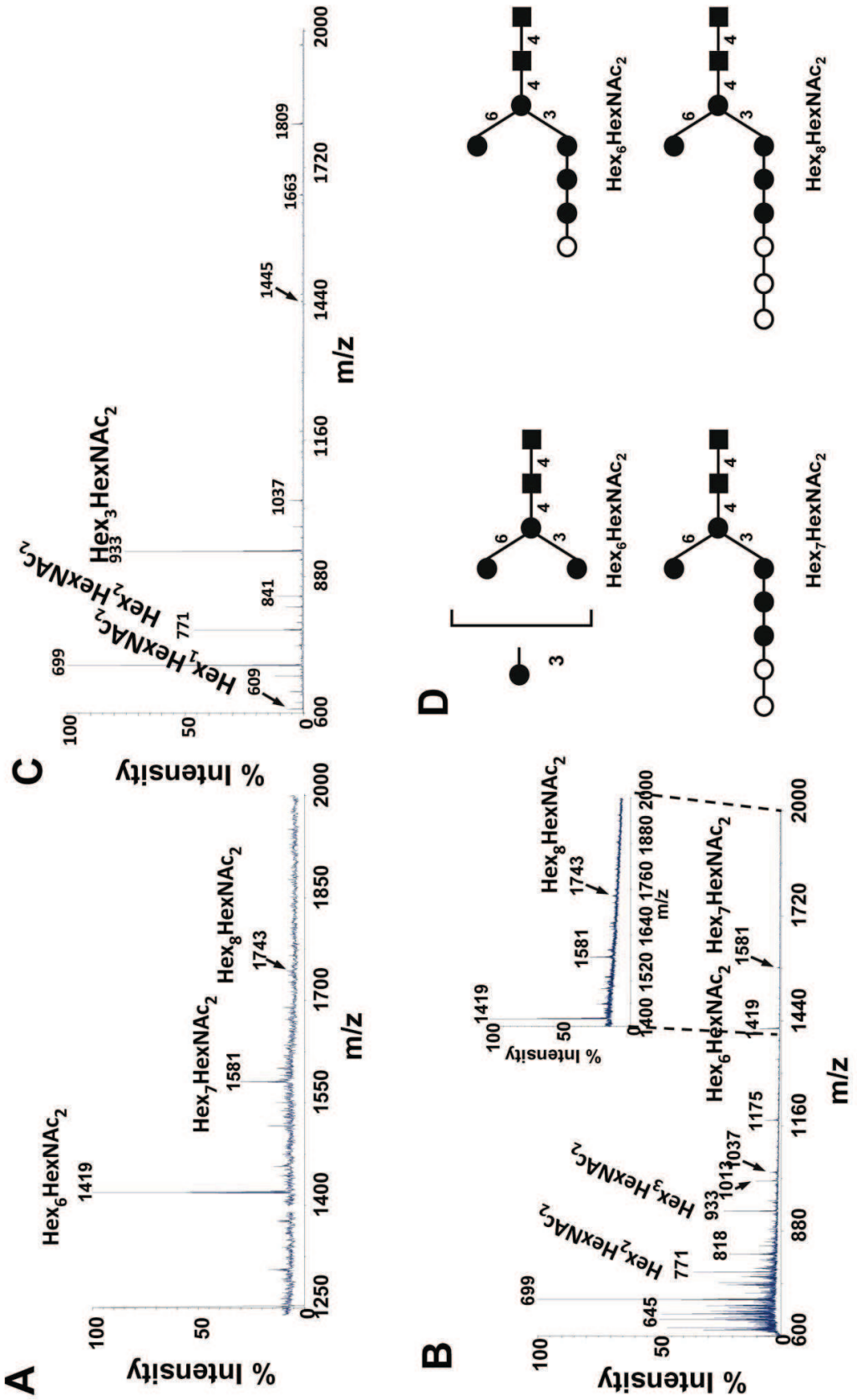

A
% Intensity
m/z
Hex6HexNAc2
1419
Hex7HexNAc2
1581
Hex8HexNAc2
1743
B
% Intensity
m/z
Hex6HexNAc2
Hex7HexNAc2
Hex8HexNAc2
C
% Intensity
m/z
Hex1HexNAc2
Hex2HexNAc2
Hex3HexNAc2
609
699
771
841
933
1037
1445
D
Hex6HexNAc2
Hex7HexNAc2
Hex8HexNAc2

FIGURE 3

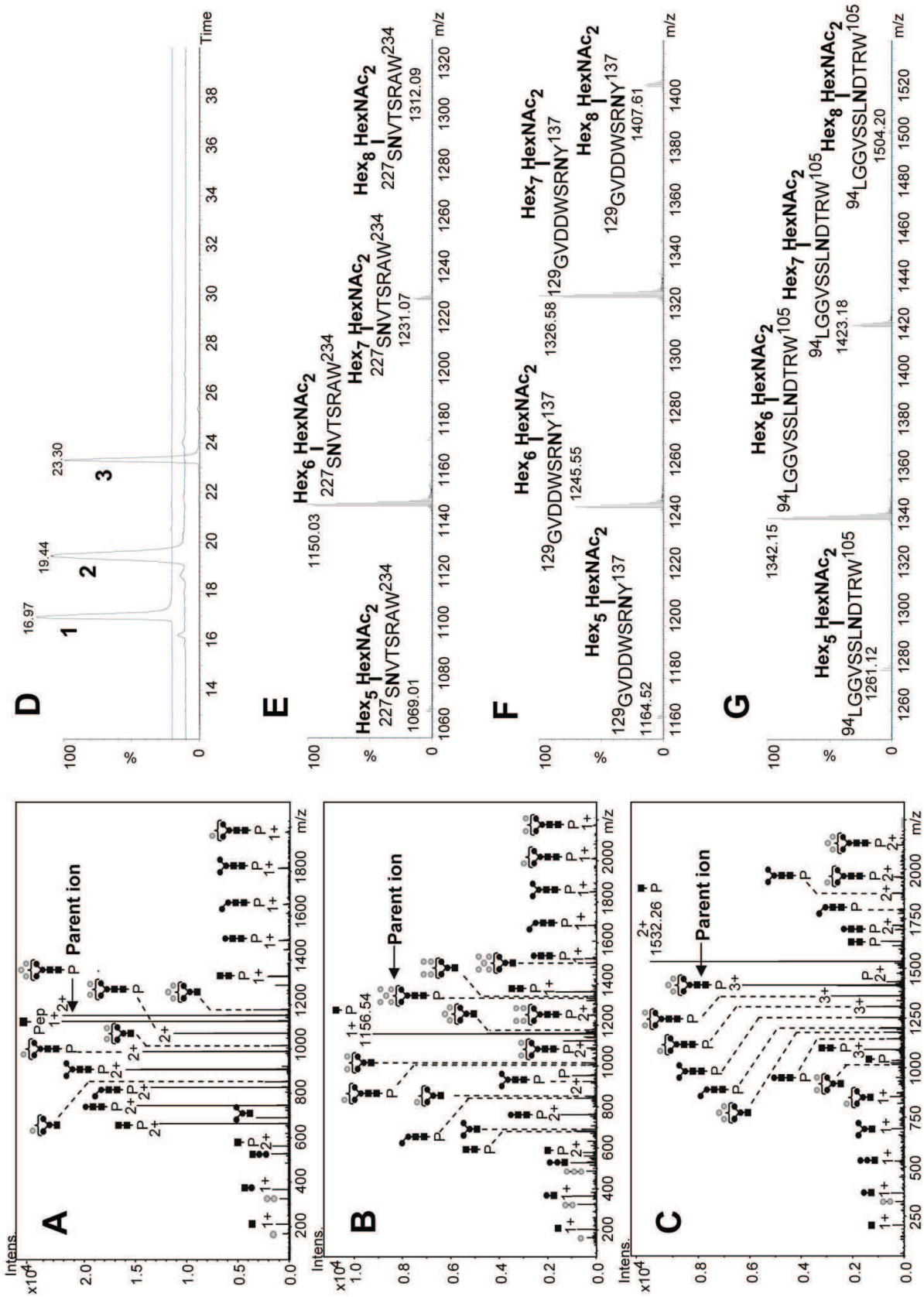

A
Parent ion
Intens.
m/z
B
Parent ion
1156.54
C
Parent ion
1532.26
D
16.97
19.44
23.30
1
2
3
Time
E
Hex6 HexNAc2
227SNVTSRAW234
1150.03
Hex5 HexNAc2
227SNVTSRAW234
1069.01
Hex7 HexNAc2
227SNVTSRAW234
1231.07
Hex8 HexNAc2
227SNVTSRAW234
1312.09
F
Hex6 HexNAc2
129GVDDWSRNY137
1326.58
Hex5 HexNAc2
129GVDDWSRNY137
1245.55
Hex7 HexNAc2
129GVDDWSRNY137
1407.61
Hex8 HexNAc2
129GVDDWSRNY137
1164.52
G
Hex6 HexNAc2
94LGGVSSLNDTRW105
1342.15
Hex5 HexNAc2
94LGGVSSLNDTRW105
1261.12
Hex7 HexNAc2
94LGGVSSLNDTRW105
1423.18
Hex8 HexNAc2
94LGGVSSLNDTRW105
1504.20

FIGURE 4

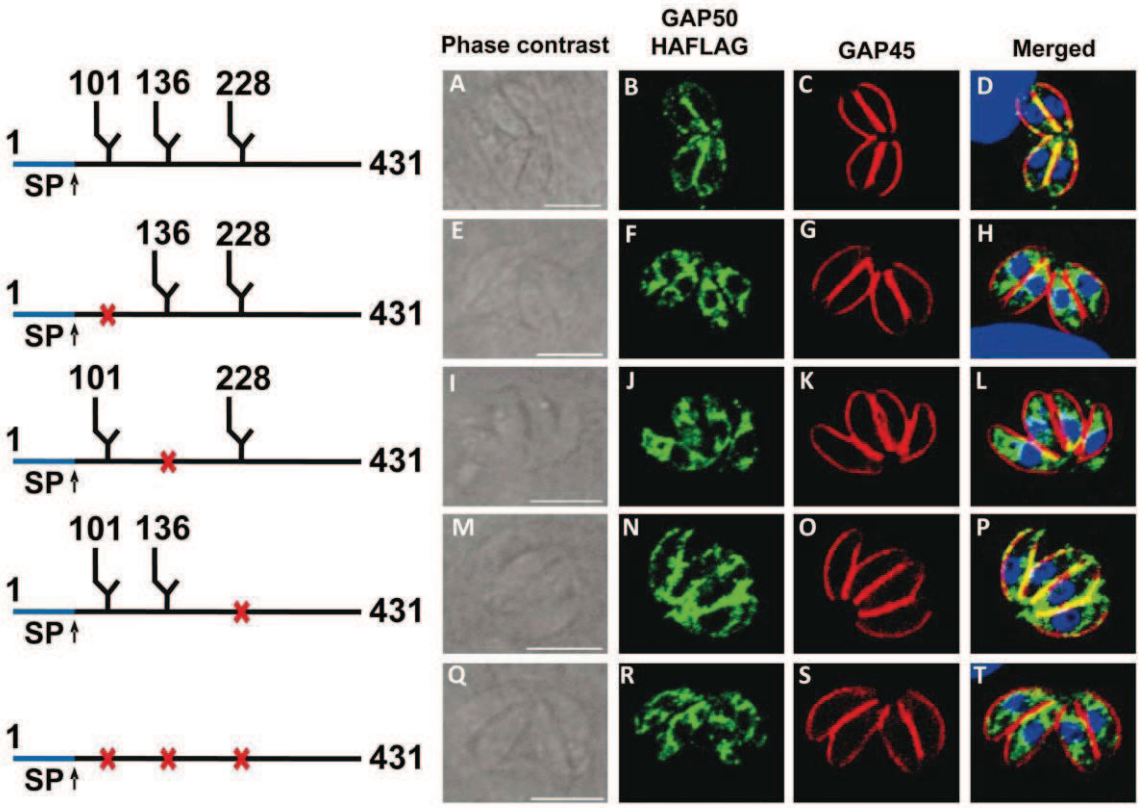


FIGURE 5

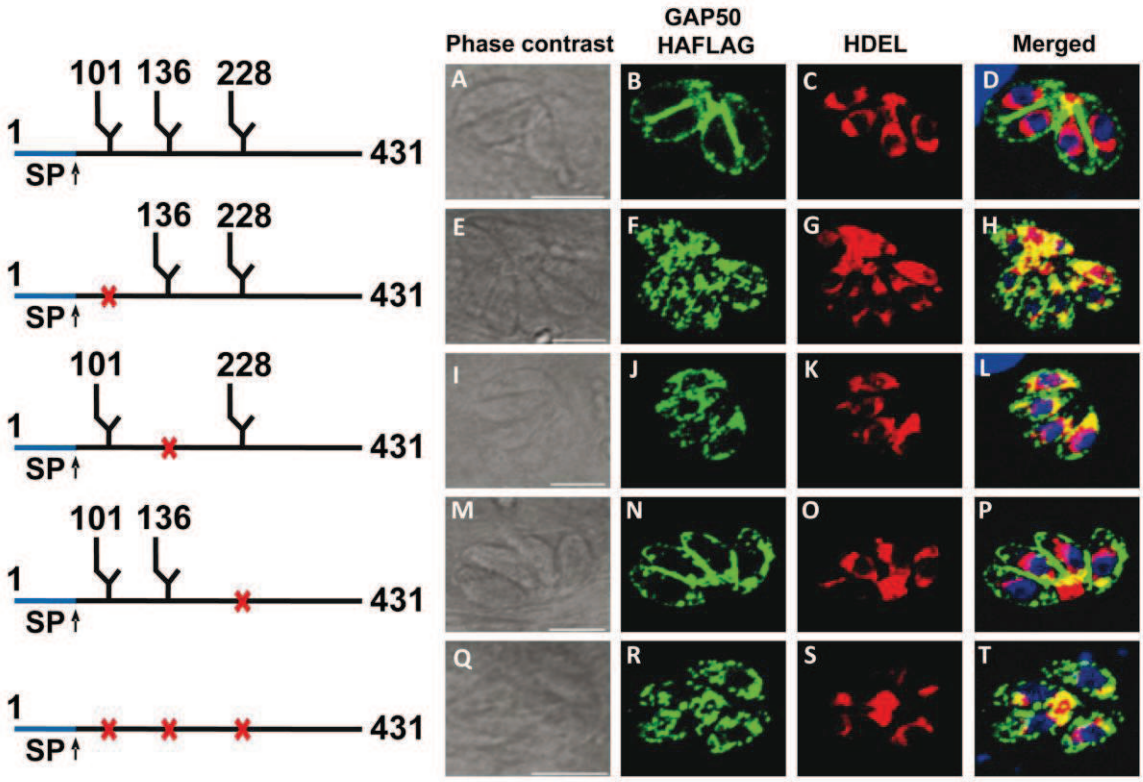


FIGURE 6

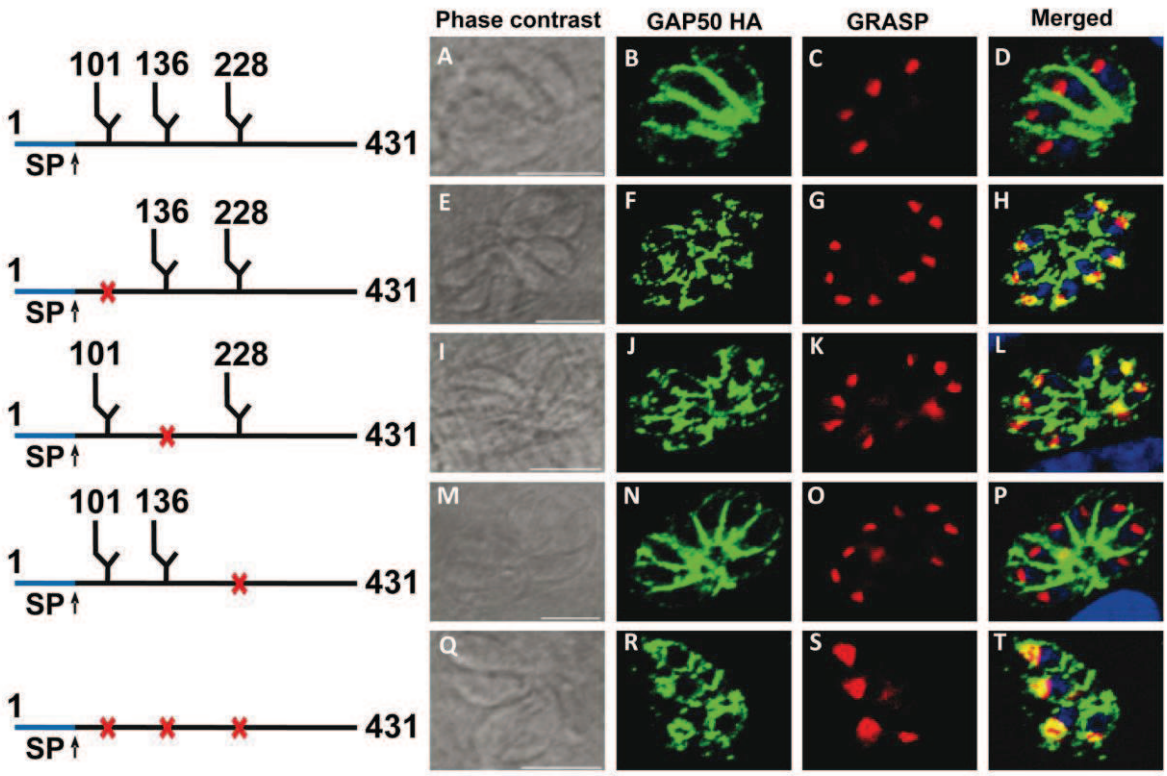

Phase contrast
GAP50 HA
GRASP
Merged
101 136 228
1
SP
431
136 228
101 228
101 136
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T

FIGURE 7

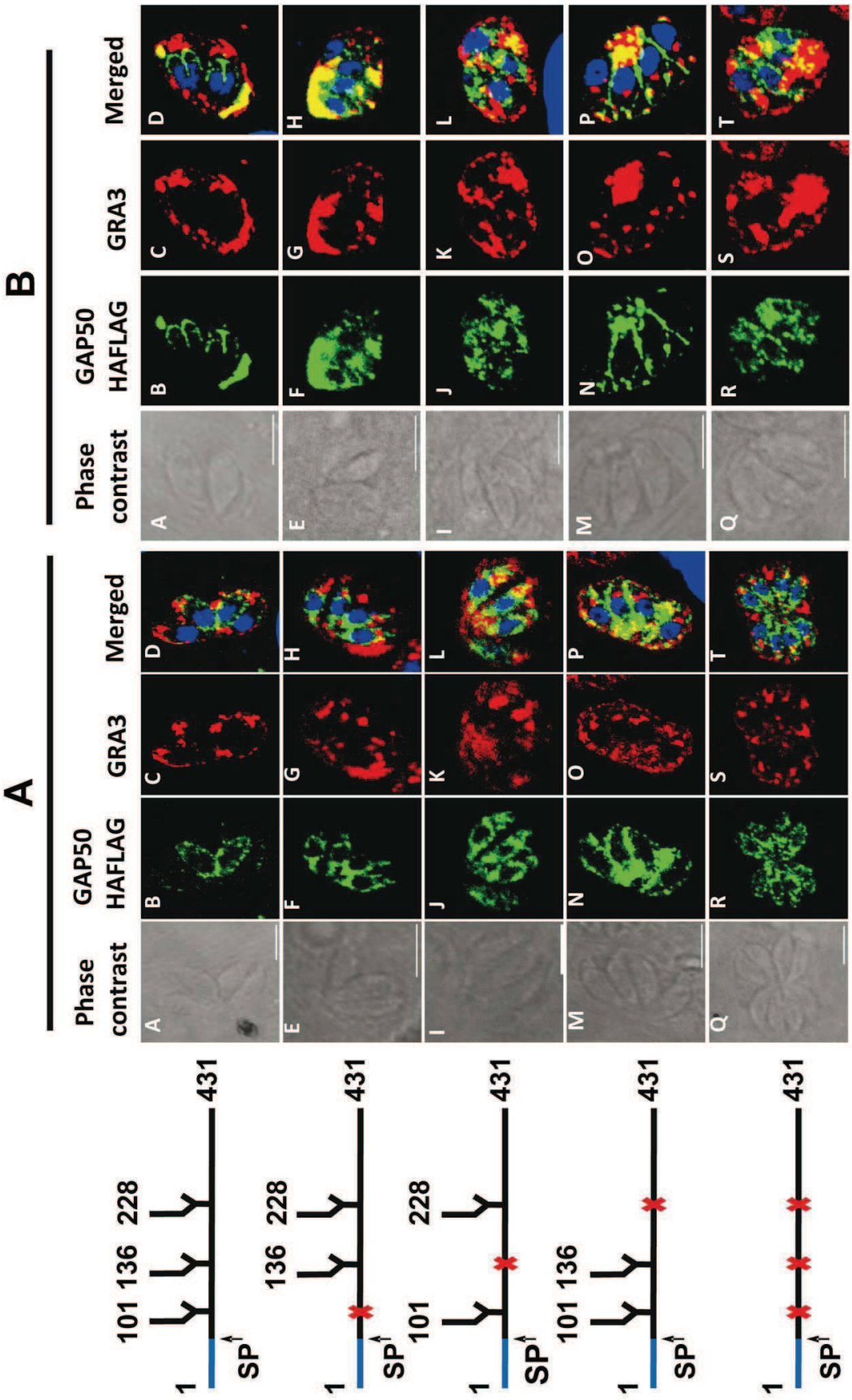

A
B
Phase contrast
GAP50 HAFLAG
GRA3
Merged
101 136 228
136 228
101
101 136
1
SP
431

FIGURE 8

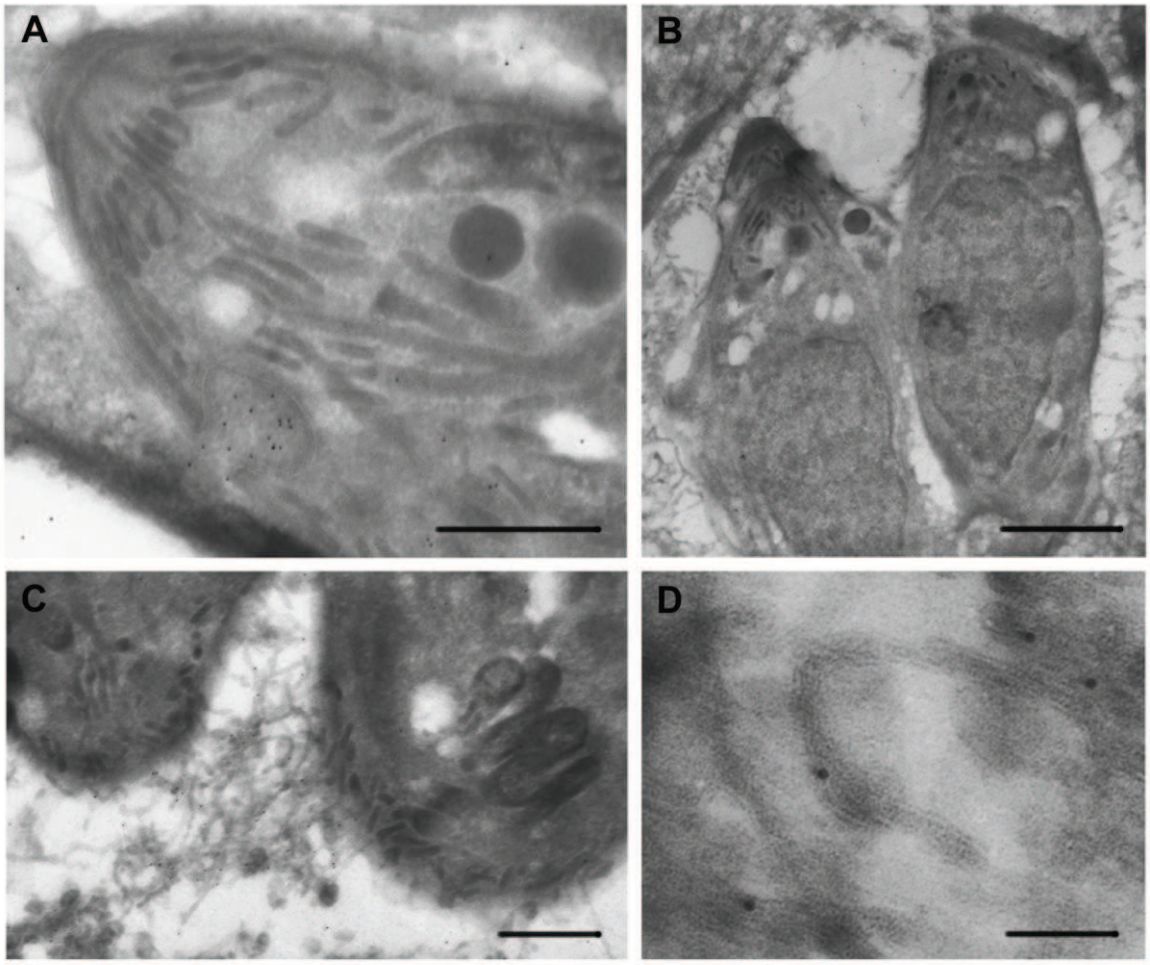


FIGURE 9

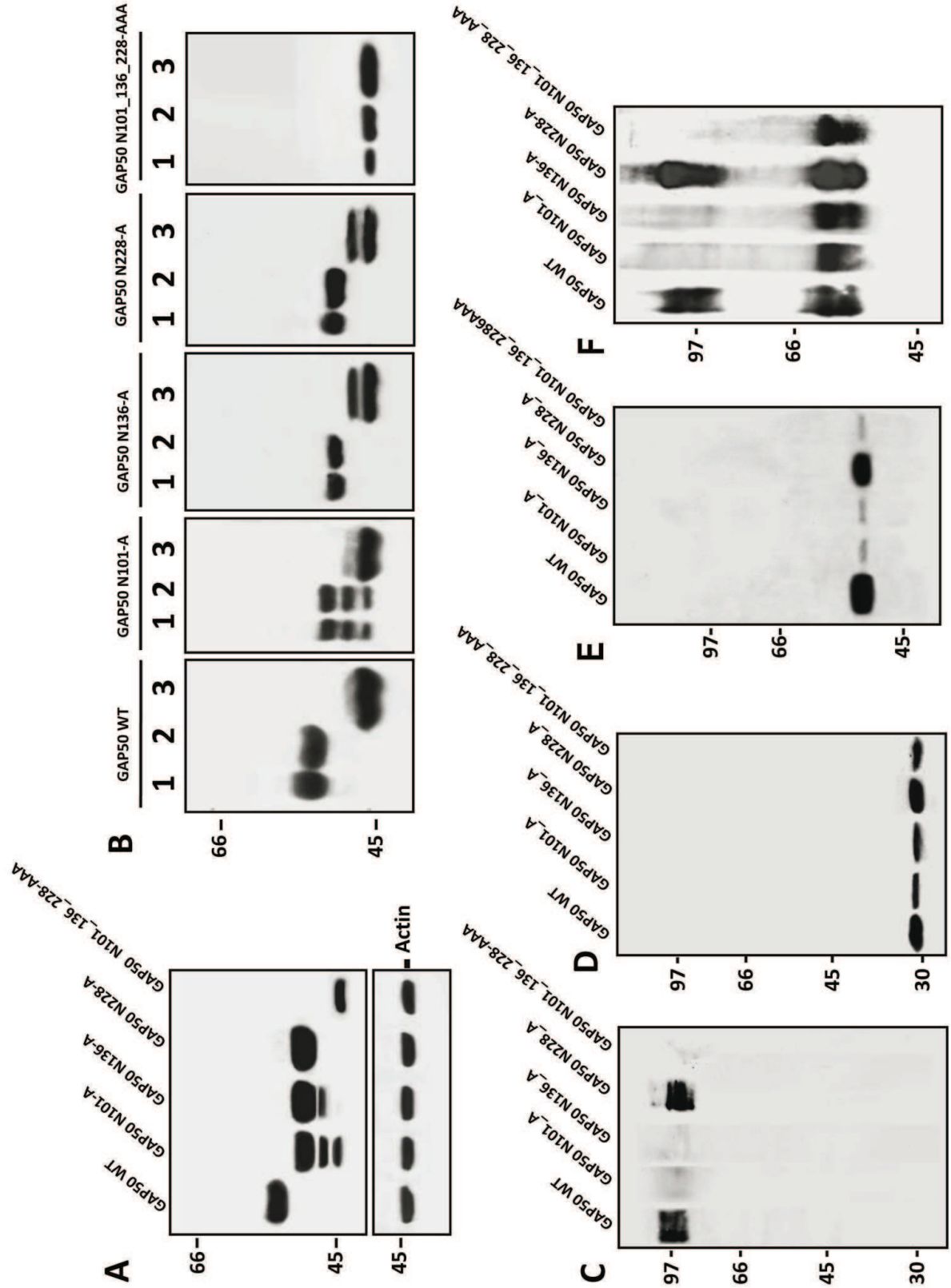

A
GAP50 WT
GAP50 N101-A
GAP50 N136-A
GAP50 N228-A
GAP50 N101_136_228-AAA
Actin
66
45
B
GAP50 WT
GAP50 N101-A
GAP50 N136-A
GAP50 N228-A
GAP50 N101_136_228-AAA
1 2 3
66
45
C
GAP50 WT
GAP50 N101_A
GAP50 N136_A
GAP50 N228_A
GAP50 N101_136_228-AAA
97
66
45
30
D
GAP50 WT
GAP50 N101_A
GAP50 N136_A
GAP50 N228_A
GAP50 N101_136_228_AAA
97
66
45
30
E
GAP50 WT
GAP50 N101_A
GAP50 N136_A
GAP50 N228_A
GAP50 N101_136_2286AAA
97
66
45
F
GAP50 WT
GAP50 N101_A
GAP50 N136-A
GAP50 N228-A
GAP50 N101_136_228_AAA
97
66
45

FIGURE 10

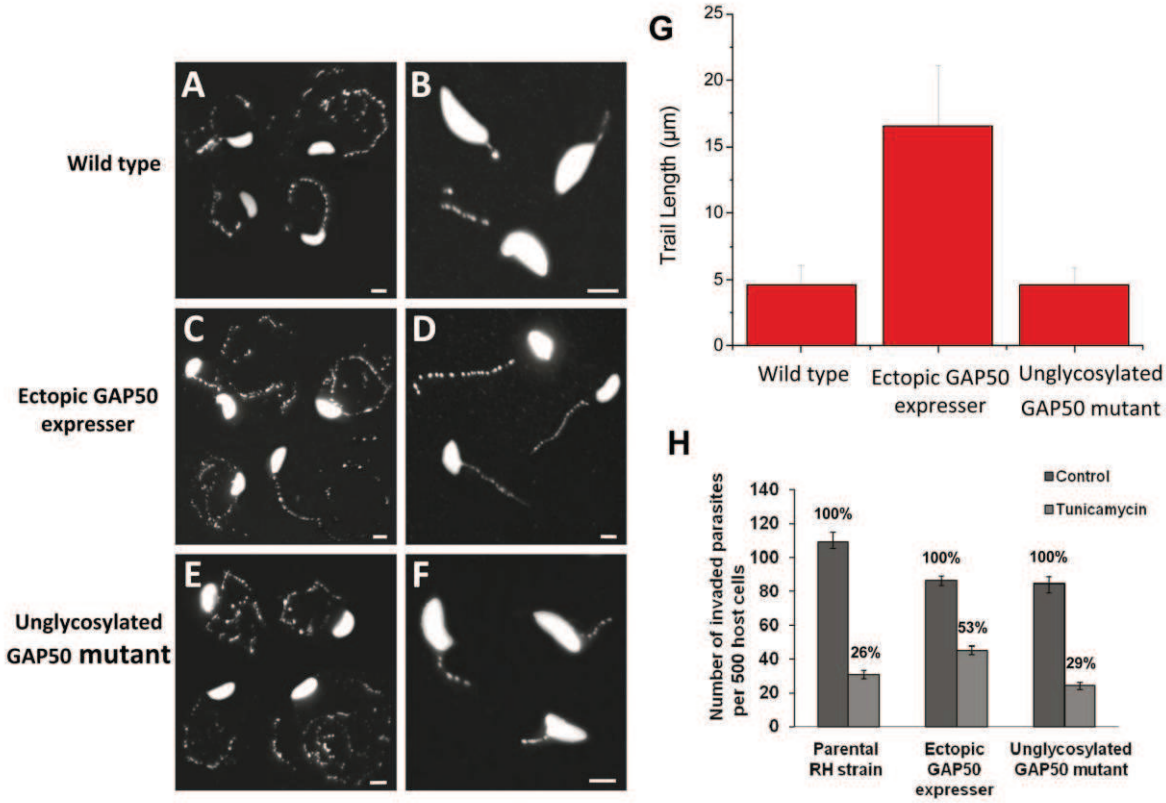

A
B
C
D
E
F
Wild type
Ectopic GAP50 expresser
Unglycosylated GAP50 mutant
G
Trail Length (µm)
25
20
15
10
5
0
Wild type
Ectopic GAP50 expresser
Unglycosylated GAP50 mutant
H
Number of invaded parasites per 500 host cells
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
Tunicamycin
100%
26%
100%
53%
100%
29%
Parental RH strain
Ectopic GAP50 expresser
Unglycosylated GAP50 mutant

FIGURE 11

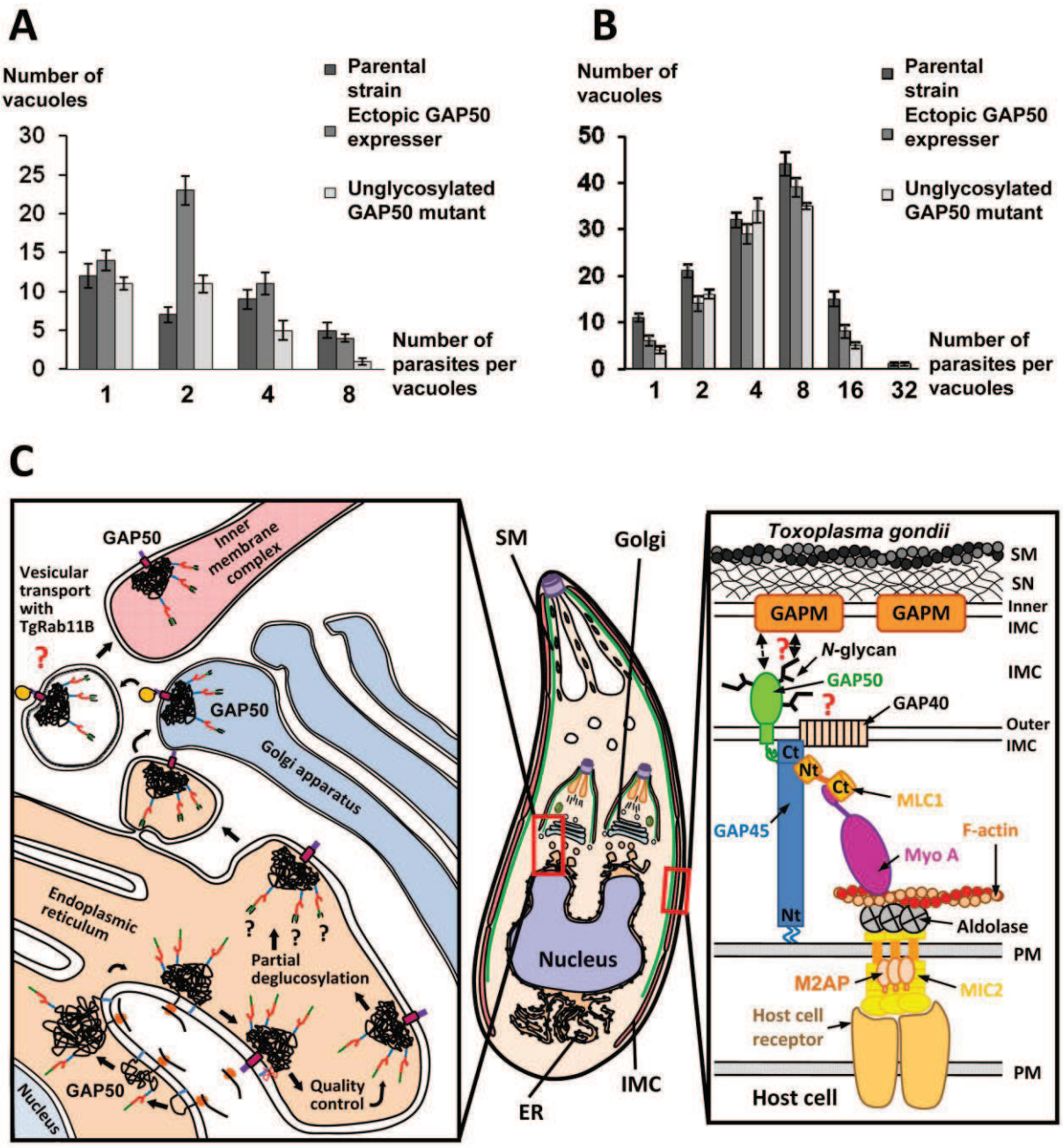

A
Number of vacuoles
30
25
20
15
10
5
0
1
2
4
8
Number of parasites per vacuoles
Parental strain
Ectopic GAP50 expresser
Unglycosylated GAP50 mutant
B
Number of vacuoles
50
40
30
20
10
0
1
2
4
8
16
32
Number of parasites per vacuoles
Parental strain
Ectopic GAP50 expresser
Unglycosylated GAP50 mutant
C
GAP50
Inner membrane complex
Vesicular transport with TgRab11B
?
GAP50
Golgi apparatus
Endoplasmic reticulum
? ? ?
Partial deglucosylation
GAP50
Quality control
Nucleus
SM
Golgi
Nucleus
IMC
ER
Toxoplasma gondii
SM
SN
GAPM
GAPM
Inner IMC
?
N-glycan
GAP50
IMC
?
GAP40
Outer IMC
Ct
Nt
Ct
MLC1
GAP45
F-actin
Myo A
Nt
Aldolase
PM
M2AP
MIC2
Host cell receptor
PM
Host cell

TABLE 1

Protein name and function	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage sequence coverage
Glideosome and regulatory proteins				
Actin (2)	gi|1703160	41 891	10	39%
Actin depolymerizing factor, putative (3)	gi|221481151	12 930	4	48%
Gliding-associated protein 45, GAP45 (1)	gi|30840677	27 316	3	18%
Membrane anchor for myosin XIV precursor, GAP50 (1)	gi|46948064	46 590	24	63%
Myosin A, putative (3)	gi|221483418	93 319	50	66%
Myosin light chain TgMLC1 (1)	gi|16580144	24 107	11	81%
Calmodulin, putative (3)	gi|221482357	15 260	6	60%
Glideosome multiprotein complex				
Actin (2)	gi|1703160	41 891	14	51%
Gliding-associated protein 45, GAP45 (1)	gi|30840677	27 316	5	22%
Membrane anchor for myosin XIV precursor, GAP50 (1)	gi|46948064	46 590	16	45%
Myosin A, putative (3)	gi|221483418	93 319	60	79%
Myosin light chain TgMLC1 (1)	gi|16580144	24 107	9	69%
Glycolytic enzymes and energy production				
Enolase, putative (3)	gi|221488030	52 097	8	32%
Fructose-1,6-bisphosphatase (1)	gi|21715907	42 380	5	18%
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (1)	gi|13377044	36 610	21	83%
Hexokinase, putative (3)	gi|221481497	51 449	2	5%
Lactate dehydrogenase (1)	gi|1695772	35 530	10	47%
Phosphofructokinase, putative (4)	gi|237834103	131 345	9	12%
Unknown funtions				
Conserved hypothetical protein (3) (4) TGME49_020950	gi|221480609	47 891	7	24%
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_097430	gi|221481610	25 319	3	24%
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_063990	gi|221481747	15 388	1	10%
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_023040	gi|221482543	27 420	8	37%
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_090700	gi|221484266	34 457	5	38%
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_049850	gi|221484942	43 063	7	28%
Conserved hypothetical protein (4) TGME49_089970	gi|221505714	24 471	1	38%
Hypothetical protein TGGT1_086640 (3) TGME49_110420	gi|221487358	13 827	2	26%
Hypothetical protein TGME49_115610 (5)	gi|221487835	15 953	3	24%
Hypothetical protein TGME49_026380 (5)	gi|221486515	42 594	2	6%
Hypothetical protein TGME49_034380 (5)	gi|221483485	39 419	2	8%
Hypothetical protein TGME49_035160 (5)	gi|221483442	155 745	3	4%
Hypothetical protein TGME49_037180 (5)	gi|221483286	29 138	3	20%
Hypothetical protein TGME49_045450 (5)	gi|221485494	15 362	2	37%
Hypothetical protein TGME49_063080 (5)	gi|221481659	14 390	3	40%
Hypothetical protein TGME49_114080 (5)	gi|221487699	20 748	2	13%

1 Toxoplasma gondii
2 Toxoplasma gondii RH
3 Toxoplasma gondii GT1
4 Toxoplasma gondii VEG
5 Toxoplasma gondii ME49

TABLE 2

Protein name and function	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	*N*-glycosylated GAP50		Unglycosylated GAP50		Number of potential *N*-glycosylation site	Number of transmembrane domaine
			Number of unique peptides / Percentage sequence coverage		Number of unique peptides / Percentage sequence coverage			
Glideosome and regulatory proteins								
Actin	gi|1703160	41 891	3	12%				
Actin depolymerizing factor, putative (3)	gi|221481151	12 904	2	21%				
Gliding-associated protein 45, GAP45 (1)	gi|30840677	27 316	2	13%				
Membrane anchor for myosin XIV precursor, GAP50 (1)	gi|46948064	46 590	18	47%	11	36%	3	1
Myosin A, putative (3)	gi|221483418	93 319	34	56%	11	15%		
Myosin light chain TgMLC1 (1)	gi|16580144	24 107	8	65%	2	11%		
Glideosome multiprotein complex								
Actin	gi|1703160	41 891	7	24%	8	27%		
Gliding-associated protein 45, GAP45 (1)	gi|30840677	27 316	3	20%				
Membrane anchor for myosin XIV precursor, GAP50 (1)	gi|46948064	46 590	11	37%	8	26%	3	1
Myosin A, putative (3)	gi|221483418	93 319	51	73%	15	22%		
Myosin light chain TgMLC1 (1)	gi|16580144	24 107	4	25%				
Unknown funtions								
Conserved hypothetical protein (3) (4) TGME49_020950	gi|221480609	47 891	4	11%	5	12%	2	1
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_058060	gi|221487120	23 334	2	10%				
Hypothetical protein, conserved (5) TGME49_049850	gi|221484942	43 063	2	8%			1	9

1 Toxoplasma gondii
2 Toxoplasma gondii RH
3 Toxoplasma gondii GT1
4 Toxoplasma gondii VEG
5 Toxoplasma gondii ME49

FIGURE S1

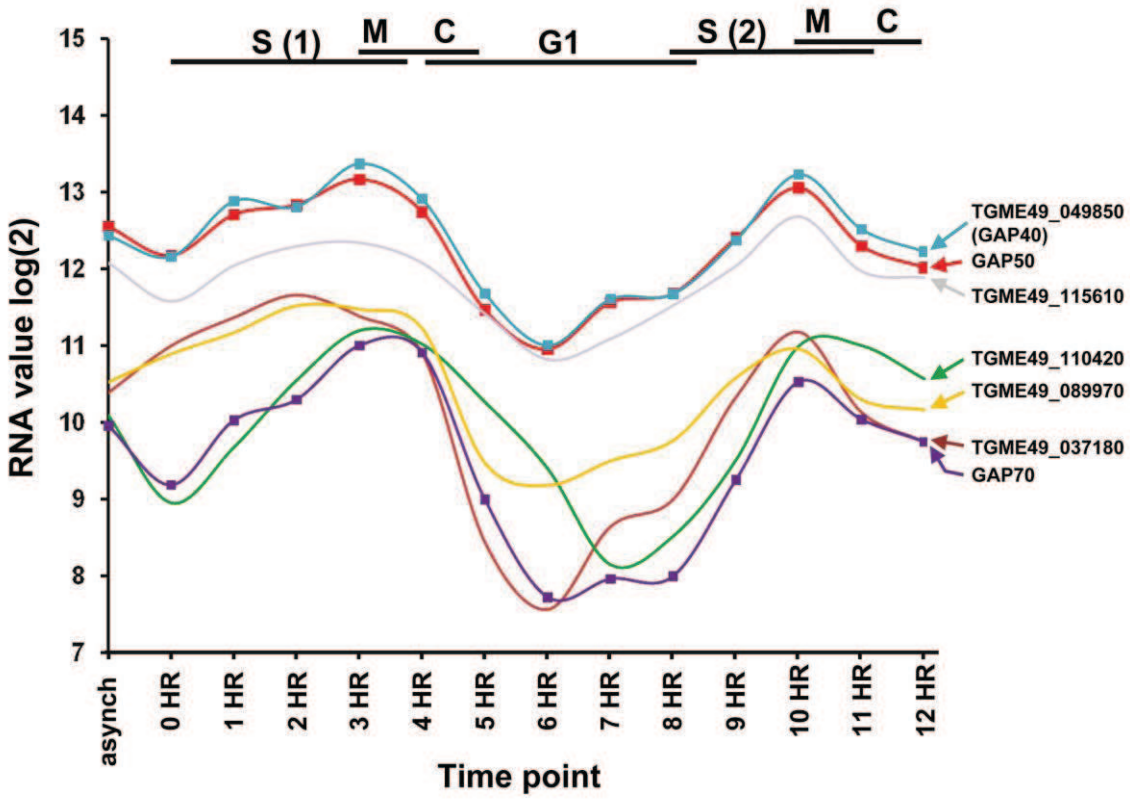


FIGURE S2

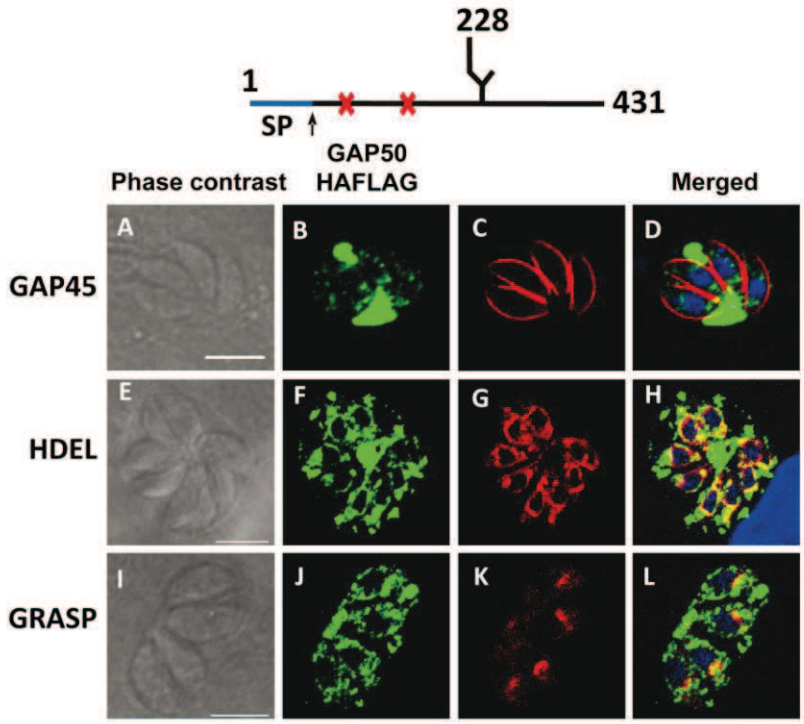


FIGURE S3

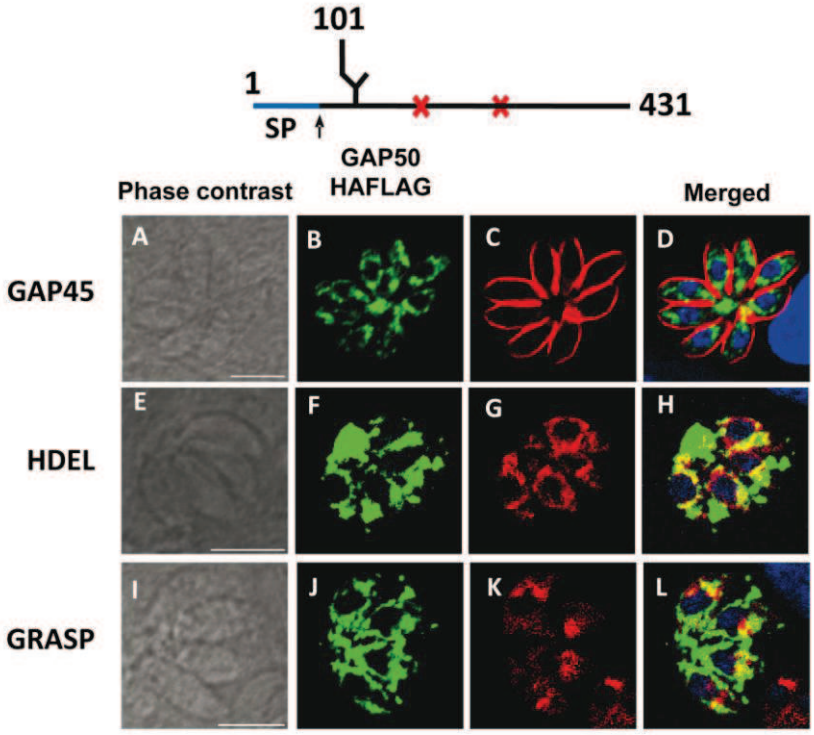


FIGURE S4

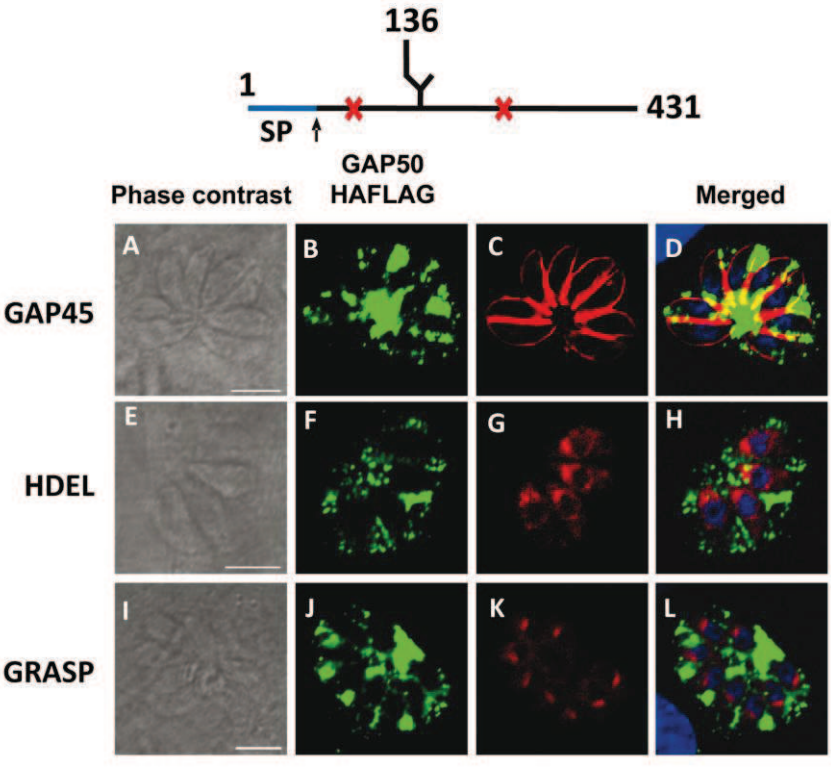


FIGURE S5

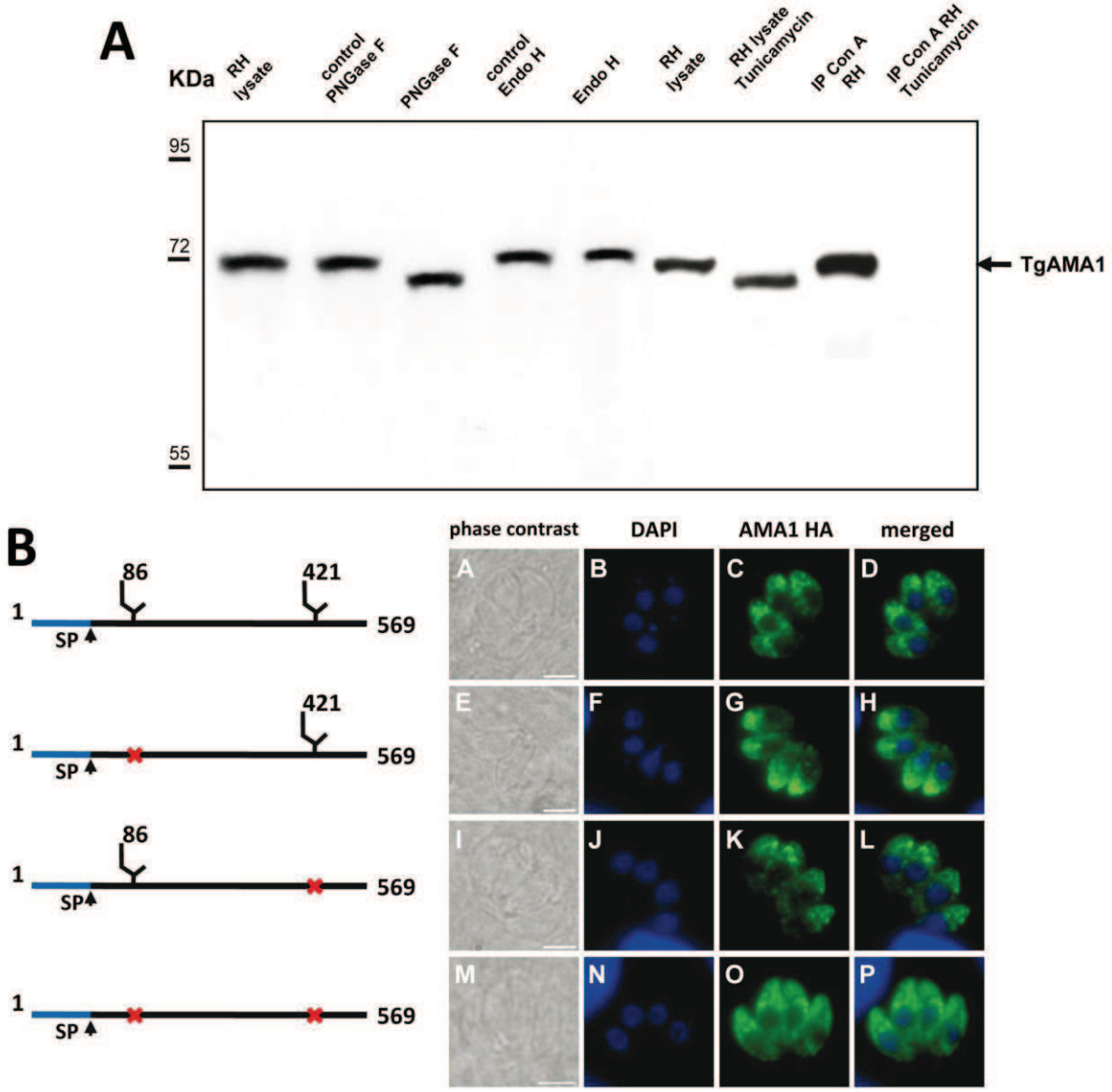
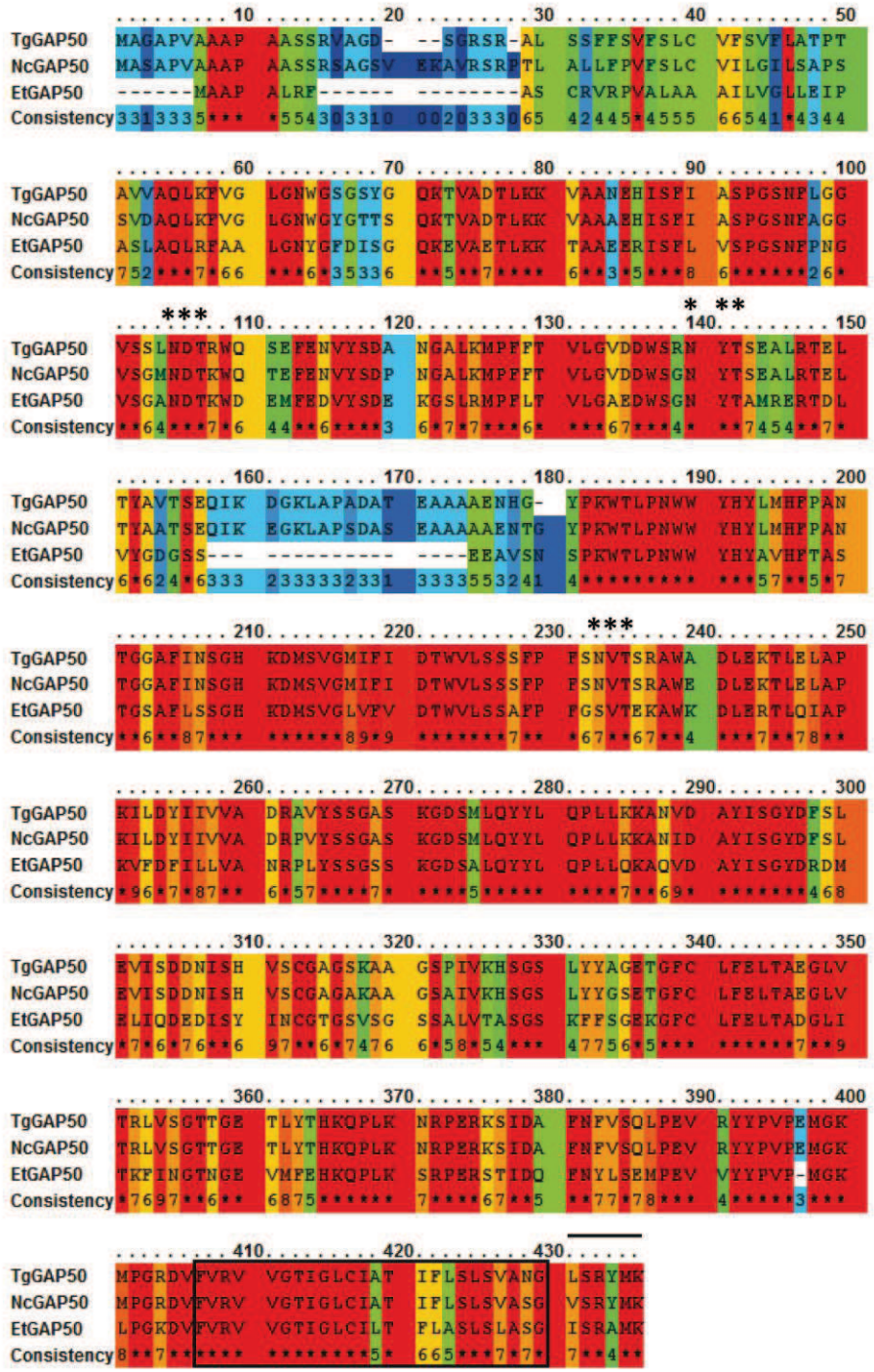

A
KDa
RH lysate
control PNGase F
PNGase F
control Endo H
Endo H
RH lysate
RH lysate Tunicamycin
IP Con A RH
IP Con A RH Tunicamycin
95
72
55
TgAMA1
B
1
86
421
569
SP
phase contrast
DAPI
AMA1 HA
merged
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P

FIGURE S6



The conservation scoring is performed by PRALINE. The scoring scheme works from 0 for the least conserved alignment position, up to 10 for the most conserved alignment position.
The colour assignments are:

Unconserved 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

TABLE S1

Protein name and function	Orthologues in other Apicomplexa			
Unknown funtions	*P. falciparum*	*N. caninum*	*C. parvum*	*E. tenella*
Conserved hypothetical protein (3) (4) TGME49_020950	MAL13P1.237	NCLIV_004730	x	x
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_097430	x	NCLIV_006470	x	x
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_063990	x	NCLIV_024070	x	x
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_023040	PF11_0440	NCLIV_006060	x	dev_EIMER_contig_00031688 - eimer-3758d05.q1ka
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_090700	x	NCLIV_042680	x	x
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_049850	PFE0785c	NCLIV_065970	cgd7_550	dev_EIMER_contig_00021052 - eimer-584f08.p1k
Conserved hypothetical protein (4) TGME49_089970	x	NCLIV_042330	cgd7_1110	eimer-2804e04.p1k
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_058060	PFI1330c	NCLIV_028310	x	x
Hypothetical protein TGGT1_086640 (3) TGME49_110420	x	NCLIV_054500	x	eimer-4397a04.q1k
Hypothetical protein TGME49_115610 (5)	PCHAS_020880 (*P. chabaudi*)	NCLIV_058300	cgd1_1660	eimer-3477c10.p1k
Hypothetical protein TGME49_026380 (5)	x	NCLIV_046580	x	x
Hypothetical protein TGME49_034380 (5)	x	NCLIV_049520	x	x
Hypothetical protein TGME49_035160 (5)	x	NCLIV_049740	x	dev_EIMER_contig_00020463 - eimer-3230e01.p1k
Hypothetical protein TGME49_037180 (5)	PY05250 PY00147 PY00773 PY00779 (*P. yoelii*)	NCLIV_051040	Chro.40237 (*C. hominis*)	dev_EIMER_contig_00010077 - eimer-3823h06.p1k
Hypothetical protein TGME49_045450 (5)	PFF0980w	NCLIV_062710	x	dev_EIMER_contig_00004666 - eimer-1713g06.q1k
Hypothetical protein TGME49_063080 (5)	x	NCLIV_024830	x	dev_EIMER_contig_00021183 - eimer-4539k19.p1k
Hypothetical protein TGME49_114080 (5)	x	NCLIV_057260	x	x

1 Toxoplasma gondii

2 Toxoplasma gondii RH

3 Toxoplasma gondii GT1

4 Toxoplasma gondii VEG

5 Toxoplasma gondii ME49

TABLE S2

Protein name and function	Protein accession numbers	Protein molecular weight (Da)	Number of unique peptides	Percentage sequence coverage	Number of potential *N*-glycosylation site	Number of transmembrane domaine
Glideosome and regulatory proteins						
Actin (2)	gi|1703160	41 891	10	39%		
Actin depolymerizing factor, putative (3)	gi|221481151	12 930	4	48%		
Gliding-associated protein 45, GAP45 (1)	gi|30840677	27 316	3	18%		
Membrane anchor for myosin XIV precursor, GAP50 (1)	gi|46948064	46 590	24	63%	3	1
Myosin A, putative (3)	gi|221483418	93 319	50	66%		
Myosin light chain TgMLC1 (1)	gi|16580144	24 107	11	81%		
Calmodulin, putative (3)	gi|221482357	15 260	6	60%		
Glideosome multiprotein complex						
Actin (2)	gi|1703160	41 891	14	51%		
Gliding-associated protein 45, GAP45 (1)	gi|30840677	27 316	5	22%		
Membrane anchor for myosin XIV precursor, GAP50 (1)	gi|46948064	46 590	16	45%	3	1
Myosin A, putative (3)	gi|221483418	93 319	60	79%		
Myosin light chain TgMLC1 (1)	gi|16580144	24 107	9	69%		
Glycolytic enzymes and energy production						
Enolase, putative (3)	gi|221488030	52 097	8	32%		
Fructose-1,6-bisphosphatase (1)	gi|21715907	42 380	5	18%		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (1)	gi|13377044	36 610	21	83%		
Hexokinase, putative (3)	gi|221481497	51 449	2	5%		
Lactate dehydrogenase (1)	gi|1695772	35 530	10	47%		
Phosphofructokinase, putative (4)	gi|237834103	131 345	9	12%		
Unknown funtions						
Conserved hypothetical protein (3) (4) TGME49_020950	gi|221480609	47 891	7	24%	2	1
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_097430	gi|221481610	25 319	3	24%	1	x
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_063990	gi|221481747	15 388	1	10%	1	x
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_023040	gi|221482543	27 420	8	37%	1	x
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_090700	gi|221484266	34 457	5	38%	2	2
Conserved hypothetical protein (3) TGME49_049850	gi|221484942	43 063	7	28%	1	9
Conserved hypothetical protein (4) TGME49_089970	gi|221505714	24 471	1	38%	1	x
Hypothetical protein TGGT1_086640 (3) TGME49_110420	gi|221487358	13 827	2	26%	x	x
Hypothetical protein TGME49_115610 (5)	gi|221487835	15 953	3	24%	x	x
Hypothetical protein TGME49_026380 (5)	gi|221486515	42 594	2	6%	x	1
Hypothetical protein TGME49_034380 (5)	gi|221483485	39 419	2	8%	1	x
Hypothetical protein TGME49_035160 (5)	gi|221483442	155 745	3	4%	2	x
Hypothetical protein TGME49_037180 (5)	gi|221483286	29 138	3	20%	x	x
Hypothetical protein TGME49_045450 (5)	gi|221485494	15 362	2	37%	x	x
Hypothetical protein TGME49_063080 (5)	gi|221481659	14 390	3	40%	1	x
Hypothetical protein TGME49_114080 (5)	gi|221487699	20 748	2	13%	x	x

1 Toxoplasma gondii

2 Toxoplasma gondii RH

3 Toxoplasma gondii GT1

4 Toxoplasma gondii VEG

5 Toxoplasma gondii ME49

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La *N*-glycosylation est une modification ubiquitaire dans le monde du vivant mais chez les Apicomplexes, il a été décrit que la machinerie nécessaire à la biosynthèse des *N*-glycannes ne serait présente que chez quelques espèces telles que *Neospora caninum*, *Cryptosporidium parvum* et *Toxoplasma gondii*. Grâce au séquençage des génomes de ces parasites, les gènes orthologues *alg* codant les enzymes impliquées dans la synthèse des *N*-glycannes chez *S. cerevisiae* et l'homme ont été identifiés. Les protéines ALGs sont impliquées dans la synthèse des structures *N*-glycanniques dans le réticulum endoplasmique. Chez d'autres Protistes, comme les Kinetoplastidae (*Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, Leishmania major* et *Leishmania mexicana*), *Tetrahymena thermophila, Dictyostelium discoideum* et *Giardia lamblia,* des analyses bioinformatiques similaires avaient identifiées des structures *N*-glycanniques putatives en accord avec les structures obtenues après des analyses biochimiques.

Il apparaît qu'au cours de leur évolution, les Apicomplexes auraient divergé de l'ancêtre commun par la perte d'une ou plusieurs enzymes ALGs impliquées dans la synthèse des *N*-glycannes. Ainsi, les structures *N*-glycanniques formées par les Apicomplexes sont très diverses, allant de structures type complexe chez certains Trypanosomatidae, à la structure la plus simple chez *Giardia lamblia* et *Plasmodium falciparum* ($GlcNAc_2$). De même, les complexes oligosaccharyl transférasiques ont évolué en parallèle de la perte de certaines enzymes ALGs. Cependant, il est à souligner que chez *T. brucei*, il existe trois sous-unités oligosaccharyl transférasiques qui fonctionnent en monomère et qui semblent transférer chacune des structures *N*-glycanniques différentes les unes des autres. De même, le contrôle qualité de la conformation des *N*-glycoprotéines et leur dégradation par la voie ERAD ont disparu au fur et à mesure que ces Eucaryotes ont perdu les enzymes ALGs.

Chez *T. gondii*, le récent séquençage du génome et son annotation a permis d'établir que ce parasite ne possède pas certaines enzymes ALGs impliquées dans l'ajout de mannose sur le *N*-glycanne à l'intérieur du réticulum endoplasmique (ALG3, ALG9 et ALG12). Chez la levure *S. cerevisiae*, la suppression de l'expression de ces enzymes conduit à la rétention de structures oligosaccharidiques tronquées, $Man_5GlcNAc_2$ pour ALG3, $Man_6GlcNAc_2$ pour ALG9 et $Man_7GlcNAc_2$ pour ALG12. Ces structures sont transférées sur les protéines dans le réticulum endoplasmique, ce qui n'entraine pas de défaut de croissance des levures. Ces données indiquent également que *T. gondii* pourrait synthétiser des *N*-glycannes en l'absence de ces trois enzymes. Les gènes codant les enzymes ALGs présentent au niveau de la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique sont retrouvées dans le génome du parasite, de même que celles permettant de glucosyler et de déglucosyler le *N*-glycanne avant et après son transfert sur la protéine, respectivement (ALG6, ALG8,

ALG10). Pour le moment, aucun homologue de la protéine RFT1, qui permet la translocation du *N*-glycanne formé à l'extérieur du réticulum endoplasmique vers la lumière du réticulum endoplasmique, n'a été identifié chez *T. gondii*.

Nos résultats préliminaires ont permis de montrer que les gènes putatifs ALG sont transcrits chez les deux stades parasitaires tachyzoïte et bradyzoïte. L'étude différentielle de l'expression de ces gènes a démontré qu'il existe une régulation transcriptionnelle de ces gènes puisque tous les messagers prédits sont retrouvés chez le tachyzoïte et qu'un nombre plus réduit de ces messagers sont seulement présents au stade bradyzoïte. Il a été montré que STT3 (Shams-Eldin *et al*., 2005), une des sous-unités du complexe oligosaccharyl transférasique, et ALG7 (Garénaux *et al.*, 2008), la première enzyme de la voie de synthèse des *N*-glycannes, sont capables de complémenter la levure *Saccharomyces cerevisiae* déficiente en Stt3p et Alg7p.

Depuis de nombreuses années, plusieurs études ont tenté de caractériser la glycosylation chez *T. gondii*. En effet, des études antérieures ont suggéré la présence de *N*-glycannes sur la protéine parasitaire de surface P23, et sur la protéine du glidéosome TgGAP50 (Odenthal-Schnittler *et al*., 1993 ; Gaskins *et al*., 2004). Il semblerait également que la plupart des protéines présentes dans la voie de sécrétion du parasite, à partir des organites situés au niveau de l'apex (rhoptries, micronèmes et granules denses), soient modifiées par une *O*-glycosylation de type mucine (Stwora-Wojczyk *et al.*, 2004).

Afin de déterminer les structures *N*-glycanniques et d'approfondir leurs fonctions biologiques chez *T. gondii*, nous avons isolé les *N*-glycannes totaux d'un lysat parasitaire et analysé par spectrométrie de masse les structures de ces oligosaccharides. Les structures majeures, oligomannosidiques, et les structures mineures, paucimannosidiques, obtenus sont en corrélation avec les structures *N*-glycanniques que le parasite pourrait théoriquement synthétiser en fonction des analyses bioinformatiques et génomiques. De plus, aucune modification terminale (présence de galactose ou d'acide sialique) n'a été identifiée. La présence de fucose sur le GlcNAc lié à l'asparagine de la protéine n'a pas été révélée jusqu' à présent, ce qui est en accord avec l'absence probable d'enzymes impliquées dans la maturation des *N*-glycoprotéines au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Ces structures oligo et paucimannosidiques sont rarement présentes sur les *N*-glycoprotéines matures des Eucaryotes supérieurs, où l'on retrouve essentiellement des structures *N*-glycanniques de type complexe ou hybride. En revanche, chez les Protistes, il existe des preuves que des structures tronquées de ce type ($Man_5GlcNAc_2$, $Man_6GlcNAc_2$) sont transférées par des complexes oligosaccharyl transférasiques particuliers sur des protéines. Cependant, nous avons obtenu ces résultats à partir d'extraits protéiques totaux et nous ne pouvons pas ainsi exclure la présence d'autres structures *N*-glycanniques mineures avec des modifications et

des branchements plus complexes. De plus, des travaux récents ont révélé que *T. gondii* est capable de détourner des *N*-glycannes de la cellule hôte et on pourrait imaginer que si des structures *N*-glycanniques plus complexes existent, il est probable qu'elles proviennent de la cellule hôte avec un mécanisme de détournement qu'il reste néanmoins à démontrer (Garénaux *et al*., 2008).

Nous sommes parvenus, par l'utilisation de lectines reconnaissant les résidus d'α-mannoses et d'α-glucoses, à mettre en évidence la présence plausible de protéines *N*-glycosylées intra-parasitaires. Le choix de ces lectines s'est basé sur l'absence d'identification dans le génome de *T. gondii* de gènes codant des enzymes impliquées dans la maturation des *N*-glycannes dans l'appareil de Golgi, ainsi que sur les résultats de glycomiques à la base de cette étude. Les lectines Concanavaline A et Pisum Sativum Agglutinin ont été utilisées pour visualiser les *N*-glycoprotéines sur des parasites extracellulaires au stade tachyzoïte et bradyzoïte. Ces deux lectines ont permis de visualiser un signal diffus dans le cytoplasme des deux stades avec quelques granulations péri-nucléaires, suggérant la présence de structures oligosaccharidiques dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Aucun marquage intense n'est significativement observé au niveau de la membrane plasmique des deux stades parasitaires, ce qui indique que la *N*-glycosylation supposée sur l'antigène de surface P23 serait marginale. En se basant sur les études antérieures (de Carvalho *et al*., 1991), nous nous attendions également à une présence de glycoprotéines dans les organites situé à l'apex du parasite et plus particulièrement dans les rhoptries. De manière inattendue, les signaux de fluorescence des deux lectines ne reconnaissent que marginalement les rhoptries, même si la colocalisation de TgRON1 avec la lectine ConA apparait significative. De même, les images de colocalisation par microscopie confocale n'ont pas révélé la présence de *N*-glycoprotéines au niveau des micronèmes et des granules denses.

La fluorescence ponctuelle et diffuse chez les bradyzoïtes est également surprenante, puisque ceci suggère que la forme dormante de *T. gondii* est capable d'exprimer des *N*-glycoprotéines. Malgré cela, nous ne pouvons pas déterminer si ces *N*-glycoprotéines proviennent de la synthèse *de novo* de protéines par les bradyzoïtes jeunes ou tardifs, ou si elles proviennent des tachyzoïtes avant la différenciation en bradyzoïtes. La première hypothèse semble peu probable car lors de nos expériences de RT-PCR comparative, nous avons observé qu'un certain nombre de gènes *alg* ne sont pas exprimés chez le bradyzoïte.

L'absence de colocalisation entre la Con A et les protéines TgGAP45, TgMLC1 et TgMyoA, marquant la face externe du complexe membranaire interne est également curieuse. En effet, il a été démontré que TgGAP50, localisée dans le complexe membranaire interne est une *N*-glycoprotéine avec probablement trois *N*-glycannes de type riche en mannose. Une des explications seraient que les *N*-glycannes portés par TgGAP50 seraient peut être impliquées dans des interactions protéines-

protéines ou protéines-*N*-glycannes, empêchant la reconnaissance de ces structures oligosaccharidiques par la lectine.

Par ces études de localisation en immunofluorescence, aucune information exploitable quant à l'identification précise de nouvelles *N*-glycoprotéines dans les organites spécifiques des Apicomplexa n'a pu être établie. L'étape suivante de notre étude a été de purifier des protéines parasitaires reconnues par la lectine Con A, par chromatographie d'affinité, afin de les identifier par spectrométrie de masse et Western blots. Différentes chromatographies d'affinités préliminaires ont permis de vérifier que l'interaction entre la lectine et les protéines parasitaires est spécifique. En effet, nous avons démontré la spécificité de la colonne ConA par différentes pré-incubations (tests d'inhibitions de la fixation) avec un monosaccharide dérivé du mannose, l'α-méthylmannoside. La séparation de ces protéines purifiées sur gel d'acrylamide a révélé de nombreuses bandes avec des poids moléculaires compris entre 45 et plus de 100 kDa. Les protéines comprises dans cette gamme de poids moléculaires sont essentiellement des protéines de rhoptries et de micronèmes. Aucune protéine n'est observée en coloration au bleu de Coomassie dans des poids moléculaires inférieurs, correspondant aux tailles des protéines de surface et de granules denses, c'est-à-dire 40 kDa. Un total de 13 bandes a été isolé d'une préparation à plus grande échelle, afin d'identifier par spectrométrie de masse ces protéines. De ces analyses, plusieurs groupes de protéines ont pu être défini, contenant des protéines qui n'avaient jamais été suspecté par le passé comme portant potentiellement des *N*-glycannes. La nature de ces protéines est en accord avec les masses moléculaires des protéines visibles sur le grand gel colorée au bleu de Coomassie. La majeure partie de ces protéines identifiées, et possédant un ou plusieurs sites putatifs de *N*-glycosylation est impliquée dans différents processus biologique comme l'invasion (TgAMA1 et TgRON2), la motilité (TgGAP50, TgMyoA et TgAct), le trafic intracellulaire (Tgsortiline et un homologue de PfSec61), des protéines de rhoptries (TgROP7, TgROP18 et TgRON1), une protéine de granule dense (TgGRA8), l'architecture morphologique du parasite (Tgβ-tubuline, TgIMC2A) et la division parasitaire (TgMyoB/C). D'autres protéines ne possédant pas de sites putatifs de *N*-glycosylation ont également été identifiées, comme des protéines de rhoptries (TgROP5 et TgROP2), une protéine de micronèmes (TgMIC1) et une protéine du glidéosome (TgGAP45). Trois protéines hypothétiques n'ayant aucune homologie de fonctions avec des protéines connues ont également été identifiées dans ces immunoprécipitations. Les conditions de lyse des parasites dans lesquelles nous avons travaillé (lyse douce en Triton X100 1%) ont probablement permis de purifier des complexes protéiques stables contenant conjointement des protéines non-glycosylées qui sont en association avec des *N*-glycoprotéines qui ont servi d'appât pour leur fixation sur la lectine. En d'autres termes, ces protéines sont certainement associées en complexe à au moins une des *N*-glycoprotéines que nous

avons identifiés. Cependant, TgMIC1 a été décrite comme une lectine qui se lie aux acides sialiques de la cellule hôte, et il n'est pas exclu que cette protéine ainsi que d'autres reconnaissent les structures *N*-glycanniques présentes sur la lectine Con A. D'autres protéines, probablement contaminantes, ont été identifiées. Il s'agit de protéines HSPs et de facteurs nucléaires qui sont connus pour se coller de manière aspécifique sur le genre de colonne de chromatographie d'affinité que nous avons utilisés et nous avons montré par Western blots que l'actine représentant un exemple de protéine contaminante qui se fixe de manière non-spécifique car le traitement des parasites par la tunicamycine ne change pas son association avec la lectine.

Toutefois, nos analyses protéomiques et glycomiques ont permis d'identifier un *N*-glycopeptide provenant de la protéine du glidéosome, TgGAP50, sur laquelle deux types de structures *N*-glycanniques ont été misent en évidence. Deux structures différentes de type $Man_7GlcNAc_2$ et $Man_8GlcNAc_2$ ont été identifiée. Ces dernières données nous ont permis d'identifier pour la première fois chez *T. gondii* une structure *N*-glycannique sur une protéine intra-parasitaire, ce qui a fait l'objet de notre premier article (Fauquenoy *et al*., 2008). Une autre équipe américaine a par ailleurs obtenus et publiés de manière indépendante la même observation, sur la présence fortement probable de structures *N*-glycanniques de type riche en mannose sur TgGAP50 (Luk *et al*., 2008).

Il est admis que le glidéosome est formé dans les parasites filles en deux étapes. La première étape consiste à amener TgGAP50 dans le complexe membranaire interne lors de sa formation, vraisemblablement par transport de vésicules golgiennes. La seconde étape permet d'amener les autres composants, le proto-glidéosome (TgGAP45, TgMLC1 et TgMyoA), vers le complexe membranaire interne durant les étapes tardives de l'endodyogénie. Les interactions entre les différents constituants du proto-glidéosome et TgGAP50 ne sont pas encore complètement définies. Toutefois, un récent article paru lors de la rédaction de ma thèse a apporté des informations pertinentes et précises sur l'interaction entre les domaines ou extrémités de TgGAP45 qui s'associe avec TgMLC1 (Frénal *et al.*, 2010). De plus, la myristoylation et palmitoylation semblent jouer un rôle important dans l'insertion membranaire de TgGAP45 entre le complexe membranaire interne et la membrane plasmique (Frénal *et al*., 2010). Nous avions également spéculé que la présence de *N*-glycannes sur TgGAP50 ou d'autres membres du glidéosome pourrait avoir des implications dans les mécanismes de trafic et/ou de transport de ces protéines vers le complexe membranaire interne, et moduler leurs interactions avec les différents partenaires.

Deux protéines connues de la jonction mobile ont été également identifiées par cette méthode de purification, TgAMA1 et TgRON2. Les deux protéines possèdent des sites putatifs de *N*-glycosylation, et aucune étude n'avait encore démontré ce type de modification sur ces deux protéines. Nous n'avons pas pu confirmer la présence de *N*-glycannes sur ces deux protéines par

Western blots probablement à cause des faibles quantités purifiées par la colonne d'affinité ConA. En effet, un seul peptide a été identifié pour TgRON2. En revanche, lors de nos expériences ultérieures, nous avons déterminé que TgAMA1 est bien *N*-glycosylée. Des analyses plus complètes et détaillées sur TgRON2 seraient nécessaires pour établir la présence de *N*-glycosylation sur cette protéine des rhoptries.

La tunicamycine est une drogue qui cible directement l'enzyme ALG7 et l'inhibe (Barnes *et al*., 1984). Aucune étude publiée par le passé portant sur la *N*-glycosylation chez *T. gondii*, n'avait auparavant utilisé cette drogue. En revanche, des études menées chez *P. falciparum* avaient déjà déterminé son rôle dans la mort des parasites (Udeinya et Van Dyke, 1981 ; Wright *et al*., 1991 ; Kimura *et al*., 1996). Cependant, l'effet létal de cette drogue ne semble pas être dû à une inhibition de la synthèse des *N*-glycannes chez *P. falciparum* (Kimura *et al*., 2000 ; Naik *et al*., 2001).

Les résultats que nous avons obtenus en traitant *T. gondii* par la tunicamycine sont assez intriguant, en comparaison avec le même type d'études menées chez les Eucaryotes. Ce n'est qu'au bout du second cycle d'invasion que les effets de la drogue sont observés. De plus, les effets sont bien plus prononcés lors du troisième cycle d'invasion. Ces effets sont principalement des forts retards de croissance, une diminution voire une inhibition totale de la motilité et de l'invasion. Nous ne pouvons pas exclure un effet au niveau de l'attachement initial, puisqu'aucun test permettant de confirmer ceci n'a été effectué. Cependant, une seule protéine intervenant au niveau de l'attachement initial, TgMIC1, a été identifiée par nos expériences de chromatographie d'affinité Con A, ce qui suggère une importance marginale de la *N*-glycosylation dans l'attachement initial du parasite à la cellule hôte. Ces effets sur le second et troisième cycle d'invasion sont également visibles lorsque qu'un seul traitement initial durant les premières 48 h est effectué, suggérant un effet délétère retardé à long terme. Même si la tunicamycine est connue pour inhiber également la synthèse protéique globale, la présence en faible quantité de parasites intracellulaires au bout du second et du troisième cycle d'invasion conforte nos suppositions que cette drogue inhibe principalement chez *T. gondii* la synthèse des *N*-glycoprotéines. Ces résultats sont parfaitement en accord avec les groupes de *N*-glycoprotéines que nous avons identifiés et caractérisés chez le parasite. La motilité fait intervenir des protéines présentes dans le glidéosome, que nous avons identifiées, l'invasion fait intervenir des protéines présentes dans la jonction mobile, que nous avons également identifiées. Malgré cela, l'effet de la tunicamycine sur la mise en place de la jonction mobile reste à démontrer. En revanche, en ce qui concerne la diminution de la croissance des parasites, nous n'avons identifié que très peu de protéines impliquées dans ce processus biologique et il nous a semblé que le retard de croissance est probablement dû à l'inhibition de la synthèse protéique globale des protéines par la tunicamycine.

En observant par immunofluorescence la morphologie des organites spécifiques des Apicomplexa, et de compartiments subcellulaires impliqués dans l'invasion et la motilité, nous avons également noté des défauts dans la structure des rhoptries et du complexe membranaire. Une autre étude menée en parallèle par un groupe américain a également observé des altérations morphologiques au niveau des rhoptries, mais également au niveau des granules denses et du réticulum endoplasmique (Luk *et al*., 2008). Au niveau des effets de la tunicamycine sur le réticulum endoplasmique, cette distorsion observée est connue chez les Eucaryotes supérieurs. Tout ceci suggère que les *N*-glycoprotéines de rhoptries que nous avons identifiées (TgROP7 et TgROP18) pourraient avoir un rôle dans la maintenance de la morphologie de cet organite. L'implication de ces deux protéines dans l'immunité de l'hôte infecté contre le parasite a cependant déjà été démontrée, mais une double fonction n'est pas à exclure (Frickel *et al*., 2008 ; Saeij *et al*., 2006). La seule *N*-glycoprotéine que nous avons identifiée dans le complexe membranaire interne est TgGAP50, et aucune étude antérieure n'a démontré l'implication de cette protéine dans le maintien ou la mise en place du complexe membranaire interne. Cet aspect difforme du complexe membranaire interne visible par immunofluorescence avec l'anticorps αMLC1 pourrait être dû au défaut de *N*-glycosylation sur TgGAP50.

Cependant, les images de microscopie électronique de parasites traités 96 h par la tunicamycine n'ont pas montré de défaut dans la morphologie du complexe membranaire interne (Luk *et al*., 2008). De même les images d'immunofluorescence de cette étude permettant de visualiser la protéine TgGAP50 chez les parasites traités 96 h par la tunicamycine, démontre une délocalisation de cette protéine vers le cytoplasme du parasite. Nos images d'immunofluorescence semblent identiques avec TgMLC1. Aucune étude n'a démontré que TgMLC1 est ancré dans le complexe membranaire interne, en revanche TgGAP50 permet d'ancrer le glidéosome dans le complexe membranaire interne, et donc TgMLC1 associée à TgMyoA (Johnson *et al*., 2007). Ceci permet de supposer que la délocalisation de TgMLC1 n'est pas due à un défaut dans la morphologie du complexe membranaire interne, mais plutôt à une délocalisation de TgGAP50 qui entraine une délocalisation importante du reste du glidéosome et donc en aval un défaut dans la motilité et l'invasion. Cette interprétation confirme un rôle primordial déjà défini, de TgGAP50 dans l'ancrage du glidéosome au niveau de la membrane externe du complexe membranaire interne.

Nous avons également caractérisé les effets de la tunicamycine au niveau moléculaire, en démontrant que des protéines parasitaires potentiellement *N*-glycosylées, comme TgRON1 ou TgMyoA, sont incapables de se fixer à la colonne de chromatographie d'affinité ConA lorsque les parasites sont traités par la tunicamycine. L'absence de rétention de TgMyoA provenant de lysats de parasites traités par la tunicamycine, sur la colonne d'affinité ConA est assez intrigante. TgMyoA ne possède pas de peptide signal ni de segment transmembranaire suggérant son passage dans la

lumière du réticulum endoplasmique afin d'être glycosylée. De ce fait, il semble que TgMyoA ne se lie pas directement à la colonne d'affinité ConA, mais plutôt par un intermédiaire du glidéosome *N*-glycosylé, comme TgGAP50.

Nous avons également montré que TgRON1, une protéine de rhoptries dont la fonction est encore inconnue, se fixe sur la lectine Con A et est donc potentiellement *N*-glycosylées. Il est admis que le trafic de ces protéines de rhoptries se fait via le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, le réseau trans-golgien au niveau des endosomes précoces et tardifs, les pré-rhoptries puis les rhoptries. Aucune étude n'a démontré l'adressage d'une protéine de rhoptries directement vers les organites matures sans passer par cet appareil sécrétoire, de plus TgRON1 possède un peptide signal. Ces données pourraient suggérer que la *N*-glycosylation potentielle de TgRON1 interviendrait dans son trafic intracellulaire vers les rhoptries. En traitant les parasites à la tunicamycine, cette protéine ne se fixe plus sur la colonne d'affinité Con A, confortant ainsi la présence potentielle de *N*-glycanne sur TgRON1. TgRON1 possède également un domaine « sushi » qui est un sous-domaine du « complement control protein domain » (CCP). Le domaine CCP est impliqué dans des interactions protéine-protéine et protéine-ligand. TgRON1 n'a pas été identifié dans la jonction mobile, mais chez *P. falciparum* le domaine « sushi » de la protéine PfASP (Apical Sushi Protein) semble jouer un rôle dans l'invasion des érythrocytes (O'Keeffe *et al*., 2005). TgRON1 possède également un site d'ancrage GPI, comme d'autres protéines de rhoptries, suggérant une association avec les membranes. Les *N*-glycannes de TgRON1 pourraient interagir avec les *N*-glycannes de TgRON2 dans les rhoptries, afin de stabiliser le complexe TgRON2/TgRON4/TgRON5/TgRON8 dans le cou de l'organite avant qu'il ne soit sécrété lors de l'invasion, ou même d'intervenir dans la sécrétion du complexe. Cependant, tout comme TgMyoA, il n'est pas exclu que cette protéine ne soit pas *N*-glycosylée, puisqu'aucune différence de migration électrophorétique significative n'est observée en Western blots malgré la présence dans la séquence peptidique de TgRON1 de 10 sites putatifs de *N*-glycosylation. La fixation de TgRON1 sur la colonne d'affinité Con A proviendrait de ce fait d'une interaction probable avec un autre partenaire *N*-glycosylé.

En conclusion, la première partie de ma thèse nous avons apporté des preuves formelles que la *N*-glycosylation est un mécanisme biologique bien présent et développé chez *T. gondii*. De même nous avons défini certains rôles possibles de cette modification dans des processus biologiques bien particulier, insoupçonné par le passé, tels que la motilité et la réplication parasitaire.

Dans la seconde partie de la thèse, nous avons étudié l'importance de cette modification dans des processus biologiques tels que la croissance intracellulaire, la motilité et l'invasion. Parmi les *N*-glycoprotéines identifiées, TgGAP50, qui est localisée dans le complexe membranaire interne, est impliquée dans la motilité parasitaire qui est un élément déterminant dans l'entrée de la cellule hôte par le parasite. L'invasion, quant à elle fait intervenir la jonction mobile, dont TgAMA1 et TgRON2 font partie. Ces deux protéines ont été également identifiées dans nos expériences de chromatographie d'affinité Con A. TgAMA1 possède un site putatif classique de *N*-glycosylation, ainsi qu'un second site potentiel particulier avec l'acide aminé situé en aval de l'asparagine qui est une proline, ce qui ne respecte pas la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, où X ne doit pas être une proline. TgRON1 possède quant à elle 10 sites de *N*-glycosylation. La méthode que nous souhaitions mettre en place au laboratoire afin d'étudier les fonctions des *N*-glycannes de certaines de ces *N*-glycoprotéines putatives, était de remplacer par mutagenèse dirigée les résidus d'asparagines contenus dans les séquences N-X-S/T par des résidus d'alanines, pour que les *N*-glycannes ne puissent plus être ajouté sur les protéines. Le choix de TgAMA1 s'est basé sur la présence d'un seul site putatif et d'un second non-conventionnel. De plus, les protéines AMA1 des Apicomplexa sont très étudiées et sont à la base de nombreuses études visant à mettre en place une stratégie vaccinale. La connaissance de la *N*-glycosylation de cette protéine permettrait d'apporter des informations supplémentaires sur son pouvoir antigénique. Nous avons donc décidé de concentrer nos efforts sur les fonctions des *N*-glycannes portées par TgGAP50 et TgAMA1 déterminer la position des *N*-glycannes sur TgGAP50 dans le but d'attribuer à chaque structure N-glycanniques une fonctions potentiellement spécifique.

TgGAP50 est une *N*-glycoprotéine qui est ancrée dans le complexe membranaire interne (Johnson *et al.*, 2007 ; Luk *et al*., 2008). Cette protéine permet de faire le lien entre le glidéosome et le cytosquelette du parasite lors de la motilité et de l'invasion. La seconde partie des travaux de cette thèse ont permis de caractériser le rôle des *N*-glycannes de TgGAP50 dans le trafic et la localisation de la protéine ainsi que dans l'interaction de TgGAP50 avec les partenaires du glidéosome. Ces travaux démontrent pour la premières fois l'importance de la *N*-glycosylation dans le trafic d'une *N*-glycoprotéine chez les parasites Apicomplexa. Nous avons tout d'abord établi un rôle fonctionnel des *N*-glycannes de TgGAP50 dans le trafic de la protéine dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, avant d'être transporter vers le complexe membranaire interne. De plus, nous apportons des preuves que chaque site de *N*-glycosylation de TgGAP50 est occupé par différentes structures *N*-glycanniques composées de mannose et de glucose terminaux.

En éliminant la possibilité d'ajouter des *N*-glycannes sur chacune des asparagines potentiellement *N*-glycosylées, nous avons défini que seule les *N*-glycannes portés par les

asparagines 101 et 136 sont importants pour la localisation de la protéine dans le complexe membranaire interne. L'impossibilité d'ajouter le dernier *N*-glycanne putatif sur TgGAP50 ne change pas sa localisation correcte dans le complexe membranaire interne. Ces résultats permettent d'attribuer aux deux premiers *N*-glycannes, un rôle important dans le trafic de TgGAP50 vers le compartiment final ou complexe membranaire interne. La délocalisation totale observée de TgGAP50 N_101-A et TgGAP50 N_136-A conduit à une rétention dans les compartiments classiques du trafic intracellulaire du parasite, visible grâce à la colocalisation de ces protéines avec des souches exprimant de manière stable des marqueurs fluorescents du réticulum endoplasmique, HDEL, et de l'appareil de Golgi, GRASP. Cependant, ces deux versions mutées de TgGAP50 sont également localisées dans le cytoplasme sous la forme de granulation. Ces grains ne semblent pas colocaliser avec la protéine TgGRA3, marqueur des granules denses. La nature exacte de ces granulations n'a pas pu être définie.

Il est connu chez les Eucaryotes supérieurs que le défaut de conformation des *N*-glycoprotéines conduit à la dégradation des protéines par le protéasome, suite à leur agrégation dans le cytoplasme de la cellule. Cette étape finale de dégradation est précédée d'une première étape de dégradation du *N*-glycanne dans le réticulum endoplasmique par le système ERAD, qui permet d'éliminer les glucoses, les mannoses et les N-acétylglucosamine par l'action de glucosidases, de mannosidases et d'homologues de la PNGase F, respectivement. Chez *T. gondii*, des études bioinformatiques ont déterminé que la grande majorité de ces enzymes de dégradation sont absentes du génome du parasite (Banerjee *et al*., 2007). Seule la calnexine a été identifiée. Nous avons trouvé dans les données du séquençage et annotation du génome (www.toxodb.org), un homologue de ERp57. ERp57 est une protéine disulfide isomérase impliquée dans le contrôle qualité de la conformation des *N*-glycoprotéines chez les Eucaryotes supérieurs et la levure. Cependant, le domaine de liaison à une protéine disulfide isomérase n'est pas retrouvé dans la séquence de la calnexine de *T. gondii*. Malgré cela, une étude menée chez *Neospora caninum* a démontré que l'homologue de ERp57 est principalement impliqué dans les interactions avec la cellule hôte (Naguleswaran *et al*., 2007). Cependant, cette protéine est également localisée dans le réticulum endoplasmique, ce qui suggère une double fonction dont l'une serait le contrôle qualité des *N*-glycoprotéines. Malgré l'absence de démonstration *in vivo* de l'implication de cet homologue de ERp57 et de la calnexine dans le contrôle qualité de la conformation des *N*-glycoprotéines chez *T. gondii*, nous pouvons supposer qu'il pourrait exister un système de contrôle qualité et d'agrégation des *N*-glycoprotéines mal conformées chez le parasite. La présence de nombreuses granulations de TgGAP50 N_101-A et TgGAP50 N_136-A réparties dans tout le cytoplasme du parasite indique

probablement que les protéines ne sont pas dégradées mais stockées dans le cytoplasme sous forme d'agrégat.

Nous avons choisi de poursuivre nos études en utilisant un promoteur hétérologue fort déjà caractérisé chez *T. gondii*, *GRA1*. La localisation des différentes versions sauvage et mutées de TgGAP50 sous le contrôle de ce promoteur est conforme à celle observée lorsque ces protéines sont sous le contrôle du promoteur endogène *GAP50*. Nous avons remarqué que la surexpression des versions sauvage et simples mutées uniquement de TgGAP50, conduit à un export de ces protéines dans la vacuole parasitophore. L'utilisation préalable de ce promoteur dans d'autres études n'avait pas permis d'observer un tel phénomène (Jan *et al*., 2009 ; Braun *et al*., 2009). En revanche, la version triple mutée de TgGAP50 sous le contrôle du promoteur *GRA1* n'est pas exporté vers la vacuole parasitophore, ce qui indique que l'absence totale de *N*-glycannes sur TgGAP50 empêche cette sécrétion vers la vacuole parasitophore.

Des lignées parasitaires mutantes sur-exprimant de manière exogène et stable, chacune des versions sauvage et simples mutées de TgAGP50, ont été obtenues. En revanche, la surexpression de la version triple mutée de TgGAP50 semble être létale pour le parasite puisqu'après plusieurs tentatives, aucun clone parasitaire stable n'a été obtenu en utilisant le promoteur fort *GRA1*. En revanche, en utilisant le promoteur endogène *GAP50*, nous avons obtenu un clone parasitaire exprimant de manière stable la version triple mutée de TgGAP50. La localisation des différentes versions de TgGAP50 est identique aux parasites exprimant ces protéines de manière transitoire. De même, aucun impact sur la croissance et la motilité n'a été observée. Les images de microscopie électronique du parasite sur-exprimant TgGAP50 N_101-A-HAFLAG que nous avons obtenus permettent d'affirmer que la sur-expression de TgGAP50 conduit à une exportation de la protéine vers la vacuole parasitophore par le biais de la voie de sécrétion constitutive des granules denses. De même TgGAP50 sur-exprimé semble s'ancrer dans le réseau membranaire de la vacuole parasitophore mais pas dans la membrane de la vacuole parasitophore en contact avec le cytoplasme de la cellule hôte.

A partir de ces lignées parasitaires stables, nous avons ensuite déterminé qu'effectivement, chacun des sites putatifs de *N*-glycosylation de TgGAP50 est occupé. Nous avons observés en Western blots que la différence de migration électrophorétique entre la protéine sauvage et les différentes versions de TgGAP50 mutées sur une seule asparagine, est identique. Cette différence d'environ 2 kDa est en accord avec le poids moléculaire d'un seul *N*-glycanne. De plus, la déglycosylation des différentes versions de TgGAP50 conduit à une migration électrophorétique identique à celle de la version triple mutée de la protéine. La présence de bandes de poids

moléculaire inférieure suggère une dégradation des protéines TgGAP50 N_101-A et TgGAP50 N_136-AAA. La *N*-glycosylation joue un rôle important dans la stabilité des protéines, en ce qui concerne TgGAP50 cette fonction semble être assurée par les deux premiers *N*-glycannes. En associant ces résultats à ceux d'immunofluorescences indirectes, nous pouvons conclure que le troisième *N*-glycanne de TgGAP50 n'intervient ni dans la localisation de la protéine dans le complexe membranaire interne, ni dans la stabilité de la protéine. Son rôle exact n'a pas pu être déterminé au cours de ces travaux.

Ces lignées parasitaires stables nous ont également permis d'étudier l'impact de l'absence de *N*-glycannes sur les différentes asparagines de TgGAP50, dans les interactions avec les partenaires du glidéosome. Nous avons déterminé que lorsque la protéine est délocalisée du complexe membranaire interne vers le cytoplasme, les interactions avec TgGAP45 ne semblent pas compromises. En revanche, des quantités plus faibles de la protéine TgMLC1 ont été immunoprécipitées lorsque la protéine TgGAP50 est délocalisée. De même, une très forte diminution, voire une absence, de la protéine TgMyoA dans ces immunoprécipitations a été observée. Ces résultats ont été obtenus en lysant les parasites stables sans avoir au préalable traité les parasites par un agent pontant. De ce fait, lorsque les parasites sont lysés, les versions mutées TgGAP50 N_101-A et TgGAP50 N_136-A et triple mutée peuvent interagir avec les autres composants du glidéosome alors que dans le parasite, elles n'y sont pas probablement pas associées puisque TgGAP50 n'est plus dans le complexe membranaire interne pour interagir avec les partenaires. Les *N*-glycannes jouent probablement un rôle dans la conformation des protéines. En l'absence de ces *N*-glycannes, la conformation de TgGAP50 est probablement perturbée, cependant, ceci ne semble pas empêcher les interactions avec les autres constituants du glidéosome (en particulier TgGAP45 et TgMLC1). Pour déterminer si ces interactions entre les versions mutées de TgGAP50 et TgGAP45 se font lors de la lyse des parasites, nous avons utilisé un agent pontant pour maintenir *in vitro* les interactions ayant lieu *in vivo*. Dans ces conditions, une très faible quantité de TgGAP45 est immunoprécipitée par TgGAP50 lorsque la protéine est délocalisée. Ceci nous permet de déterminer que les interactions observées sans pontage des parasites ont lieu lors de la lyse des parasites. Nous avons ainsi démontré que les *N*-glycannes de TgGAP50 sont également impliqués dans les interactions plus ou moins fortes avec les composants du glidéosome. Ces *N*-glycannes confèrent probablement à la protéine une conformation optimale permettant au domaine carboxy terminal de TgGAP50 d'interagir avec un ou plusieurs des composants du glidéosome.

Nous nous sommes également intéressés à la *N*-glycosylation de la protéine TgAMA1 puisque ceci n'a jamais été rapporté. Les résultats de glycomique obtenus au cours de la première étude ont

montré que les structures *N*-glycanniques majeures du parasite sont de type oligomannosidique, sans modification par ajout de fucose sur le GlcNAc lié au résidu d'asparagine sur la protéine. Nous avons donc utilisé deux endoglycosidases pour montrer que les *N*-glycannes de TgAMA1 sont susceptibles à la PNGase F alors qu'ils sont insensibles à l'endo H, suggérant que les structures *N*-glycanniques de TgAMA1 peuvent également être du type $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ comme sur TgGAP50.

Par mutagenèse dirigée, nous avons remplacés les asparagines 86 et 421 deTgAMA1 par des alanines, individuellement et les deux ensembles et étudié les conséquences sur la localisation des protéines dans les parasites. L'expression des différentes versions sauvages et mutées de TgAMA1 sont sous le contrôle du promoteur hétérologue fort *GRA1*. La protéine sauvage TgAMA1wt surexprimée est localisée dans les micronèmes. De même, les versions mutées individuelles TgAMA1 $N_{86}A$ et TgAMA1 $N_{421}A$, et double mutée TgAMA1 $N_{86}A$ $N_{421}A$ sont localisées dans les micronèmes, suggérant que les *N*-glycanne(s) de TgAMA1 ne serait pas directement impliqués dans le trafic et la localisation de la protéine dans les micronèmes. Nous n'avons donc pas poursuivi plus loin l'étude de la *N*-glycosylation de TgAMA1.En revanche, il n'est pas exclu que le ou les *N*-glycannes de AMA1 puisse jouer un rôle dans une autre fonction de TgAMA1. La *N*-glycosylation est impliquée dans la sécrétion des protéines chez de nombreux Eucaryotes. TgAMA1 est sécrétée par les micronèmes durant les premières étapes de l'invasion, la présence de *N*-glycannes n'intervenant pas dans le trafic et la localisation de cette protéine pourrait suggérer un rôle potentiel de ces oligosaccharides dans la sécrétion de la *N*-glycoprotéine. Lors de la sécrétion des micronèmes, TgAMA1 est ancrée dans la membrane plasmique du parasite, avec le court domaine carboxy terminal cytoplasmique qui est tourné vers le cytoplasme et le reste de la protéine qui est tournée vers le milieu extracellulaire. Le *N*-glycanne probablement porté par l'asparagine 86 serait donc tourné vers le milieu extracellulaire et pourrait intervenir dans les interactions avec des ligands de la surface de la cellule hôte. Enfin, il a été établi dans des études préliminaires que la formation de la jonction mobile implique une interaction entre TgAMA1 et TgRON2 (Besteiro *et al*., 2009). Ces deux protéines ont été retrouvées dans nos expériences de chromatographie d'affinité Con A, ce qui suggère que les *N*-glycannes de TgAMA1 et TgRON2 ont joué un rôle dans ces reconnaissances avec la lectine Con A et que cette interaction pourrait avoir existé *in vivo* lors de la formation de la jonction mobile. Les outils de génétique inverse que nous avons développés pourraient nous servir d'aborder les fonctions des *N*-glycannes dans les interactions entre les différents partenaires de la jonction mobile.

Nous avons également montré que la surexpression de TgGAP50, lié à l'expression ectopique d'une seconde copie du gène, confère au parasite une résistance significative à la tunicamycine conduisant les parasites transgéniques à avoir une motilité et une capacité d'entrée dans les cellules hôtes (invasion) plus grande que la souche RH sauvage. Les traces laissées par les parasites sur-

exprimant la version sauvage de TgGAP50, traités 48 h par la tunicamycine apparaissent rectilignes. Ces résultats nous permettent de supposer que TgGAP50, et par conséquent le glidéosome, pourrait avoir un rôle plus particulier dans ce type de mouvement, probablement suffis ant pour l'invasion des cellules hôtes. De même, l'invasion des parasites sur-exprimant la version sauvage de TgGAP50 est significativement plus forte que celle de parasites sauvage ou exprimant la version triple mutée.

Par des études protéomiques et glycomiques, la structure et la composition de chacun des *N*-glycannes de TgGAP50 ont révélé une grande hétérogénéité dans le nombre de résidus de glucose présents en position terminale sur chacun des *N*-glycannes. De ce fait, chaque *N*-glycanne présent sur une asparagine est probablement différent des autres *N*-glycannes de TgGAP50. Cette hétérogénéité au niveau des sites de *N*-glycosylation est commune chez les Eucaryotes (Bloom *et al*., 1996). Plusieurs glycoformes de la même *N*-glycoprotéine existent entre différents tissus chez les Eucaryotes. Certaines conditions cellulaires, comme le taux de traduction, l'état de disponibilité des oligosaccharides donneurs interviennent dans l'état de glycosylation des *N*-glycoprotéines. Ces *N*-glycoprotéines peuvent être totalement ou partiellement glycosylées, ou encore non-glycosylées. Il n'existe pas à l'heure actuelle de moyen d'isoler chacune des isoformes de ces *N*-glycoprotéines. Nos résultats démontrent une certaine hétérogénéité dans l'état de *N*-glycosylation d'une protéine chez *T. gondii*. Malgré cette hétérogénéité, il ne semble pas y avoir de différence majeure entre les structures des différents *N*-glycannes portés par les trois asparagines. Tous les *N*-glycannes portés par TgGAP50 sont situés dans la partie de la protéine qui est orienté dans la lumière du complexe membranaire interne. Ces *N*-glycannes pourraient interagir avec les différents composées du complexe membranaire interne, ce qui est probablement responsable de l'ancrage de TgGAP50 dans la membrane du complexe membranaire interne (Johnson *et al*., 2007). Ces *N*-glycannes pourraient également interagir avec les protéines ancrées au niveau de la membrane interne du complexe membranaire interne, les GAPMs identifiées chez *P. falciparum*, mais également présente chez *T. gondii*. Toutefois, ces protéines n'ont pas été identifiées dans nos expériences d'immunoprécipitations des partenaires de TgGAP50, probablement à cause de nos méthodes de solubilisation (Bullen *et al*., 2009). Certaines des protéines hypothétiques identifiées dans cette seconde étude possèdent des domaines transmembranaires potentiels et des sites putatifs de *N*-glycosylation. Ces protéines pourraient être localisées dans les complexe membranaire interne et pourraient interagir avec les *N*-glycannes de TgGAP50 par le biais d'interaction protéine-glycannes ou glycannes-glycannes. Ces hypothèses font l'objet d'études plus approfondies.

Par immunoprécipitation de la protéine TgGAP50 sauvage portant une étiquette HA-FLAG, nous avons identifié les partenaires connus du glidéosome, TgGAP45, TgMLC1 et TgMyoA. D'autres protéines impliquées dans la glycolyse ont également été identifiées et il a été démontré que ces protéines sont relocalisées au niveau du complexe membranaire interne lorsque les parasites entrent

et sortent des cellules hôtes (Pomel *et al.,* 2008). Ce recrutement d'enzyme glycolytique dans la zone du parasite où se trouve l'appareil moteur, et leurs interactions direct ou indirect avec TgGAP50 misent ici en évidence, conforte l'hypothèse déjà émissent quant à un mécanisme de production d'ATP directement sur le site de consommation par l'appareil moteur. Cependant, ces interactions entre les enzymes de la glycolyse et TgGAP50 ne semblent pas être

Enfin de très nombreuses protéines hypothétiques ont été également identifiées. Certaines d'entre elles possèdent des sites putatifs de *N*-glycosylation et/ou des segments transmembranaires, et ont également des orthologues de fonctions inconnues chez les autres parasites Apicomplexa (Article n°2, tableau S1, page 164). Une de ces protéines possède neuf segments transmembranaires et a déjà été caractérisée par l'équipe du Docteur Soldati (TgGAP40, Frénal *et al*., 2010). Cette protéine est localisée au niveau du complexe membranaire interne, ce qui confirme la spécificité des interactions de TgAGP50 avec les différentes protéines obtenues dans ces expériences d'immunoprécipitation. Ces récentes études ont également caractérisé l'architecture moléculaire des composants du glidéosome (Article n°2, figure 11C, page 157), en déterminant les différentes interactions des domaines amino et carboxy terminaux de TgGAP45, TgMLC1 et TgMyoA (Frénal *et al*., 2010). Nos expériences d'immunoprécipitations comparatives ont démontré que de nombreuses protéines hypothétiques ne sont plus immunoprécipitées en condition de salinité plus importante, ce qui suggère des interactions moins fortes avec TgGAP50, ou des contaminants. De même, une seule protéine de fonction inconnue (TGME49_020950) a été identifiée dans les immunoprécipitations par la protéine TgGAP50 totalement déglycosylée, ce qui suggère une fonction non particulière pour cette protéine dans le traffic de TgGAP50, ou dans les interactions avec les composants du glidéosome. La récente mise a disposition des profils d'expression d'une grande partie des ARNm de *T. gondii* nous a permis de déterminer que certaines de ces protéines hypothétiques suivent plus ou moins rigoureusement le profil d'expression de TgGAP50 au cours du cycle cellulaire. Des expériences sont en cours afin de déterminer parmis ces protéines hypothétiques celles qui sont localisées dans le complexe membranaire interne et qui interagissent directement avec TgGAP50.

En conclusion, les résultats obtenus dans la seconde partie de ma thèse ont permis d'établir que la *N*-glycosylation de TgGAP50 est importante pour la localisation correcte de la protéine dans le complexe membranaire interne, de même que dans le trafic de la protéine à travers l'appareil sécrétoire. Cette modification est également importante pour la stabilité et l'interaction plus ou moins forte de TgGAP50 avec les partenaires du glidéosome, et de ce fait joue probablement un rôle important dans la motilité parasitaire. Aucune de ces caractéristiques ne semblent être dû au troisième *N*-glycanne de TgGAP50, son rôle précis n'a pu être élucidé dans ces travaux. Il n'est

d'ailleurs pas exclu que ce troisième site de *N*-glycosylation n'ait pas de fonction précise puisque qu'il est le seul parmi les trois à ne pas être conservé dans les homologues de TgGAP50 chez les autres coccidies. La surexpression de TgGAP50 sauvage semble conférer au parasite une résistance à la tunicamycine au niveau de la motilité et de l'invasion. Cette surexpression permet également d'exporter la protéine dans la vacuole parasitophore par la voie des granules denses. Dans la vacuole TgGAP50 est localisé au niveau du réseau membranaire, l'ancrage dans ces membranes se faisant probablement de la même manière que les protéines transmembranaires de type I des granules denses. L'identification de nouveaux partenaires direct ou indirect, connus comme les enzymes de la glycolyse, ou de nature inconnus comme les nombreuses protéines hypothétiques, permet de supposer que le glidéosome ne se limite probablement pas uniquement aux quatre constituants, voire maintenant six suite aux nouveaux travaux récemment publiés (Frénal *et al.*, 2010), déjà connus et caractérisés.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

De nos travaux peuvent découler les perspectives de recherche concernant la motilité et l'invasion, ainsi que la phylogénie des Apicomplexa.

Caractériser de nouveaux constituants du glidéosome :

✓ A cours terme, l'une des perspectives principales serait de localiser précisément certaines de ces protéines hypothétiques identifiées dans les immunoprécipitations par TgGAP50.

✓ De même, la caractérisation des interactions réelles de ces protéines hypothétiques avec TgGAP50 est envisageable à plus long terme.

✓ L'identification d'inhibiteurs spécifiques de ces protéines est aussi une perspective, à plus long terme également.

✓ La caractérisation du rôle du *N*-glycanne porté par l'asparagine 228 de TgGAP50, dans les interactions avec ces nouvelles protéines hypothétiques est également envisageable à court terme.

Grâce aux nouvelles stratégies développées chez *T. gondii* :

✓ Obtenir des mutants nuls pour le gène *gap50*, soit par « knock out » classique, ou en établissant une expression conditionnelle de ce gène.

✓ Complémenter ces parasites mutants conditionnels par les différentes versions mutées de TgGAP50.

✓ Réaliser des remplacements alléliques de *Tggap50* par les différentes versions mutées.

✓ Caractériser l'infection chez la souris de ces parasites ainsi que celle des parasites stables déjà obtenus.

Caractériser le rôle de la *N*-glycosylation de TgAMA1 :

✓ Etudier en détail la *N*-glycosylation de TgAMA1, en adoptant la même stratégie que celle menée dans ces travaux de thèse.

- Définir le rôle du *N*-glycanne dans la sécrétion de la protéine des micronèmes lors de l'invasion.
- Vérifier les interactions des versions mutées de TgAMA1 avec les composants de la jonction mobile, notamment TgRON2.
- Complémenter la souche parasitaire inductible TgAMA1 par les versions mutées de la protéine.
- Etudier les effets sur la virulence chez la souris de ces parasites.

Parmi les protéines purifiées par chromatographie d'affinité Con A, déterminer et caractériser celles qui sont effectivement *N*-glycosylées, en réalisant tout d'abord des Western blots sur des lysats parasitaires traités par la PNGaseF, ou des lysats de parasites traités par la tunicamycine.

La poursuite des études concernant l'implication de la *N*-glycosylation dans la mise en place et le fonctionnement du glidéosome, et de la jonction mobile, dans les interactions de TgGAP50 avec les nouveaux composants potentiels du glidéosome, permettra d'approfondir les connaissances fondamentales relatives à la motilité et l'invasion chez les parasites Apicomplexa. De même, la mise en place d'un outil spécifique de la *N*-glycosylation parasitaire permettrait de déterminer le rôle de cette modification dans le trafic et le tri des protéines chez les Apicomplexa, pour éventuellement contribuer à la découverte de molécules spécifiques anti-toxoplasmiques.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Culture cellulaire

A. Culture des fibroblastes humains

Toxoplasma gondii étant un parasite intracellulaire obligatoire, les tachyzoïtes sont cultivés *in vitro* sur des « monocouches » de fibroblastes humains HFF (Human Foreskin Fibroblasts) confluentes, lignée primaire à multiplication limitée. Ces cellules hôtes sont cultivées et maintenues sous atmosphère humide, 5% de CO_2 et à 37°C, en milieu DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium, Lonza) complémenté par 10% de sérum de veau fœtal (v/v), 2mM de L-glutamine et 50 000 unités de Penicilline/Streptavidine (DMEM complet). Une fois à confluence, les HFFs sont divisés au 1/3 ou 1/4 selon le nombre de passage par une solution de Trypsine EDTA (170 000 U Trypsine/L , 200 mg/L EDTA).

B. Entretien des parasites

Les tachyzoïtes des différentes souches de *T.gondii* utilisées sont cultivés par infection de cellules HFFs confluentes. Le milieu de culture est changé 4h post-infection, et les parasites sont déposés sur de nouvelles cellules hôtes dès la lyse des HFFs infectés. Les bradyzoïtes de la souche 76K sont récupérés à partir de kystes isolés de cerveaux de souris infectées de manière chronique pendant au moins 6 semaines.

C. Purification des parasites

Les tachyzoïtes extracellulaires sont purifiés lorsque le tapis cellulaire est totalement lysé. Concrètement, le reste du tapis cellulaire est décollé à l'aide d'un grattoir et la suspension parasitaire est passée dans un homogénéisateur de Dounce pour extraire les parasites des vacuoles restantes non lysées. Cette suspension parasitaire est passée sur une colonne de laine de verre non traitée pour éliminer les débris cellulaires, puis sur une membrane de polycarbonate de porosité 3µm (Nucleopore®, Whatman). Un aliquot du filtrat parasitaire est déposé sur lame de Malassez pour comptage. Les parasites sont centrifugés à 2200 rpm à 4°C pendant 15 min, et lavés deux fois en DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline [200 mg/L KCL ; 200 mg/L KH_2PO_4 ; 8 g/L NaCl ; 2,16 g/L $Na_2HPO_4.7H_2O$; pH 7,4 ; Lonza). Le culot parasitaire est ensuite congelé à -20°C ou utilisé immédiatement.

Les bradyzoïtes sont purifiés à partir de kystes contenus dans les cerveaux de souris 6 à 8 semaines post-infection. Les cerveaux extraits sont broyés dans 4 mL de DPBS dans un homogénéisateur de Potter. La suspension est centrifugée à 1500 rpm pendant 10 min à 4°C et lavée

deux fois en DPBS. La purification des kystes est réalisée selon le protocole de Cornelissen (Cornelissen *et al.*, 1981) grâce à un gradient de Percoll : le culot est repris par 2,5 mL de Percoll 100% isotonique [90% (v/v) de Percoll (Sigma) ; 10% (v/v) NaCl 1,5 M], qsp 7,5 mL avec du DPBS et centrifugé 20 min à 2000 rpm. Les culots composés de kystes, d'hématies et de quelques débris de cerveaux sont lavés deux fois par du DPBS et centrifugés 10 min à 1500 rpm. Un second gradient de Percoll est réalisé si nécessaire, suivi de deux lavages en DPBS. Les hématies sont lysés par une solution de neuf volumes de NH_4Cl 0,15 M et un volume de Tris/HCl 20 mM ; pH 7,4. Les kystes sont lavés deux fois par du DPBS puis un aliquot est monté entre lame et lamelle pour comptage. Les bradyzoïtes sont libérés des kystes par un traitement de 30 min à 37°C par une solution de pepsine isotonique [Pepsine/HCl 0,05% (p/v) pH 2,8 ; NaCl 170mM]. Un aliquot de cette suspension est monté entre lame et lamelle pour observer les bradyzoïtes libérés. La pepsine est neutralisée par un lavage en DMEM complet et centrifugés pendant 10 min à 2000rpm. Le culot parasitaire peut être congelé à -20°C ou utilisé immédiatement.

II. Biologie moléculaire

A. RT-PCR semi quantitative

1. Extraction des ARNm

Les tachyzoïtes purifiés sont lysés dans un tampon de lyse autoclavé pour détruire toutes traces de RNases [1% (v/v) SDS , 50 mM d'acétate de sodium (NaOAc), pH 5,2 , 10 mM EDTA]. Un volume identique d'AquaPhenol™ frais (Q-Biogene) est ajouté puis la solution est incubée 15 min à 65°C en agitant fréquemment (Vortex). Suite à une centrifugation de 5 min à 14 000 rpm, la phase aqueuse (phase supérieure) est conservée et la phase phénolique est extraite une seconde fois, par ajout de la moitié du volume initial de tampon de lyse. Les deux phases aqueuses sont alors rassemblées et extraites une dernière fois par un volume d'AquaPhenol™. Deux extractions par du chloroforme (volume/volume), à la suite l'une de l'autre, sont ensuite réalisées. Les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont précipités sur la nuit à -20°C par de l'acétate de sodium 0,3 M (pH 5,2) et deux volumes et demi d'éthanol froid 100%. Une centrifugation à 14 000 rpm durant 30 min permet de récupérer le culot contenant les ARN totaux qui sont lavés par de l'éthanol froid 80% (v/v), resuspendus et centrifugés à nouveau 30 min à 14 000 rpm. Cette étape d'élimination des sels par l'éthanol est réitérée une seconde fois. Les ARN totaux sont ensuite séchés sous cloche à vide et repris par de l'eau déminéralisée stérile contenant de la RNasine (Promega). Les contaminations par de l'ADN génomique sont évaluées par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant comme gène cible la SOD (SuperOxyde Dismutase). Une contamination par de l'ADN génomique est détectée par

une électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant du BET 0,5 µg/mL (Bromure d'Ethidium). Une bande apparaissant à environ 700 pb reflète une contamination par de l'ADN génomique.

Les contaminants d'ADN génomique sont digérés par la DNase de type I (RQ1 RNase-Free DNase, Promega). Selon la concentration en acides nucléiques, un ajout d'une unité de DNase par µg d'acides nucléiques et une incubation de 30 min à 37°C sont effectués. La digestion est arrêtée par une solution stop et 10 min d'incubation à 65°C pour inactiver la DNase. Les ARN totaux sont alors extraits par de l' AquaPhenol™ et du chloroforme, laver par de l'acétate de sodium et précipiter sur la nuit par de l'éthanol froid 100% (2,5 v/v). Ces ARN totaux sont alors lavés par de l'éthanol froid 80% puis sécher sous vide. Une nouvelle PCR de vérification de la contamination par de l'ADN génomique est réalisée. Cette digestion est renouvelée jusqu'à ce que la contamination par de l'ADN génomique disparaisse.

2. Synthèse des ADNc par rétro-transcription

Les ARN totaux purs sont ensuite rétro-transcrits en ADN complémentaire par la Reverse Transcriptase AMV (« Avian Myeloblastis Virus », Roche). Les ARN totaux sont repris par de l'eau stérile et avec 10 µM d'oligodT suivi d'une incubation de 2 min à 72°C puis 2 min dans la glace. Vingt cinq unités par µL de Boehringer RT AMV sont ajoutées à la suspension (5 µL), en présence de RNasine, du tampon de l'enzyme et de dNTP 25 mM et incubé 1 h à 42°C. Après 10 min dans la glace, une extraction à l'AquaPhenol™ chloroforme est réalisée. Les ADNc sont lavés par de l'acétate de sodium et précipités sur la nuit par de l'éthanol. Un dernier lavage à l'éthanol 80% (v/v) est effectué puis les ADNc sont séchés et repris par 100 µL d'eau stérile. Une PCR est alors faite pour vérifier sur un gel d'agarose 1% (p/v), contenant du BET 0,5 µg/mL, la présence de l'ADNc de la SOD à 200 pb, et l'absence d'une bande d'ADN génomique contaminant à 700 pb, contenant l'exon (200 pb) et l'intron (500pb) du transcrit de la SOD,.

3. RT-PCR comparative entre les ADNc des tachyzoïtes et bradyzoïtes

Les ADNc provenant des tachyzoïtes et des bradyzoïtes sont amplifiés en utilisant des couples d'amorces spécifiques (Eurogentec) définis à partir de la séquence des gènes prédits de la voie de synthèse des *N*-glycannes, mais aussi des transcrits de l'actine afin de contrôler que la même quantité d'ARNm est utilisée entre les deux stades parasitaires. Les amorces sont les suivantes :

ALG1S : 5'-tcgccgctccacgcttttgcgaag-3' ; ALG1AS : 5'-cgggctctctgtagccactgattc-3'

ALG2S : 5'-gctcctcgtgcagagaactccgca-3' ; ALG2AS : 5'-ccgagcgcgttcgcctccaaaggc-3'

ALG3S : 5'-ctcttcgaccttgatggaactctc-3' ; ALG3AS : 5'-tgcccgacagtccgcggatcctcg-3'

ALG5S : 5'-gatgccgacggggcaacgacggtc-3' ; ALG5AS : 5'-agtttgaaaccgcactgggtgtcc-3'

ALG6S : 5'-ggagactttgaggctcaacggcac-3' ; ALG6AS : 5'-tacgccgttgtactggaagtgacc-3'

ALG7S : 5'-atgggcctcgtctcggcgttcgtc-3' ; ALG7AS : 5'-gacaaagaagctcatgacgaccga-3'

ALG9S : 5'-gagccctacatggacgaagagttc-3' ; ALG9AS : 5'-gttgtcgctgagaaggaaaggatg-3'

ALG11S : 5'-gtggctttcttccaccctcagtgc-3' ; ALG11AS : 5'-gacgaaagggtagtgtatgta-3'

ALG12S : 5'-gttctggtgacagtggggacgacg-3' ; ALG12AS : 5'-gcagtgagaaagcacgagattggc-3'

ALG14S : 5'-ccgaggagtcgcgaagtcggccag-3' ; ALG14AS : 5'-acgcccagagagagacagagagtc-3'

αG1S : 5'-cgccgcttcccaacgaggagg-3' ; αG1AS : 5'-ctgcgaggaggggaaaccactca

αG2S : 5'-tggacggcggagggcggaatctt-3' ; αG2AS : 5'-ggttgtctcccgtccacacgaaac-3'

OST1S : 5'-gtctcgcatttcggcaacatcttc-3' ; OST1AS : 5'-cctgaaagtgaagacgtcgagcca-3'

STT3S : 5'-cccgtcgtggaggtggctgctctt-3' ; STT3AS : 5'-cacatagccgccccaggtcactac-3'

WBP1S : 5'-tggactttcaaccgtcgcggcgtt-3' ; WBP1AS : 5'-ggagcagccgtagtaaggcagtgc-3'

Le volume réactionnel final est de 100µL et comprend, le couple d'oligonucléotides (50 pmol/µL), les quatre dNTPs (200µM/dNTP), $MgCl_2$ (1,5mM), le tampon de la Taq ADN-polymerase 5x Colorless Buffer (Tris HCl 50mM, NaCl 50mM pH 9, Triton X100 1%), la Taq ADN-polymérase (Thermus aquaticus). Le programme de PCR utilisé sur la machine MiniCycler™ de MJ Research est le suivant , dénaturation des ADNc doubles brins à 95°C, 5 min , répétition 40 fois des trois étapes suivantes, 1 min à 95°C, 1 min à la température d'hybridation des amorces, 1 min par kb d'ADN à amplifier à 72°C, 10 min à 72°C pour l'élongation finale des ADNs, puis conservation des produits amplifiés à 4°C. Les échantillons de PCR sont ensuite déposés en gel d'agarose 1% (p/v), contenant du BET 0,5 µg/mL, et une normalisation des dépôts est réalisée en se basant sur l'amplification de l'actine chez les deux stades parasitaires.

4. Extraction de l'ADN génomique des parasites tachyzoïtes

L'ADN génomique (ADNg) des parasites clonés est extrait grâce au kit commercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Des tachyzoïtes sortis des cellules HFFs des plaques 24 puits sont récoltés et lavés deux fois au DPBS. Le culot parasitaire est ensuite repris par 75 µL de la solution de lyse (Promega), additionné de 0,375 µL d'une solution de RNase, puis incubé à 37°C pendant 20 minutes. Une fois à température ambiante, 25 µL de la solution de précipitation sont ajoutés, puis le précipitât est vortexé et incubé sur de la glace pendant 5 minutes. Ce précipitât est centrifugé à 14 500x*g* pendant 10 minutes. Le surnageant est transféré dans un tube Eppendorf contenant 150 µL d'isopropanol 95% afin de précipiter l'ADNg. Après 2 minutes d'incubation à température ambiante, la solution d'ADNg est centrifugée pendant 30 minutes à 4°C à 14 500x*g* et le culot d'ADNg est ensuite lavé par de l'éthanol 70% puis centrifugé à nouveau 20 minutes à 14 500x*g*. L'ADNg ainsi lavé est séché sous une cloche à vide puis repris par 10 µL d'une solution tampon de Tris/HCl 10 mM EDTA 1 mM, à 65°C pendant 15 minutes. L'ADNg resuspendu est dosé à l'aide d'un NanoDrop.

B. Construction des plasmides pMAH14-TgAMA1-HAFLAG et pMAH14-TgGAP50-HAFLAG

1. Amplification des différents ORFs

Les ORFs des différents gènes clonés au cours de ce travail ont été amplifié à partir d'ADNc de tachyzoïtes de la souche RH, et cloné dans le plasmide pMAH14 (Saksouk *et al.*, 2005). Ce plasmide permet de placer un épitope HA-FLAG (HA pour HémAgglutinine et FLAG pour construction artificielle) en amont (côté 5') ou en aval (côté 3') du gène cloné. L'étiquette HA permet de réaliser par la suite des immunofluorescences indirectes et l'étiquette FLAG, des immunoprécipitations. Les amplifications par PCR sont réalisées grâce au kit (AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase System, Invitrogen) contenant une *Taq* polymérase haute fidélité. Pour l'amplification de l'ORF du gène *TgAma1*, les couples d'amorces suivants ont été utilisés : 5'-CCGGGGATCCATGATCTGTTCAATCATGGGAGGCTTG-3' et 5'-CCGGGAATTCGTAATCCCCCTCGACCATAACATGT-3' ; et pour l'ORF du gène *TgGap50* : 5'-CCGGCTGCAGATGGCAGGCGCCCCCGTC-3' et 5'-CCGGCTGCAGTTTCATGTAGCGAGAGAGACCGTTC-3'. Une suspension de 200 ng d'ADNc est utilisée comme matrice pour un volume final de PCR de 50 µL. Les amorces synthétisé par la société Sigma-Aldrich sont repris dans du Tris/HCl 10 mM EDTA 1 mM à une concentration de 100 µM, puis dilué à 10 µM et conservé à -20°C. Pour la réaction de PCR, 1 µL de chacun des couples d'amorces à 10µM sont utilisés. 5 µL du tampon de réaction (10X AccuPrime™ PCR Buffer I) et 1 µL de la polymérase (AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase) sont ajoutés. Le volume est complété à 50 µL final avec de l'eau double distillé. Les conditions de PCR sont les suivantes :

- 94°C pendant 5 min
- 35 cycles :
  - 94°C pendant 30 sec
  - 58°C pendant 30 sec
  - 68°C pendant 2 min pour l'ORF de *TgAMA1* et 1 min 45 sec pour l'ORF de *TgGAP50*
- 68°C pendant 10 min

Après la PCR, 5 µL d'échantillons sont déposés dans un gel d'agarose 1% en TAE (Tris 40 mM ; acétate 40 mM ; EDTA 1 mM, pH 8) contenant du BET et visualisés sur une table UV après électrophorèse. La taille du fragment d'ADN amplifié est vérifiée par comparaison avec celles de marqueurs de poids moléculaires connus (Fermentas). Le reste de l'échantillon de PCR est purifié sur silice grâce au kit d'extraction d'ADN en solution Nucleospin Extract II (Machery-Nagel).

2. Digestion des inserts et du vecteur pMAH14

Le vecteur de clonage utilisé est un vecteur pBluescript SK- possédant une cassette de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les bactéries résistantes après transformation. Un promoteur fort TgGRA1 a précédemment été cloné entre les sites de restriction *SacI* et *BamHI*, ainsi qu'une étiquette HA-FLAG entre les sites *EcoRI* et *BglII*, et enfin une partie de la séquence 3' du gène de *TgSag1* entre les sites *BglII* et *KpnI*. Le produit de PCR correspondant au cadre de lecture du gène *TgAMA1* a été cloné dans les sites de restrictions *BamHI*/*EcoRI*, et celui de *TgGAP50* dans le site de restriction de *PstI*. Les produits de PCR purifiés et 2 µg du plasmide pMAH14 sont séquentiellement digérés soit par l'enzyme *BamHI* (tampon de digestion 10X : 3 µL ; 1µL d'enzyme *BamHI* ; H_2O double distillé (H_2O dd) qsp 30 µL) pendant 2 h à 37°C, puis par l'enzyme *EcoRI* (tampon de digestion 10X : 5 µL ; 1 µL d'enzyme *EcoRI* ; H_2O dd qsp 50 µL) pendant 2 h à 37°C, pour le clonage de l'ORF de *TgAMA1*, soit par l'enzyme *PstI* uniquement (tampon de digestion 10X : 3 µL ; 1 µL d'enzyme *PstI* ; H_2O dd qsp 30 µL) pendant 2 h à 37°C. Ces digestions permettent d'ouvrir le plasmide pMAH14 pour ainsi y amener les inserts TgAMA1 ou TgGAP50 digérés. La digestion totale du plasmide est vérifiée en analysant un échantillon de ces digestions plasmidiques par électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant du BET. Les inserts et les plasmides digérés sont ensuite purifiés sur colonne (kit Macherey-Nagel).

3. Déphosphorylation des plasmides pMAH14 digérés

Les plasmides digérés et purifiés sont déphosphorylés pendant 15 min à 37°C avec 5 µL de tampon 10X FastAP et 1 µL d'enzyme FastAP, dans un volume total de 50 µL. La phosphatase alcaline est ensuite inactivée en incubant la réaction 10 min à 70°C. Les plasmides ainsi déphosphorylés sont ensuite purifiés par colonne avec le kit Macherey-Nagel.

4. Ligation des plasmides pMAH14 préparés avec les inserts

Les ADNc de TgAMA1 et TgGAP50 purifiés, et les plasmides pMAH14 préparés correspondant sont dosés au NanoView pour déterminer les quantités d'inserts et de plasmides nécessaires pour la ligation. Les ligations sont réalisées dans un rapport 5/1, soit 500 ng d'inserts et 100 ng de plasmides. Les réactions se font dans un volume final de 20 µL, avec 2 µL du tampon de ligation et 1 µL d'enzyme T_4 DNA ligase (Fermentas), avec une incubation à 22°C pendant 10 min. La ligase est ensuite inactivée à 70°C pendant 5 min.

5. Transformation des bactéries compétentes Top10F'

Les bactéries *Escherichia coli* Top10F' utilisées sont rendues compétentes pour un choc thermique avec un traitement au chlorure de rubidium. La transformation est réalisée en incubant 10

µL de la réaction de ligation avec 50 µL de bactéries compétentes sur de la glace pendant 30 min. Un choc thermique de 45 sec à 37°C est réalisé, puis les bactéries sont remises immédiatement sur la glace pendant 2 min. 250 µL de milieu LB [Luria Bertani, tryptone 1% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7] sont alors ajoutés et la culture est incubée à 37°C pendant 1 h sous agitation. Cette culture est ensuite intégralement étalée sur une boite de Pétri contenant du milieu de culture LB gélosé et supplémenté en ampicilline à 50 µg/mL. Ces bactéries sont enfin cultivées sur la nuit à 37°C.

6. Criblage des colonies par PCR

Les colonies formées sur la boite de Pétri sont analysées par PCR sur colonies pour vérifier la présence des inserts TgAMA1 et TgGAP50 dans les plasmides pMAH14. Une PCR [Dream Taq Green DNA Polymerase, Fermentas ; 2,5 µL de 10X DreamTaq™ Green Buffer, 1 µL dNTP 10 mM, 0,25 µL DreamTaq™DNA Polymerase, 0,5 µL amorces 100 mM (amorce pMAH14seqS 5'-gtatagacgcaactcggtttg-3' et amorce pMAH14seqAS 5'-ggcgatcaacatcagccaggtc-3') H_2O dd qsp 25 µL] est réalisée pour cribler 10 colonies par clonage. Les colonies sont piquées à l'aide d'un cône, repiquées sur une autre boite de Pétri LB ampicilline puis frottées sur les parois d'un tube de PCR pour y déposer quelques bactéries. Le mix de PCR est alors ajouté au tube et la PCR s'effectue selon le cycle suivant :

- 95°C pendant 10 min
- 29 cycles :
  - 95°C pendant 30 sec
  - 58°C pendant 30 sec
  - 72°C pendant 2 min pour l'ORF de *TgAMA1* et 1 min 45 sec pour l'ORF de *TgGAP50*
- 72°C pendant 10 min

La moitié des produits de PCR est déposée dans un gel d'agarose 1% contenant du BET et analysée après électrophorèse. Les bactéries ayant reçues le plasmide contenant l'insert sont remises en culture liquide dans 5 mL de milieu de culture LB ampicilline liquide à 37°C sur la nuit.

7. Extraction plasmidique et séquençage

Les plasmides des colonies positives misent en culture sur la nuit sont extraits avec le kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel), à partir de 4,5 mL des 5 mL de culture LB liquide. Les 500 µL restant sont congelés à -20°C avec 25% final (v/v) de glycérol. Une digestion de contrôle est réalisée pour libérer les inserts TgAMA1 (enzymes de restriction *BamHI* et *EcoRI*) et TgGAP50 (enzyme de

restriction *PstI*) cloné dans les plasmides pMAH14, et vérifié en gel d'agarose 1% contenant du BET. Les séquençages de ces inserts sont effectués (société Genoscreen, Institut Pasteur de Lille), en utilisant les amorces pMAH14seqS et pMAH14seqAS. Les résultats de séquençage sont analysés pour vérifier l'absence de mutation, en comparaison avec la base de données de ToxoDB.org. Dans le cas du clonage de l'ORF de TgGAP50, on vérifie également par séquençage la bonne orientation de l'insert dans le plasmide, puisqu'il s'agit ici d'un clonage unidirectionnel.

8. Transfection transitoire des parasites tachyzoïtes *T. gondii*

La transfection transitoire de tachyzoïtes des souches RH, HDEL ou GRASP consiste à électroporer dans les parasites de grandes quantités de plasmide (100µg d'ADN plasmidique circulaire pour 10.10^6 parasites). Cette quantité de plasmide est obtenue par extraction plasmidique sur une culture liquide LB de 250mL de bactéries, grâce au kit Nucleobon Xtra Midi (Macherey-Nagel). Des tachyzoïtes de ces différentes souches sont amplifiés comme décrits précédemment dans une boite de culture de $25cm^2$ contenant un tapis de cellule HFF confluente. Ces parasites sont récoltés et filtrés sur membrane de polycarbonate de porosité 3µm, puis centrifugés à 400x*g*. Le culot parasitaire est alors lavé deux fois dans le milieu de transfection spécifique, le cytomix [120mM KCL ; 10mM K_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 7,4 ; 25mM Hepes pH 7,6 ; 2mM EGTA pH 7,6 ; 5mM $MgCl_2$; 0,15mM $CaCl_2$; pH ajusté à 7,6 avec du KOH]. Les parasites sont ensuite dénombrés sur cellule de Malassez et repris à 10.10^6/400µL dans du cytomix complet (cytomix complété par 2mM final d'ATP et 5mM final de gluthation). 10.10^6 parasites sont alors mis en présence de 100µg d'ADN plasmidique à transfecter dans une cuvette d'électroporation de 2mm (Eurogentec). L'électroporation est effectuée dans un électroporateur BTX Electro Cell Manipulator 600, réglé sur un voltage de $1,5kV.cm^{-1}$, une capacitance de 25µF et résistance de 24Ω.

Les parasites transféctés sont alors déposés dans des puits d'une plaque 24 puits contenant des cellules HFF confluentes sur des lamelles de verre, compatible avec de la microscopie classique et immunofluorescence, à raison de 5.10^5 parasites par puits. La croissance des parasites intracellulaire est alors arrêtés 24h post-infection par une solution de paraformaldéhyde 4% (p/v) en DPBS. Les parasites ainsi fixés sont alors soumis à des immunofluorescence décrites plus loin dans ce même chapitre.

C. Mutagenèse dirigée sur les plasmides pMAH14-TgAMA1-HAFLAG et pMAH14-TgGAP50-HAFLAG

Les sites putatifs de *N*-glycosylation des glycoprotéines TgAMA1 et TgGAP50 ont été obtenus par analyse bioinformatique des séquences protéiques par le logiciel NetNglyc 1.0 Server (Expasy). Les expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées en utilisant le kit QuickChange Site-Directed

Mutagenesis Kit (Stratagene). Ces mutations dans les ORF de ces deux gènes clonés dans le plasmide pMAH14 ont été réalisées par PCR en utilisant des amorces dessinées selon les recommandations du fournisseur. Ceci permet de réaliser des mutations par substitution dans les codons codant pour les asparagines impliquées (AAC) pour les remplacer par un codon codant pour une alanine (CGC).

Pour la mutagenèse de l'ORF de *TgAMA1*, comprenant deux sites putatifs de *N*-glycosylation, les amorces suivantes ont été utilisées (les bases nucléiques mutées sont soulignées) : 5'-CCTTCATGGAAAGATTCGCGCTAACTCATCATCATCAGTCTGG-3', 5'-CCAGACTGATGATGATGAGTTAGCGCGAATCTTTCCATGAAGG-3' pour le premier site putatif de *N*-glycosylation (Asparagine 86 ; pMAH14 TgAMA1 N_86-A-HAFLAG) ; 5'-CCGAATTTCATAATTCCGTCAGCGCCCTCTGTTACTCCGCCAACG-3', 5'-CGTTGGCGGAGTAACAGAGGGCGCTGACGGAATTATGAAATTCGG-3' (Asparagine 421 ; pMAH14 TgAMA1 N_421-A-HAFLAG). Le plasmide pMAH14 TgAMA1 N_86_421-AA-HAFLAG a été fait par des PCR successives en utilisant les deux couples d'amorces décrits ci-dessus.

Pour la mutagenèse de l'ORF de *TgGAP50*, comprenant trois sites putatifs de *N*-glycosylation, les amorces suivantes ont été utilisées (les bases nucléiques mutées sont soulignées) : 5'-GGCGGAGTTTCCAGCCTGGCGGACACCAGGTGGCAATCC-3', 5'-GGATTGCCACCTGGTGTCCGCCAGGCTGGAAACTCCGCC-3' pour le premier site putatif de *N*-glycosylation (Asparagine 101 ; pMAH14 TgGAP50 N_101-A -HAFLAG); 5'-GTCGATGACTGGAGTAGAGCGTACACCTCTGAGGCCCTG-3', 5'-CAGGGCCTCAGAGGTGTACGCTCTACTCCAGTCATCGAC-3' pour le second site putatif de *N*-glycosylation (Asparagine 136 ; pMAH14 TgGAP50 N_136-A -HAFLAG); 5'-TCGTCGTTCCCGTTCTCGGCGGTGACGAGTCGCGCCTGG-3', 5'-CCAGGCGCGACTCGTCACCGCCGAGAACGGGAACGACGA-3' pour le troisième site putatif de *N*-glycosylation (Asparagine 228 ; pMAH14 TgGAP50 N_228-A -HAFLAG). Les plasmides pMAH14 TgGAP50 N_101_136-AA-HAFLAG, pMAH14 TgGAP50 N_101_228-AA- HAFLAG, pMAH14 TgGAP50 N_136_228-AA-HAFLAG, et pMAH14 TgGAP50 N_101_136_228-AAA -HAFLAG ont été construits par des PCR successives en utilisant les trois couples d'amorces décrits ci-dessus.

Ces PCR de mutagenèse ont été réalisées dans un volume final de 50 µL contenant 5µL du tampon de réaction 10X, 50ng d'ADN plasmidique (pMAH14-TgAMA1-HAFLAG ou pMAH14-TgGAP50-HAFLAG), 125 ng de chacune des amorces par couple d'amorces de mutagenèse, 1µL de mix de dNTP et 1µL de *PfuTurbo* DNA Polymerase. Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes :

- 95°C pendant 30 sec

16 cycles
- 95°C pendant 30 sec
- 55°C pendant 30 sec
- 68°C pendant 6 min et 30 sec pour l'ORF de *TgAMA1*

et 6 min pour l'ORF de *TgGAP50*

Un échantillon des produits de PCR est ensuite déposé dans un gel d'agarose contenant du BET pour vérifier l'amplification des plasmides d'origines. Le reste des amplifications est soumis à une digestion par l'enzyme de restriction *DamI* (1 µL déposé directement dans le tube) pendant 1 h à 37°C, qui va digérer entièrement les plasmides d'origine ayant servis de matrice qui sont méthylés puisqu'ils proviennent des bactéries Top10F' transformées. Suite à cette digestion 5µL de la réaction vont être utilisés pour transformer des bactéries compétentes Top10F'. Après sélection sur milieu LB ampicilline gélosé, les colonies sont testées par PCR. Les colonies positives sont alors mises en culture en milieu LB ampicilline liquide sur la nuit, puis les plasmides ont été isolés. Un contrôle de la présence des inserts est fait par digestion avec les enzymes de restriction *BamHI*/*EcoRI* pour les différents plasmides pMAH14-TgAMA1-HAFLAG mutés, et *PstI* pour les différents plasmides pMAH14-TgGAP50-HAFLAG mutés. Par séquençage (Genoscreen, IPL), les mutations dans ces plasmides ont été confirmées, et les clones bactériens ainsi sélectionnés sont mis en culture dans 250 mL de milieu LB ampicilline liquide sur la nuit pour extraire les quantités de plasmides nécessaires à la transfection. Des transfections transitoires sont ensuite réalisées et l'expression des plasmides est faite par immunofluorescence suivie d'une observation par microscopie confocale. Toutes ces dernières expériences ont été réalisées comme dans la partie 2. I. g à k. du même chapitre.

D. Clonage des promoteurs endogènes de *TgAMA1* dans les plasmides pMAH14-TgAMA1-HAFLAG sauvage et mutés et de *TgGAP50* dans les plasmides pMAH14-TgGAP50-HAFLAG sauvage et mutés

Les promoteurs endogènes des gènes de *TgAMA1* et *TgGAP50* ont été déterminés par de brèves études bioinformatiques. Le but de cette étude était de remplacer le promoteur fort TgGRA1 du plasmide pMAH14 par les promoteurs propres aux gènes codant les deux protéines étudiées. Ces promoteurs ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique de la souche RH sauvage, en utilisant le kit de PCR Dream Taq Green DNA Polymerase (Fermentas). Pour le promoteur de *TgAMA1*, 2241pb en amont de l'ATG ont été amplifiées avec les amorces suivantes : 5'-ccgggagctcGACAGACGCGAGGTGCCTTCCCC-3' et 5'-ccggggatccTGAGACCCAATCAGATGTTAGCAAGC-3' ; et pour le promoteur de *TgGAP50*, 2186 pb en amont de l'ATG ont été amplifiées avec les amorces

suivantes : 5'-ccggcccgggTTTGGAGTTGGCCGAGAGCAG-3' et 5'-ccgggagctcGCAAAGCATTGGTAAGCACGTGC-3'. Ces produits de PCR ainsi que les différents plasmides pMAH14-TgAMA1-HAFLAG sauvage et mutés, et pMAH14-TgGAP50-HAFLAG sauvage et mutés, déjà obtenus ont ensuite été digérés par les enzymes de restrictions *BamHI* et *EcoRI*. Les plasmides ont été déphosphorylés puis ligués avec les inserts correspondants. Les transformations de bactéries compétentes Top10F' sélectionnées par résistance à l'ampicilline en milieu gélosé ont permis d'obtenir des colonies. Le criblage est fait par PCR (en utilisant les amorces décrites ci-dessus), les plasmides des clones bactériens positifs sont ensuite extraits et séquencés. Les analyses de séquençage ont permis d'obtenir un clone bactérien pour chacune des constructions, qui a été mis en culture sur la nuit dans 250mL de milieu LB Amp liquide. Les plasmides obtenus ont ensuite été transfectés individuellement dans des parasites préparés, puis fixés au PAF 4% puis l'expression des protéines est suivie par des doubles immunofluorescences indirectes en microscopie confocale. Toutes ces dernières expériences ont été réalisées comme dans la partie 2. I. d à k. du même chapitre.

E. Clonage de la cassette de résistance à la bléomycine dans les différents plasmides contenant l'ORF de *TgGAP50*

Afin d'obtenir des parasites exprimant de manière stable les différentes versions de TgGAP50 avec l'étiquette HA-FLAG, sous le promoteur TgGRA1 ou le promoteur endogène de *TgGAP50*, une cassette de sélection conférant aux parasites stables une résistance à la phléomycine a été cloné dans les différents plasmides construits précédemment dans le site de restriction *KpnI*. Cette cassette de sélection a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pTub5-Bléo-Sag1, en utilisant les amorces suivantes : amorce T7 5'-ccggggtaccAATACGACTCACTATAG-3' et amorce T3 5'-ccggggtaccATTAACCCTCACTAAAG-3' ; et grâce au kit AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase System (Invitrogen). Le produit de PCR est digéré par l'enzyme de restriction *KpnI*, ainsi que les différents plasmides pMAH14-TgGAP50-HAFLAG sauvage et mutés, et également le plasmide pMAH14-promTgGAP50-TgGAP50 N_101_136_228-AAA –HAFLAG. Ces plasmides sont déphosphorylés, suivi d'une ligation avec l'insert bléomycine. La transformation de bactéries compétentes Top10F' par ces différents plasmides permet d'obtenir des colonies positives après criblage par PCR des colonies résistante à l'ampicilline en milieu LB gélosé. L'analyse par séquençage a permis de sélectionner des clones bactériens n'ayant aucune mutation dans la cassette de sélection Tub5-Bléo-Sag1. Ces colonies sont mises en culture sur la nuit à 37°C en milieu LB Amp liquide, et les plasmides extraits pour être transfectés dans les parasites de la souche RH. Les parasites sont ensuite sélectionnés par leur résistance à la phléomycine.

III. Obtention des parasites stables résistant à la phléomycine exprimant les différentes versions sauvage ou mutés de TgGAP50

Les parasites exprimant de manière stable les différentes versions de TgGAP50 sauvage ou mutés, sous le contrôle du promoteur TgGRA1 pour les parasites TgGAP50wt-HAFLAG-Bléo, TgGAP50 N_101-A -HAFLAG-Bléo, TgGAP50 N_136-A -HAFLAG-Bléo et TgGAP50 N_228-AAA-HAFLAG-Bléo, ou du promoteur endogène de *TgGAP50* pour les parasites, ont été obtenus par deux sélections successives phléomycine, en extracellulaire. Des tachyzoïtes (10^7 parasites) de la souche RH sont transfectés par 100 µg de plasmides circulaires puis déposés sur un tapis de cellule HFF confluentes en boite de 25 cm^2. Une partie de ces parasites transfectés sont également déposés sur des lamelles de verre recouverte de cellule HFF confluente, dans des plaques de 24 puits, pour contrôler par immunofluorescence l'expression transitoire des plasmides transfectés. Les parasites contenus dans les boites de 25cm^2 sont laissés jusqu'à la lyse des cellules HFF. Ces parasites extracellulaires sont alors filtrés sur membrane de polycarbonate de porosité 3 µm et centrifugés à 400x*g* pendant 15 min. Le culot parasitaire est alors repris par du DMEM incomplet supplémenté en Hepes 10mM, et 5 µg/mL de phléomycine pour les parasites TgGAP50 N_101_136_228-AAA-HAFLAG-Bléo, TgGAP50 N_101-AAA-HAFLAG-Bléo et TgGAP50 N_136-A -HAFLAG-Bléo et sont incubé pendant 10 h à 37°C. Pour les parasites TgGAP50wt-HAFLAG-Bléo, et TgGAP50 N_228-AAA-HAFLAG-Bléo la sélection a été réalisé en incubant les parasites extracellulaires pendant 4 h à 37°C en DMEM incomplet supplémenté en Hepes 10 mM, et 50 µg/mL de phléomycine. Après la sélection, les parasites extracellulaires sont centrifugés à 400x*g* pendant 15 min puis déposés sur un nouveau tapis de cellule HFF confluente en boite de 25 cm^2. Le milieu de culture est changé 6 h après l'infection et le DMEM complet ajouté est supplémenté par 5 µg/mL de phléomycine. Les parasites sont cultivés jusqu'à la lyse des cellules HFF. Une deuxième sélection est réalisée de manière identique à la première décrite ci-dessus. Les parasites résistant à ces deux tours de sélection par la phléomycine sont alors clonés en plaques 96 puits, en l'absence de phléomycine. Après une semaine, les plaques de 96 puits sont criblées et les clones détectés sous le microscope sont passés en plaque 24 puits pour être amplifiés. Une fois le tapis cellulaire lysé par ces parasites, un criblage par immunofluorescence indirecte avec l'anticorps anti-HA.11 de souris a été réalisé. Les parasites exprimant de manière homogène la protéine TgGAP50 sauvage ou ses différentes versions mutées, sont ainsi identifiés et mis en culture en boite de 25 cm^2. Ces parasites stables sont ensuite congelés à -80°C, en milieu de congélation (SVF 90%, DMSO 10%) pendant une semaine puis transférés dans de l'azote liquide pour conservation. Ces souches stables sont entretenues pour réaliser d'autres tests phénotypiques et de biochimie.

IV. Biochimie

A. Double immunofluorescence indirecte sur parasites fixés

1. Immunofluorescence sur parasites extracellulaires

Les parasites (tachyzoïtes ou bradyzoïtes) sont purifiés selon le protocole décrit en 1.III. du même chapitre, puis fixés grâce au paraformaldéhyde (PAF 4%) ou PAF et glutaraldéhyde (PAF 4% glutaraldéhyde 0,0075%) pendant 15min. Les parasites sont ensuite lavés trois fois par du PBS puis repris par du PBS pour déposer 10^5 parasites par puits. Les lames sont séchées sous une hotte durant une nuit et conservées à -20°C. Les parasites sont perméabilisées par du Triton X100 0,1% dans du tampon Tris-HCl 10mM pH 7,5 , NaCl 0,15M , $CaCl_2$ 1mM , $MnCl_2$ 1mM, pendant 10 min suivi d'une saturation de la lame par de la glycine 0,1M. Toutes les incubations et lavages se font à 37°C et en atmosphère humide. Une première incubation de 30 min avec la lectine Con A (Concanavaline A, « *Jack Bean* ») couplée à la biotine (10µg/mL), ou PSA-FITC (*Pisum sativum* Agglutinin, 100µg/mL) est réalisée. Après trois lavages de 10 min en DPBS Triton 0,1%, une incubation de 30 min avec la streptavidine (1mg/mL) couplée au FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) est effectuée. Après trois lavages de 10 min chacun en DPBS Triton 0,1%, différents anticorps ont été rajoutés (αSAG1 , αMIC1 , αROP1 , αGRA1 , αcalréticuline) pour déterminer la co-localisation du signal des lectines ConA et PSA avec les organites ou compartiments sub-cellulaires. Ces anticorps sont incubés 30 min en DPBS puis 3 lavages de 10 min en PBS sont réalisés. Les anticorps secondaires de lapin, de chèvre ou d'âne, anti IgG de souris, utilisés, couplés à l'AlexaFluor 545 (8µg/mL) qui fluoresce en rouge, sont incubés pendant 30 min en présence de bleu Evans (1/1000$^{éme)}$. Après trois lavages en PBS et incubation de 10 min à température ambiante avec de l'iodure de propidium (pour certains puits) au 1/1000^{éme} suivi de deux lavages rapides en PBS, les lames sont montées avec du Mowiol (ImmunoFluore Mounting Medium).

2. Immunofluorescence sur parasites intracellulaires

Les parasites tachyzoïtes intracellulaires sont fixés au paraformaldéhyde 4% pendant 15min à température ambiante ou au méthanol froid à -20°C pendant 5min. Les lamelles sont ensuite lavées trois fois par du DPBS. Les cellules HFF et les parasites sont perméabilisés et bloqués par du Triton X100 0,2% et de la glycine 0,1 M dans du DPBS pendant 30 min. Les lamelles sont ensuite saturés par du SVF 10% dans du DPBS pendant 30 min. Toutes les incubations et lavages se font à 37°C. Une première incubation de 1 h avec un anticorps anti-HA.11 de souris (Covance) ou un anticorps anti-HA 3F10 de rat (Roche) est réalisée en DPBS Triton X100 0,1%, SVF 5%. Après trois lavages de 5min en DPBS Triton 0,1%, une incubation de 30 min avec un anticorps de chèvre anti IgG de souris, couplés à l'AlexaFluor 488 (8 µg/mL, Invitrogen) est effectuée, toujours en DPBS Triton X100 0,1%, SVF 5%.

Après trois lavages de 5min chacun en DPBS Triton X100 0,1%, les anticorps de lapin ont été rajoutés (αGRA3, αMIC2, αRON1, αMyoA, αMLC1, αGAP45) ou un anticorps de souris (αIMC1, αAct, αSAG1, αMIC1, αGRA1, αROP2/3/4) pour déterminer la co-localisation du signal des plasmides transfectés avec les organites ou compartiments sub-cellulaires du parasite. Ces anticorps sont incubés 1 h en DPBS Triton X100 0,1%, SVF 5%. 3 lavages de 5 min en DPBS Triton 0,1% sont ensuite réalisés, puis un second anticorps secondaire de chèvre anti IgG de lapin, couplé à l'AlexaFluor 594 (8µg/mL, Invitrogen) est incubé 30 min en DPBS Triton X100 0,2%, SVF 5%, contenant également du DAPI au 1/1000eme et du bleu Evans (1/1000^{éme}). Après trois lavages de 5 min chacun en DPBS Triton 0,1%, les lames sont montées avec du Mowiol et laissées 1 h à 37°C avant observation au microscope confocale LSM 710 (Zeiss).

B. « Cross-linking » des parasites extracellulaires.

Les parasites extracellulaires purifiés, filtrés et lavés (selon le protocole décrit en 1. III.) sont lavés une première fois par un tampon KRP (Hepes 12,5 mM, NaCl 120 mM, KCl 6 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, $CaCl_2$ 1 mM, Na_2HPO_4 0,6 mM, NaH_2PO_4 0,4 mM, D-glucose 2,5 mM ; pH7, 4 à l'HCl). Le culot de parasite est ensuite repris par un volume définit de tampon KRP de manière a obtenir 1.10^9 parasites pour 1 mL de tampon KRP. L'agent pontant (DiThiobis Succinyl-Propionate) est ensuite ajouté à une concentration finale de 2 mM. Les parasites sont incubés 30min à température ambiante sous agitation douce avec cet agent pontant. Le blocage de la réaction de pontage est réalisé en ajoutant le même volume de tampon de « Quenching » (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, inhibiteur de protéase, PMSF 1 mM) que de tampon KRP, et en incubant les parasites 15min dans la glace. Les parasites sont ensuite centrifugés à 2000 rpm pendant 15 min et lavés deux fois avec le tampon de « Quenching ».

C. Chromatographie d'affinité sur lectine ConA (Concanavaline A)

Toutes les étapes se déroulent à 4°C pour limiter la dégradation des protéines par des protéases. Les culots de 10^9 tachyzoïtes de la souche RH sont repris par un tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 , NaCl 0,15 M , $CaCl_2$ 1 mM , $MnCl_2$ 1 mM , Triton X100 1% , cocktail d'inhibiteur de protéase). La lyse s'effectue sous agitation rotative pendant 1 h. Puis le lysat est centrifugé pendant 15 min à 14500x*g* à 4°C. Le surnageant est incubé 3h avec les billes d'agarose couplées à la ConA (Type VA, Sigma) à 4°C sous agitation. Une centrifugation rapide permet de séparer les billes du surnageant. Une fraction aliquote du surnageant est prélevée. Par la suite, une série de 5 lavages de 10 min chacun avec le tampon de lyse sans le cocktail d'inhibiteur de protéase, sont réalisés. Un dernier lavage par du tampon Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8) est réalisé avant d'éluer les protéines retenues par la lectine. Les billes ont été éluées par du tampon de Laemmli (SDS 2%, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ,

Saccharose 10%) ou avec de l'alpha méthyl-D-mannoside (αMM, 0,5M). Les différents échantillons sont analysés par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie, ou par immuno-empreinte ou Western Blot.

D. Immunoprécipitation des différentes versions sauvage ou mutés des protéines TgGAP50-HAFLAG, par une colonne d'affinité anti-FLAG

Chacune des immunoprécipitations réalisées au cours de cette étude ont été faites avec la colonne d'affinité ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich). Les différents parasites stables déjà obtenus (TgGAP50 wt -HAFLAG-Bléo, TgGAP50 N_101-A -HAFLAG-Bléo, TgGAP50 N_136-A -HAFLAG-Bléo, TgGAP50 N_228-A -HAFLAG-Bléo, TgGAP50 N_101_136_228-AAA -HAFLAG-Bléo) ont été lysé par incubation dans du tampon TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; Nacl 150 mM ; EDTA 1 mM) complété par 1% de Triton X100 (TBST). Les protéases sont inhibées en ajoutant un cocktail d'inhibiteur de protéase (Protease Inhibitor Cocktail 100X, Fermentas) et 1 mM de PMSF. La lyse s'effectue à 4°C pendant 1 h sous agitation rotative. Les parasites sont lysés à raison de 10^9/mL et centrifugés pendant 30 min à 4°C à 14500x*g*.

Les billes sont lavées deux fois par du TBST, puis éluées 10min à température ambiante par une solution de glycine HCL 0,1 M pH 2,5 dans de l'eau. Les billes sont immédiatement lavées deux fois au TBST très rapidement avant d'être incubées avec les lysats parasitaires. Chaque lavage est réalisé à 4°C pendant 10 min sous agitation rotative, suivi d'une rapide centrifugation à 5000x*g*. Le volume de billes utilisé dans ces travaux est de 1 mL de bille sédimentée pour 10^{10} parasites lysés pour les expériences de protéomique et glycomique. Pour les Western Blots, des lysats correspondant à 10^8 parasites sont incubés avec 50 µL de billes anti-FLAG préparées. Les billes sont lavées cinq fois en TBST puis éluées.

Pour les expériences de protéomique et glycomique, les billes ont été éluées trois fois successivement par 2 mL de tampon glycine HCL 0,1 M pH 2,5 pendant 15 min à température ambiante. Chaque éluât est neutralisé en ajoutant le $10^{éme}$ du volume de Tris-HCl 1 M pH 9,4. Deux lavages des billes en TBST sont à chaque fois réalisés entre chacune des trois élutions. Les trois éluats sont mélangés et concentrés par centrifugation en utilisant un Amicon UltraPure (Amersham) de porosité 10 kDa, puis lavés par centrifugation également en TBS contenant 0,05% de Triton X100. Les billes sont ensuite conservées à 4°C en TBST pour être réutilisée plusieurs fois par la suite.

Pour les Western Blots, l'élution des billes est réalisée en tampon de reprise 2X SDS [Tris-HCl 125mM pH6,8 ; SDS 4% (p/v) ; saccharose 20% (p/v)] en chauffant à 95°C pendant 5 min. Les éluats sont séparés des billes par centrifugation à 14500x*g* pendant 5min.

E. Traitement aux endoglycosidases PNGaseF et EndoH des lysats parasitaires.

Des culots de 10^7 parasites exprimant les différentes versions sauvage ou mutés de la protéine TgGAP50-HAFLAG sont repris par un tampon composé de : Na_3PO_4 20 mM pH 6 ; EDTA 10 mM pH 8,2 ; SDS 0,5% (p/v) ; DTT 13 mM. Les culots de parasites sont ensuite chauffés à 95°C pendant 5 min. Les suspensions sont reprises avec du Triton X100 à une concentration finale de 0,5% et incubées 5 min à température ambiante. Les échantillons sont séparés en plusieurs tubes avant d'ajouter soit la PNGase F (1 µL d'enzyme pour 9 µL d'échantillon), soit de l'eau (1 µL d'eau pour 9 µL d'échantillon), l'ensemble est incubé à 37°C pendant 16 h. Après cette incubation, les échantillons sont repris par du tampon 2X SDS et sont analysés par électrophorèse en gel d'acrylamide, suivi d'un Western Blots en utilisant un anticorps anti-HA.11 (Covance).

Les mêmes expériences ont été réalisées sur des lysats de parasites de la souche RH sauvage et après SDS-PAGE, révélé par Western Blot avec un anticorps antiAMA1 de souris. Pour les traitements des lysats parasitaires de la souche RH par l'EndoH, le protocole est le suivant, les culots sont repris par le tampon décrit ci-dessus et chauffés 5 min à 95°C puis laissés 5 min à température ambiante avant d'ajouter du Triton X100 à une concentration finale de 0,5%. Le pH des lysats parasitaires est alors ajusté à 5,5 unités de pH par 50 mM d'acétate d'ammonium pH 5,2 final. Les échantillons sont alors incubés 16 h avec l'EndoH (1µL d'enzyme pour 9 µL d'échantillon) ou de l'eau (1µL d'eau pour 9 µL d'échantillon). Les échantillons sont ensuite repris par du tampon 2X SDS et analysés par électrophorèse en gel d'acrylamide suivi d'un Western Blot en utilisant un anticorps antiAMA1 de souris.

F. Séparation des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide.

Les échantillons parasitaires sont analysés en SDS-PAGE dans du tampon de reprise [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2% (p/v) ; saccharose 10% (p/v) ; bleu de bromophénol 0,2% (p/v)] et chauffés à 100°C pendant 5 min. Sous condition réductrice, du DTT à 0,1 M final est ajouté avant de chauffer les échantillons.

Les gels de polyacrylamide sont préparés selon la méthode de Laemmli. Le gel inférieur est de 10% ou 13% de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide, 29/1 , Tris-HCl 375 mM pH 8,8 , SDS 0,01% , Persulfate d'Ammonium (APS) 0,5% , Temed 0,05%) et le gel supérieur est de 5% de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide, 29/1, 5% , Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,01% , APS 0,75% , Temed 0,075%). Le gel est monté entre une plaque d'alumine et une plaque de verre puis introduit dans le système Mighty Small SE250 (Hoefer).

Des grands gels préparatifs pour les expériences de protéomique et glycomique ont été réalisés en utilisant des plaques plus grandes qui sont lavé au SDS 2% (p/v) sur la nuit puis rincer à l'eau double distillé et à l'alcool technique (éthanol) à 95%. Après séchage sous un PSM, toutes les

solutions nécessaires à la composition de ces gels sont faites de manière à limiter la présence de kératine humaine et d'autres protéines contaminantes.

Des marqueurs de poids moléculaire sont également déposés dans ces gels d'acrylamide pour l'identification des protéines d'intérêts. Les conditions d'électrophorèse sont les suivantes, un courant constant de 30 mA dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3 , SDS 0,1% , glycine 192 mM jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. La migration de ces grands gels se fait à 4 mA sur la nuit.

G. Electrotransfert et Immuno-empreinte (« Western Blot »).

Les protéines du gel d'électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,2 µm (Hybond, Amersham Biosciences). Le gel est placé sur la membrane de nitrocellulose et inséré entre deux feuilles de papier Whatmann. L'ensemble est au préalable imprégné du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM , glycine 190 mM , éthanol 20% , pH 8,3-8,5). Le transfert est réalisé à un voltage constant de 80 V pendant 1 h pour les minigels alors que les grands gels d'acrylamide sont transférés dans des conditions semi-séche dans du tampon Tris-HCl 25 mM, glycine 250 mM et éthanol 15% (v/v). Ce dernier est placé sur la membrane de nitrocellulose et inséré entre six feuilles de papier Whatmann. Ce transfert est effectué à raison de 1,1 mA/cm^2 de membrane de nitrocellulose pendant 1 h 15 min. La membrane est ensuite colorée au rouge Ponceau (rouge Ponceau 0,2% , acide trichloracétique 3%) puis décolorée avec de l'eau stérile. La membrane est ensuite saturée pendant 30 min par du TNT (Tris-HCl 15 mM pH 8 , NaCl 140 mM , Tween-20 0,05%) contenant 5% de lait écrémé (Régilait™). Les anticorps monoclonaux ou polyclonaux sont utilisés à différentes dilutions (souris αRON1 au 1/1000 ; lapin αRON2 au 1/500 ; souris αAMA1 au 1/200 ; souris αROP2/3/4 au 1/500 ; souris αGRA au 1/500 ; souris αMIC au 1/500 ; souris αHA.11 au 1/1000 ; lapin αGAP45 au 1/5000 ; lapin αMLC1 au 1/2000 ; lapin αMyoA au 1/1000 ; souris αAct au 1/500) et incubés avec la membrane dans du TNT-lait pendant 1h à température ambiante. Après trois lavages de 10 min chacun par du TNT, les anticorps secondaire anti IgG de souris ou de lapin, selon l'anticorps primaire utilisé, couplés à la peroxydase (Sigma) dilué au 1/10000, sont ajoutés dans du TNT-lait et incubés pendant 1h. Après trois lavages de 10 min, la membrane est incubée 5 min avec de l'ECL Plus (Enhanced ChemiLuminescence Plus Western Blotting Detection System, Amerscham Biosciences).

V. Biologie cellulaire

A. Traitement des parasites à la tunicamycine

Les parasites intracellulaires de la souche RH, ou exprimant de manière stable TgGAP50wt-HAFLAG ou TgGAP50 N_101_136_228-AAA-HAFLAG, sont traités à la tunicamycine (Sigma-Aldrich) pendant 48 h, à une concentration finale de 5 µg/mL et 10 µg/mL. Les parasites sont récupérés après la lyse des cellules HFFs et utilisés pour des tests d'invasion, de prolifération, de « gliding » ou des immuno-empreintes.

B. Test d'invasion et de prolifération

Pour tester l'invasion et la croissance des parasites, trois essais ont été réalisés en parallèle. 150 000 parasites de la souche RH, ou exprimant de manière stable TgGAP50wt-HAFLAG ou TgGAP50 N_101_136_228-AAA-HAFLAG, traités 48 h par la tunicamycine et fraichement sortis des cellules HFFs sont déposés sur des lamelles rondes de microscope recouvertes d'un tapis de cellules HFFs confluentes. D'autres parasites de ces souches, non-traités par la tunicamycine, sont déposés sur d'autres lamelles en parallèle. 24h après l'infection, les lamelles sont fixées au PAF 4% et observées en immunofluorescence, grâce à un marquage par l'anticorps antiSAG1. Plusieurs champs sont observés pour comptabiliser au total 500 cellules HFFs et les vacuoles parasitophores visibles dans ces champs d'observations sont dénombrées. Le nombre de parasites par vacuole est également noté. Ces résultats sont reportés sur Microsoft Excel sous forme de graphique.

C. Test de « gliding »

Des parasites de la souche RH, ou exprimant de manière stable TgGAP50wt-HAFLAG ou TgGAP50 N_101_136_228-AAA-HAFLAG, traité à la tunicamycine ou non et fraichement sortis des cellules HFFs sont filtrés et centrifugés à 1000 rpm pendant 10 min à température ambiante. Les culots parasitaires sont repris par du milieu de culture DMEM incomplet contenant de l'Hepes 10 mM et de l'EGTA 1mM. 5.10^6 parasites sont déposés sur des lamelles rondes de microscope préalablement incubées une nuit avec du SVF 50% dans du PBS et 10 min à 37°C dans une étuve à CO^2. Les lamelles avec les parasites sont incubées 15 min à 37°C sous CO^2 puis fixées au PAF 4%. Une immunofluorescence avec un marquage par l'anticorps antiSAG1 utilisé au 1/25 est réalisé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Agop-Nersesian, C., Naissant, B., Ben Rached, F., Rauch, M., Kretzschmar, A., Thiberge, S., Menard, R., Ferguson, D. J., Meissner, M., and Langsley, G. (2009). Rab11A-controlled assembly of the inner membrane complex is required for completion of apicomplexan cytokinesis. PLoS Pathog *5*, e1000270.

Agop-Nersesian, C., Egarter, S., Langsley, G., Foth, B. J., Ferguson, D. J., and Meissner, M. (2010). Biogenesis of the inner membrane complex is dependent on vesicular transport by the alveolate specific GTPase Rab11B. PLoS Pathog *6*, e1001029.

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

Ajioka, J. W., Boothroyd, J. C., Brunk, B. P., Hehl, A., Hillier, L., Manger, I. D., Marra, M., Overton, G. C., Roos, D. S., Wan, K. L*., et al.* (1998). Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. Genome Res *8*, 18-28.

Ajzenberg, D., Cogne, N., Paris, L., Bessieres, M. H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., and Darde, M. L. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J Infect Dis *186*, 684-689.

Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., and Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog *1*, e17.

Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G. B., and Sher, A. (2000). CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. Nat Immunol *1*, 83-87.

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

Allen, M. L., Dobrowolski, J. M., Muller, H., Sibley, L. D., and Mansour, T. E. (1997). Cloning and characterization of actin depolymerizing factor from *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol *88*, 43-52.

Anderson-White, B. R., Ivey, F. D., Cheng, K., Szatanek, T., Lorestani, A., Beckers, C. J., Ferguson, D. J., Sahoo, N., and Gubbels, M. J. (2010). A family of intermediate filament-like proteins is sequentially assembled into the cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. Cell Microbiol.

Andreev, O. A., Saraswat, L. D., Lowey, S., Slaughter, C., and Borejdo, J. (1999). Interaction of the N-terminus of chicken skeletal essential light chain 1 with F-actin. Biochemistry *38*, 2480-2485.

Araujo, F. G., Slifer, T., and Remington, J. S. (1994). Rifabutin is active in murine models of toxoplasmosis. Antimicrob Agents Chemother *38*, 570-575.

B

Banerjee, S., Vishwanath, P., Cui, J., Kelleher, D. J., Gilmore, R., Robbins, P. W., and Samuelson, J. (2007). The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 11676-11681.

Barnes, G., Hansen, W. J., Holcomb, C. L., and Rine, J. (1984). Asparagine-linked glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic analysis of an early step. Mol Cell Biol *4*, 2381-2388.

Barragan, A., Brossier, F., and Sibley, L. D. (2005). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. Cell Microbiol *7*, 561-568.

Baum, J., Tonkin, C. J., Paul, A. S., Rug, M., Smith, B. J., Gould, S. B., Richard, D., Pollard, T. D., and Cowman, A. F. (2008). A malaria parasite formin regulates actin polymerization and localizes to the parasite-erythrocyte moving junction during invasion. Cell Host Microbe *3*, 188-198.

Beaman, M. H., Araujo, F. G., and Remington, J. S. (1994). Protective reconstitution of the SCID mouse against reactivation of toxoplasmic encephalitis. J Infect Dis *169*, 375-383.

Beck, J. R., Rodriguez-Fernandez, I. A., Cruz de Leon, J., Huynh, M. H., Carruthers, V. B., Morrissette, N. S., and Bradley, P. J. (2010). A novel family of *Toxoplasma* IMC proteins displays a hierarchical organization and functions in coordinating parasite division. PLoS Pathog *6*.

Becker, B., and Rusing, M. (2003). Structure of N-glycosidic carbohydrates of secretory proteins of *Tetrahymena thermophila*. J Eukaryot Microbiol *50*, 235-239.

Bement, W. M., and Mooseker, M. S. (1995). TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. Cell Motil Cytoskeleton *31*, 87-92.

Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J., and Denkers, E. Y. (2003). Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. J Immunol *171*, 6052-6058.

Bergman, L. W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T. M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenzweig, V., and Kappe, S. H. (2003). Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of *Plasmodium* sporozoites. J Cell Sci *116*, 39-49.

Berhe, S., Gerold, P., Kedees, M. H., Holder, A. A., and Schwarz, R. T. (2000). *Plasmodium falciparum*: merozoite surface proteins 1 and 2 are not posttranslationally modified by classical N- or O-glycans. Exp Parasitol *94*, 194-197.

Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J. F., and Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. PLoS Pathog *5*, e1000309.

Bliss, S. K., Zhang, Y., and Denkers, E. Y. (1999). Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. J Immunol *163*, 2081-2088.

Bloom, J. W., Madanat, M. S., and Ray, M. K. (1996). Cell line and site specific comparative analysis of the N-linked oligosaccharides on human ICAM-1des454-532 by electrospray ionization mass spectrometry. Biochemistry *35*, 1856-1864.

Blumenschein, T. M., Friedrich, N., Childs, R. A., Saouros, S., Carpenter, E. P., Campanero-Rhodes, M. A., Simpson, P., Chai, W., Koutroukides, T., Blackman, M. J.*, et al.* (2007). Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. Embo J *26*, 2808-2820.

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

Boothroyd, J. C., and Grigg, M. E. (2002). Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? Curr Opin Microbiol *5*, 438-442.

Boothroyd, J. C., and Dubremetz, J. F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. Nat Rev Microbiol *6*, 79-88.

Bosch, M., Trombetta, S., Engstrom, U., and Parodi, A. J. (1988). Characterization of dolichol diphosphate oligosaccharide: protein oligosaccharyltransferase and glycoprotein-processing glucosidases occurring in trypanosomatid protozoa. J Biol Chem *263*, 17360-17365.

Bosch, J., Buscaglia, C. A., Krumm, B., Ingason, B. P., Lucas, R., Roach, C., Cardozo, T., Nussenzweig, V., and Hol, W. G. (2007a). Aldolase provides an unusual binding site for thrombospondin-related anonymous protein in the invasion machinery of the malaria parasite. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 7015-7020.

Bosch, J., Turley, S., Roach, C. M., Daly, T. M., Bergman, L. W., and Hol, W. G. (2007b). The closed MTIP-myosin A-tail complex from the malaria parasite invasion machinery. J Mol Biol *372*, 77-88.

Bradley, P. J., Hsieh, C. L., and Boothroyd, J. C. (2002). Unprocessed *Toxoplasma* ROP1 is effectively targeted and secreted into the nascent parasitophorous vacuole. Mol Biochem Parasitol *125*, 189-193.

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., and 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., and Hakimi, M. A. (2009). The small ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating system of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol *39*, 81-90.

Breinich, M. S., Ferguson, D. J., Foth, B. J., van Dooren, G. G., Lebrun, M., Quon, D. V., Striepen, B., Bradley, P. J., Frischknecht, F., Carruthers, V. B., and Meissner, M. (2009). A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. Curr Biol *19*, 277-286.

Brinkmann, V., Remington, J. S., and Sharma, S. D. (1993). Vaccination of mice with the protective F3G3 antigen of *Toxoplasma gondii* activates CD4+ but not CD8+ T cells and induces *Toxoplasma* specific IgG antibody. Mol Immunol *30*, 353-358.

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

Buguliskis, J. S., Brossier, F., Shuman, J., and Sibley, L. D. (2010). Rhomboid 4 (ROM4) affects the processing of surface adhesins and facilitates host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog *6*, e1000858.

Bullen, H. E., Tonkin, C. J., O'Donnell, R. A., Tham, W. H., Papenfuss, A. T., Gould, S., Cowman, A. F., Crabb, B. S., and Gilson, P. R. (2009). A novel family of Apicomplexan glideosome-associated proteins with an inner membrane-anchoring role. J Biol Chem *284*, 25353-25363.

Buscaglia, C. A., Coppens, I., Hol, W. G., and Nussenzweig, V. (2003). Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in plasmodium. Mol Biol Cell *14*, 4947-4957.

Butcher, B. A., Kim, L., Johnson, P. F., and Denkers, E. Y. (2001). *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. J Immunol *167*, 2193-2201.

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

C

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

Caldas, L. A., de Souza, W., and Attias, M. (2007). Calcium ionophore-induced egress of *Toxoplasma gondii* shortly after host cell invasion. Vet Parasitol *147*, 210-220.

Callahan, H. L., Kelley, C., Pereira, T., and Grogl, M. (1996). Microtubule inhibitors: structure-activity analyses suggest rational models to identify potentially active compounds. Antimicrob Agents Chemother *40*, 947-952.

Caramelo, J. J., Castro, O. A., Alonso, L. G., De Prat-Gay, G., and Parodi, A. J. (2003). UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 86-91.

Caramelo, J. J., and Parodi, A. J. (2007). How sugars convey information on protein conformation in the endoplasmic reticulum. Semin Cell Dev Biol *18*, 732-742.

Carey, K. L., Jongco, A. M., Kim, K., and Ward, G. E. (2004a). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP4 is secreted into the parasitophorous vacuole and becomes phosphorylated in infected cells. Eukaryot Cell *3*, 1320-1330.

Carey, K. L., Westwood, N. J., Mitchison, T. J., and Ward, G. E. (2004b). A small-molecule approach to studying invasive mechanisms of *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 7433-7438.

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

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

Carruthers, V. B., Giddings, O. K., and Sibley, L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. Cell Microbiol *1*, 225-235.

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

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

Cerede, O., Dubremetz, J. F., Bout, D., and Lebrun, M. (2002). The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. Embo J *21*, 2526-2536.

Cerede, O., Dubremetz, J. F., Soete, M., Deslee, D., Vial, H., Bout, D., and Lebrun, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. J Exp Med *201*, 453-463.

Cesbron-Delauw, M. F., Lecordier, L., and Mercier, C. (1996). Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. Curr Top Microbiol Immunol *219*, 59-65.

Cevallos, A. M., Zhang, X., Waldor, M. K., Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M. R., and Ward, H. D. (2000). Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. Infect Immun *68*, 4108-4116.

Chaturvedi, S., Qi, H., Coleman, D., Rodriguez, A., Hanson, P. I., Striepen, B., Roos, D. S., and Joiner, K. A. (1999). Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. J Biol Chem *274*, 2424-2431.

Chavan, M., and Lennarz, W. (2006). The molecular basis of coupling of translocation and N-glycosylation. Trends Biochem Sci *31*, 17-20.

Chia, C. P., Gomathinayagam, S., Schmaltz, R. J., and Smoyer, L. K. (2005). Glycoprotein gp130 of *Dictyostelium discoideum* influences macropinocytosis and adhesion. Mol Biol Cell *16*, 2681-2693.

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

Christodoulou, J., Malmendal, A., Harper, J. F., and Chazin, W. J. (2004). Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. J Biol Chem *279*, 29092-29100.

Coppens, I., Dunn, J. D., Romano, J. D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J. C., and Joiner, K. A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. Cell *125*, 261-274.

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

Coppens, I., and Joiner, K. A. (2003). Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. Mol Biol Cell *14*, 3804-3820.

Coppens, I., and Vielemeyer, O. (2005). Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. Int J Parasitol *35*, 597-615.

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

Courret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gatel, D., and Tardieux, I. (2006). CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. Blood *107*, 309-316.

D

Daher, W., Plattner, F., Carlier, M. F., and Soldati-Favre, D. (2010). Concerted action of two formins in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog *6*.

de Carvalho, L., Souto-Padron, T., and de Souza, W. (1991). Localization of lectin-binding sites and sugar-binding proteins in tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol *77*, 156-161.

de la Canal, L., and Parodi, A. J. (1987). Synthesis of dolichol derivatives in trypanosomatids. Characterization of enzymatic patterns. J Biol Chem *262*, 11128-11133.

Deans, J. A., Knight, A. M., Jean, W. C., Waters, A. P., Cohen, S., and Mitchell, G. H. (1988). Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. Parasite Immunol *10*, 535-552.

Dempski, R. E., Jr., and Imperiali, B. (2002). Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. Curr Opin Chem Biol *6*, 844-850.

D'Haese, J., Mehlhorn, H., and Peters, W. (1977). Comparative electron microscope study of pellicular structures in coccidia (*Sarcocystis, Besnoitia* and *Eimeria*). Int J Parasitol *7*, 505-518.

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

Diana, J., Vincent, C., Peyron, F., Picot, S., Schmitt, D., and Persat, F. (2005). *Toxoplasma gondii* regulates recruitment and migration of human dendritic cells via different soluble secreted factors. Clin Exp Immunol *141*, 475-484.

Dieckmann-Schuppert, A., Bender, S., Odenthal-Schnittler, M., Bause, E., and Schwarz, R. T. (1992). Apparent lack of N-glycosylation in the asexual intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. Eur J Biochem *205*, 815-825.

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

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

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

Donahue, C. G., Carruthers, V. B., Gilk, S. D., and Ward, G. E. (2000). The *Toxoplasma* homolog of *Plasmodium* apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. Mol Biochem Parasitol *111*, 15-30.

Dowse, T. J., Pascall, J. C., Brown, K. D., and Soldati, D. (2005). Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. Int J Parasitol *35*, 747-756.

Dubey, J. P., Speer, C. A., Shen, S. K., Kwok, O. C., and Blixt, J. A. (1997). Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. J Parasitol *83*, 870-882.

Dubey, J. P. (2007). The life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma,* molecular and cellular biology Ajioka, J. W., Soldati, D. Ed Horizon Bioscience. *ISBN 978-1-904933-34-2*, 3-16.

Dubremetz, J. F. (1973). Ultrastructural study of schizogonic mitosis in the coccidian, Eimeria necatrix (Johnson 1930). J Ultrastruct Res *42*, 354-376.

Dubremetz, J. F., and Torpier, G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). J Ultrastruct Res *62*, 94-109.

Dubremetz, J. F., Rodriguez, C., and Ferreira, E. (1985). *Toxoplasma gondii*: redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. Exp Parasitol *59*, 24-32.

Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D., and Joiner, K. A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. Parasitol Res *79*, 402-408.

Dubremetz, J. F. (1998). Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Trends Microbiol *6*, 27-30.

Dubremetz, J. F. (2007). Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. Cell Microbiol *9*, 841-848.

Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M. F., and 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.

E

El Hajj, H., Demey, E., Poncet, J., Lebrun, M., Wu, B., Galeotti, N., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Vial, H., Labesse, G., and 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., and Dubremetz, J. F. (2007a). ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog *3*, e14.

El Hajj, H., Lebrun, M., Fourmaux, M. N., Vial, H., and Dubremetz, J. F. (2007b). Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 rhoptry protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane. Cell Microbiol *9*, 54-64.

El Hajj, H., Papoin, J., Cerede, O., Garcia-Reguet, N., Soete, M., Dubremetz, J. F., and Lebrun, M. (2008). Molecular signals in the trafficking of *Toxoplasma gondii* protein MIC3 to the micronemes. Eukaryot Cell *7*, 1019-1028.

Entzeroth, R., Kerckhoff, H., and Konig, A. (1992). Microneme secretion in Coccidia: confocal laser scanning and electron microscope study of Sarcocystis muris in cell culture. Eur J Cell Biol *59*, 405-413.

Eschenbacher, K. H., Sommer, I., Meyer, H. E., Mehlhorn, H., and Ruger, W. (1992). Cloning and expression in Escherichia coli of cDNAs encoding a 31-kilodalton surface antigen of Sarcocystis muris. Mol Biochem Parasitol *53*, 159-167.

F

Fauquenoy, S., Morelle, W., Hovasse, A., Bednarczyk, A., Slomianny, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Tomavo, S. (2008). Proteomics and glycomics analyses of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*--host cell interactions. Mol Cell Proteomics *7*, 891-910.

Feasley, C. L., Johnson, J. M., West, C. M., and Chia, C. P. (2010). Glycopeptidome of a heavily N-glycosylated cell surface glycoprotein of Dictyostelium implicated in cell adhesion. J Proteome Res *9*, 3495-3510.

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

Foussard, F., Gallois, Y., Tronchin, G., Robert, R., and Mauras, G. (1990). Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition. Parasitol Res *76*, 563-565.

Foussard, F., Leriche, M. A., and Dubremetz, J. F. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. Parasitology *102 Pt 3*, 367-370.

Frénal, K. and Soldati-Favre, D. (2009). Role of the Parasite and Host Cytoskeleton in Apicomplexa Parasitism. Cell Host Microbe *5*, 602-611.

Frenkel, J. K., and Dubey, J. P. (1972). Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. J Infect Dis *126*, 664-673.

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

Frickel, E. M., Sahoo, N., Hopp, J., Gubbels, M. J., Craver, M. P., Knoll, L. J., Ploegh, H. L., and Grotenbreg, G. M. (2008). Parasite stage-specific recognition of endogenous *Toxoplasma gondii*-derived CD8+ T cell epitopes. J Infect Dis *198*, 1625-1633.

Fricker-Hidalgo, H., Pelloux, H., Bost, M., Goullier-Fleuret, A., and Ambroise-Thomas, P. (1996). Congenital toxoplasmosis: contribution of postnatal biological follow-up. Presse Med *25*, 1868-1872.

Fuchs, N., Sonda, K., Butikofer, P., and Hemphill, A. (1999). Detection of surface-associated and intracellular glycoconjugates and glycoproteins in *Neospora caninum* tachyzoites. Int J Parasitol *29*, 1597-1611.

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

Funk, V. A., Thomas-Oates, J. E., Kielland, S. L., Bates, P. A., and Olafson, R. W. (1997). A unique, terminally glucosylated oligosaccharide is a common feature on Leishmania cell surfaces. Mol Biochem Parasitol *84*, 33-48.

G

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

Garenaux, E., Shams-Eldin, H., Chirat, F., Bieker, U., Schmidt, J., Michalski, J. C., Cacan, R., Guerardel, Y., and Schwarz, R. T. (2008). The dual origin of *Toxoplasma gondii* N-glycans. Biochemistry *47*, 12270-12276.

Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., and Beckers, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. J Cell Biol *165*, 383-393.

Gavin, R. H. (1997). Microtubule-microfilament synergy in the cytoskeleton. Int Rev Cytol *173*, 207-242.

Gavrilescu, L. C., and Denkers, E. Y. (2003). Interleukin-12 p40- and Fas ligand-dependent apoptotic pathways involving STAT-1 phosphorylation are triggered during infection with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun *71*, 2577-2583.

Gazzinelli, R. T., Hakim, F. T., Hieny, S., Shearer, G. M., and Sher, A. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol *146*, 286-292.

Gazzinelli, R. T., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A., and Sher, A. (1992). Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol *149*, 175-180.

Gazzinelli, R. T., Hieny, S., Wynn, T. A., Wolf, S., and Sher, A. (1993). Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 6115-6119.

Gibbs, B. S., and Coward, J. K. (1999). Dolichylpyrophosphate oligosaccharides: large-scale isolation and evaluation as oligosaccharyltransferase substrates. Bioorg Med Chem *7*, 441-447.

Gilk, S. D., Raviv, Y., Hu, K., Murray, J. M., Beckers, C. J., and Ward, G. E. (2006). Identification of PhIL1, a novel cytoskeletal protein of the *Toxoplasma gondii* pellicle, through photosensitized labeling with 5-[125I]iodonaphthalene-1-azide. Eukaryot Cell *5*, 1622-1634.

Gilk, S. D., Gaskins, E., Ward, G. E., and Beckers, C. J. (2009). GAP45 phosphorylation controls assembly of the *Toxoplasma* myosin XIV complex. Eukaryot Cell *8*, 190-196.

Gonzalez, V., Combe, A., David, V., Malmquist, N. A., Delorme, V., Leroy, C., Blazquez, S., Menard, R., and Tardieux, I. (2009). Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. Cell Host Microbe *5*, 259-272.

Gordon, J. L., Beatty, W. L., and Sibley, L. D. (2008). A novel actin-related protein is associated with daughter cell formation in *Toxoplasma gondii*. Eukaryot Cell *7*, 1500-1512.

Gordon, J. L., Buguliskis, J. S., Buske, P. J., and Sibley, L. D. (2010). Actin-like protein 1 (ALP1) is a component of dynamic, high molecular weight complexes in *Toxoplasma gondii*. Cytoskeleton (Hoboken) *67*, 23-31.

Gould, S. B., Tham, W. H., Cowman, A. F., McFadden, G. I., and Waller, R. F. (2008). Alveolins, a new family of cortical proteins that define the protist infrakingdom Alveolata. Mol Biol Evol *25*, 1219-1230.

Gowda, D. C., Gupta, P., and Davidson, E. A. (1997). Glycosylphosphatidylinositol anchors represent the major carbohydrate modification in proteins of intraerythrocytic stage *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem *272*, 6428-6439.

Green, J. L., Rees-Channer, R. R., Howell, S. A., Martin, S. R., Knuepfer, E., Taylor, H. M., Grainger, M., and Holder, A. A. (2008). The motor complex of *Plasmodium falciparum*: phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase. J Biol Chem *283*, 30980-30989.

Grimwood, J., and Smith, J. E. (1995). *Toxoplasma gondii*: redistribution of tachyzoite surface protein during host cell invasion and intracellular development. Parasitol Res *81*, 657-661.

Grimwood, J., and Smith, J. E. (1996). *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. Int J Parasitol *26*, 169-173.

Gubbels, M. J., Wieffer, M., and Striepen, B. (2004). Fluorescent protein tagging in *Toxoplasma gondii*: identification of a novel inner membrane complex component conserved among Apicomplexa. Mol Biochem Parasitol *137*, 99-110.

Gubbels, M. J., Vaishnava, S., Boot, N., Dubremetz, J. F., and Striepen, B. (2006). A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. J Cell Sci *119*, 2236-2245.

Gustafson, P. V., Agar, H. D., and Cramer, D. I. (1954). An electron microscope study of *Toxoplasma*. Am J Trop Med Hyg *3*, 1008-1022.

H

Hager, K. M., Striepen, B., Tilney, L. G., and Roos, D. S. (1999). The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci *112 (Pt 16)*, 2631-2638.

Hakansson, S., Morisaki, H., Heuser, J., and Sibley, L. D. (1999). Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. Mol Biol Cell *10*, 3539-3547.

Halonen, S. K., and Weidner, E. (1994). Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. J Eukaryot Microbiol *41*, 65-71.

Harper, J. M., Zhou, X. W., Pszenny, V., Kafsack, B. F., and Carruthers, V. B. (2004). The novel coccidian micronemal protein MIC11 undergoes proteolytic maturation by sequential cleavage to remove an internal propeptide. Int J Parasitol *34*, 1047-1058.

Harper, J. M., Huynh, M. H., Coppens, I., Parussini, F., Moreno, S., and Carruthers, V. B. (2006). A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. Mol Biol Cell *17*, 4551-4563.

Hartmann, J., Hu, K., He, C. Y., Pelletier, L., Roos, D. S., and Warren, G. (2006). Golgi and centrosome cycles in *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol *145*, 125-127.

He, C. Y., Shaw, M. K., Pletcher, C. H., Striepen, B., Tilney, L. G., and Roos, D. S. (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Embo J *20*, 330-339.

He, X. L., Grigg, M. E., Boothroyd, J. C., and Garcia, K. C. (2002). Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. Nat Struct Biol *9*, 606-611.

Heaslip, A. T., Ems-McClung, S. C., and Hu, K. (2009). TgICMAP1 is a novel microtubule binding protein in *Toxoplasma gondii*. PLoS One *4*, e7406.

Heaslip, A. T., Leung, J. M., Carey, K. L., Catti, F., Warshaw, D. M., Westwood, N. J., Ballif, B. A., and Ward, G. E. (2010). A small-molecule inhibitor of *T. gondii* motility induces the posttranslational modification of myosin light chain-1 and inhibits myosin motor activity. PLoS Pathog *6*, e1000720.

Hehl, A. B., Lekutis, C., Grigg, M. E., Bradley, P. J., Dubremetz, J. F., Ortega-Barria, E., and Boothroyd, J. C. (2000). *Toxoplasma gondii* homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. Infect Immun *68*, 7078-7086.

Heintzelman, M. B., and Schwartzman, J. D. (1997). A novel class of unconventional myosins from *Toxoplasma gondii*. J Mol Biol *271*, 139-146.

Heiss, K., Nie, H., Kumar, S., Daly, T. M., Bergman, L. W., and Matuschewski, K. (2008). Functional characterization of a redundant *Plasmodium* TRAP family invasin, TRAP-like protein, by aldolase binding and a genetic complementation test. Eukaryot Cell *7*, 1062-1070.

Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu Rev Biochem *73*, 1019-1049.

Hemphill, A., Felleisen, R., Connolly, B., Gottstein, B., Hentrich, B., and Muller, N. (1997a). Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. Parasitology *115 (Pt 6)*, 581-590.

Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B., and Hentrich, B. (1997b). Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. Parasitology *115 (Pt 4)*, 371-380.

Herion, P., Hernandez-Pando, R., Dubremetz, J. F., and Saavedra, R. (1993). Subcellular localization of the 54-kDa antigen of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol *79*, 216-222.

Herm-Gotz, A., Weiss, S., Stratmann, R., Fujita-Becker, S., Ruff, C., Meyhofer, E., Soldati, T., Manstein, D. J., Geeves, M. A., and Soldati, D. (2002). *Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. Embo J *21*, 2149-2158.

Hese, K., Otto, C., Routier, F. H., and Lehle, L. (2009). The yeast oligosaccharyltransferase complex can be replaced by STT3 from *Leishmania major*. Glycobiology *19*, 160-171.

Hettmann, C., Herm, A., Geiter, A., Frank, B., Schwarz, E., Soldati, T., and Soldati, D. (2000). A dibasic motif in the tail of a class XIV apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. Mol Biol Cell *11*, 1385-1400.

Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. Annu Rev Biochem *70*, 649-676.

Hitziger, N., Dellacasa, I., Albiger, B., and 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.

Hoff, E. F., Cook, S. H., Sherman, G. D., Harper, J. M., Ferguson, D. J., Dubremetz, J. F., and Carruthers, V. B. (2001). *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10. Exp Parasitol *97*, 77-88.

Hogan, J. C., Jr., and Patton, C. L. (1976). Variation in intramembrane components of *Trypanosoma brucei* from intact and x-irradiated rats: a freeze-cleave study. J Protozool *23*, 205-215.

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

Howe, D. K., Honore, S., Derouin, F., and Sibley, L. D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microbiol *35*, 1411-1414.

Howell, S. A., Hackett, F., Jongco, A. M., Withers-Martinez, C., Kim, K., Carruthers, V. B., and Blackman, M. J. (2005). Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. Mol Microbiol *57*, 1342-1356.

Hu, K., Mann, T., Striepen, B., Beckers, C. J., Roos, D. S., and Murray, J. M. (2002a). Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Mol Biol Cell *13*, 593-606.

Hu, K., Roos, D. S., and Murray, J. M. (2002b). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. J Cell Biol *156*, 1039-1050.

Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D. S., and Murray, J. M. (2006). Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog *2*, e13.

Hu, K. (2008). Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog *4*, e10.

Hunter, C. A., Abrams, J. S., Beaman, M. H., and Remington, J. S. (1993). Cytokine mRNA in the central nervous system of SCID mice infected with *Toxoplasma gondii*: importance of T-cell-independent regulation of resistance to *T. gondii*. Infect Immun *61*, 4038-4044.

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

Hutchison, W. M. (1965). Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature *206*, 961-962.

Huynh, M. H., Rabenau, K. E., Harper, J. M., Beatty, W. L., Sibley, L. D., and Carruthers, V. B. (2003). Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. Embo J *22*, 2082-2090.

Huynh, M. H., Opitz, C., Kwok, L. Y., Tomley, F. M., Carruthers, V. B., and Soldati, D. (2004). Trans-genera reconstitution and complementation of an adhesion complex in *Toxoplasma gondii*. Cell Microbiol *6*, 771-782.

Huynh, M. H., and Carruthers, V. B. (2006). *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. PLoS Pathog *2*, e84.

Huynh, M. H., Harper, J. M., and Carruthers, V. B. (2006). Preparing for an invasion: charting the pathway of adhesion proteins to *Toxoplasma* micronemes. Parasitol Res *98*, 389-395.

I

Ilg, T., Stierhof, Y. D., Etges, R., Adrian, M., Harbecke, D., and Overath, P. (1991). Secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*: a filamentous phosphoglycoprotein polymer. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 8774-8778.

Israelski, D. M., Chmiel, J. S., Poggensee, L., Phair, J. P., and Remington, J. S. (1993). Prevalence of *Toxoplasma* infection in a cohort of homosexual men at risk of AIDS and toxoplasmic encephalitis. J Acquir Immune Defic Syndr *6*, 414-418.

Izquierdo, L., Schulz, B. L., Rodrigues, J. A., Guther, M. L., Procter, J. B., Barton, G. J., Aebi, M., and Ferguson, M. A. (2009). Distinct donor and acceptor specificities of *Trypanosoma brucei* oligosaccharyltransferases. Embo J *28*, 2650-2661.

J

Jacquet, A., Coulon, L., De Neve, J., Daminet, V., Haumont, M., Garcia, L., Bollen, A., Jurado, M., and Biemans, R. (2001). The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. Mol Biochem Parasitol *116*, 35-44.

Jaeken, J., and Matthijs, G. (2007). Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. Annu Rev Genomics Hum Genet *8*, 261-278.

Jan, G., Delorme, V., Saksouk, N., Abrivard, M., Gonzalez, V., Cayla, X., Hakimi, M. A., and Tardieux, I. (2009). A *Toxoplasma* type 2C serine-threonine phosphatase is involved in parasite growth in the mammalian host cell. Microbes Infect *11*, 935-945.

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

Jewett, T. J., and Sibley, L. D. (2004). The *Toxoplasma* proteins MIC2 and M2AP form a hexameric complex necessary for intracellular survival. J Biol Chem *279*, 9362-9369.

Joet, T., Holterman, L., Stedman, T. T., Kocken, C. H., Van Der Wel, A., Thomas, A. W., and Krishna, S. (2002). Comparative characterization of hexose transporters of *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium yoelii* and *Toxoplasma gondii* highlights functional differences within the apicomplexan family. Biochem J *368*, 923-929.

Johnson, L. L. (1992). SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. Infect Immun *60*, 3719-3724.

Johnson, T. M., Rajfur, Z., Jacobson, K., and Beckers, C. J. (2007). Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. Mol Biol Cell *18*, 3039-3046.

Joiner, K. A., Fuhrman, S. A., Miettinen, H. M., Kasper, L. H., and Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. Science *249*, 641-646.

Joiner, K. A., and Roos, D. S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. J Cell Biol *157*, 557-563.

Jones, J., Krag, S. S., and Betenbaugh, M. J. (2005). Controlling N-linked glycan site occupancy. Biochim Biophys Acta *1726*, 121-137.

Jones, M. L., Cottingham, C., and Rayner, J. C. (2009). Effects of calcium signaling on *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion and post-translational modification of gliding-associated protein 45 (PfGAP45). Mol Biochem Parasitol *168*, 55-62.

Jones, T. C., Yeh, S., and Hirsch, J. G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. J Exp Med *136*, 1157-1172.

Jung, C., Lee, C. Y., and Grigg, M. E. (2004). The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. Int J Parasitol *34*, 285-296.

K

Kamm, K. E., and Stull, J. T. (2001). Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. J Biol Chem *276*, 4527-4530.

Kang, H., Remington, J. S., and Suzuki, Y. (2000). Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. J Immunol *164*, 2629-2634.

Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., and Menard, R. (1999). Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. J Cell Biol *147*, 937-944.

Kapperud, G., Jenum, P. A., Stray-Pedersen, B., Melby, K. K., Eskild, A., and Eng, J. (1996). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. Am J Epidemiol *144*, 405-412.

Karaoglu, D., Kelleher, D. J., and Gilmore, R. (2001). Allosteric regulation provides a molecular mechanism for preferential utilization of the fully assembled dolichol-linked oligosaccharide by the yeast oligosaccharyltransferase. Biochemistry *40*, 12193-12206.

Karsten, V., Qi, H., Beckers, C. J., Reddy, A., Dubremetz, J. F., Webster, P., and Joiner, K. A. (1998). The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. J Cell Biol *141*, 1323-1333.

Kawase, O., Nishikawa, Y., Bannai, H., Igarashi, M., Matsuo, T., and Xuan, X. (2010). Characterization of a novel thrombospondin-related protein in *Toxoplasma gondii*. Parasitol Int *59*, 211-216.

Keeley, A., and Soldati, D. (2004). The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. Trends Cell Biol *14*, 528-532.

Kelleher, D. J., Karaoglu, D., Mandon, E. C., and Gilmore, R. (2003). Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. Mol Cell *12*, 101-111.

Kelleher, D. J., and Gilmore, R. (2006). An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. Glycobiology *16*, 47R-62R.

Kelleher, D. J., Banerjee, S., Cura, A. J., Samuelson, J., and Gilmore, R. (2007). Dolichol-linked oligosaccharide selection by the oligosaccharyltransferase in protist and fungal organisms. J Cell Biol *177*, 29-37.

Kessler, H., Herm-Gotz, A., Hegge, S., Rauch, M., Soldati-Favre, D., Frischknecht, F., and Meissner, M. (2008). Microneme protein 8--a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci *121*, 947-956.

Khater, E. I., Sinden, R. E., and Dessens, J. T. (2004). A malaria membrane skeletal protein is essential for normal morphogenesis, motility, and infectivity of sporozoites. J Cell Biol *167*, 425-432.

Kieschnick, H., Wakefield, T., Narducci, C. A., and Beckers, C. (2001). *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. J Biol Chem *276*, 12369-12377.

Kim, K., Bulow, R., Kampmeier, J., and Boothroyd, J. C. (1994). Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma* antigen SAG1 (p30) in CHO cells. Infect Immun *62*, 203-209.

Kim, S. K., and Boothroyd, J. C. (2005). Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. J Immunol *174*, 8038-8048.

Kim, L., Del Rio, L., Butcher, B. A., Mogensen, T. H., Paludan, S. R., Flavell, R. A., and Denkers, E. Y. (2005). p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. J Immunol *174*, 4178-4184.

Kimura, E. A., Couto, A. S., Peres, V. J., Casal, O. L., and Katzin, A. M. (1996). N-linked glycoproteins are related to schizogony of the intraerythrocytic stage in *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem *271*, 14452-14461.

Kimura, E. A., Katzin, A. M., and Couto, A. S. (2000). More on protein glycosylation in the malaria parasite. Parasitol Today *16*, 38-40.

Kink, J. A., and Chang, K. P. (1988). N-glycosylation as a biochemical basis for virulence in *Leishmania mexicana amazonensis*. Mol Biochem Parasitol *27*, 181-190.

Knoll, L. J., and Boothroyd, J. C. (1998). Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. Mol Cell Biol *18*, 807-814.

Kohler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D., and Roos, D. S. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. Science *275*, 1485-1489.

Kukuruzinska, M. A., and Lennon, K. (1998). Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. Crit Rev Oral Biol Med *9*, 415-448.

Kursula, I., Kursula, P., Ganter, M., Panjikar, S., Matuschewski, K., and Schuler, H. (2008). Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of *Plasmodium falciparum*. Structure *16*, 1638-1648.

L

Labruyere, E., Lingnau, M., Mercier, C., and 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.

Lagal, V., Binder, E. M., Huynh, M. H., Kafsack, B. F., Harris, P. K., Diez, R., Chen, D., Cole, R. N., Carruthers, V. B., and Kim, K. (2010). *Toxoplasma gondii* protease TgSUB1 is required for cell surface processing of micronemal adhesive complexes and efficient adhesion of tachyzoites. Cell Microbiol.

Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., Lebrun, M. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in the moving junction-dependent invasion by Apicomplexa parasites, article soumis

Langsley, G., van Noort, V., Carret, C., Meissner, M., de Villiers, E. P., Bishop, R., and Pain, A. (2008). Comparative genomics of the Rab protein family in Apicomplexan parasites. Microbes Infect *10*, 462-470.

Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P. J., Vial, H., and Dubremetz, J. F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. Cell Microbiol *7*, 1823-1833.

Lefort-Tran, M., Bre, M. H., Ranck, J. L., and Pouphile, M. (1980). Euglena plasma membrane during normal and vitamin B12 starvation growth. J Cell Sci *41*, 245-261.

Lehle, L., Strahl, S., and Tanner, W. (2006). Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. Angew Chem Int Ed Engl *45*, 6802-6818.

Lekutis, C., Ferguson, D. J., Grigg, M. E., Camps, M., and Boothroyd, J. C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. Int J Parasitol *31*, 1285-1292.

Lemgruber, L., De Souza, W., and Vommaro, R. C. (2008). Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. Micron *39*, 177-183.

Leriche, M. A., and Dubremetz, J. F. (1990). Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. Parasitol Res *76*, 559-562.

Lew, A. E., Dluzewski, A. R., Johnson, A. M., and Pinder, J. C. (2002). Myosins of *Babesia bovis*: molecular characterisation, erythrocyte invasion, and phylogeny. Cell Motil Cytoskeleton *52*, 202-220.

Liendo, A., and Joiner, K. A. (2000). *Toxoplasma gondii*: conserved protein machinery in an unusual secretory pathway? Microbes Infect *2*, 137-144.

Lim, L., Kalanon, M., and McFadden, G. I. (2009). New proteins in the apicoplast membranes: time to rethink apicoplast protein targeting. Trends Parasitol *25*, 197-200.

Lodoen, M. B., Gerke, C., and 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*, 55-66.

Lorestani, A., Sheiner, L., Yang, K., Robertson, S. D., Sahoo, N., Brooks, C. F., Ferguson, D. J., Striepen, B., and Gubbels, M. J. (2010). A *Toxoplasma* MORN1 null mutant undergoes repeated divisions but is defective in basal assembly, apicoplast division and cytokinesis. PLoS One *5*.

Lovett, J. L., Marchesini, N., Moreno, S. N., and Sibley, L. D. (2002). *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. J Biol Chem *277*, 25870-25876.

Luangsay, S., Kasper, L. H., Rachinel, N., Minns, L. A., Mennechet, F. J., Vandewalle, A., and Buzoni-Gatel, D. (2003). CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*-primed CD8 lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells. Gastroenterology *125*, 491-500.

Luder, C. G., Lang, T., Beuerle, B., and Gross, U. (1998). Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*. Clin Exp Immunol *112*, 308-316.

Luft, B. J., and Remington, J. S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis *15*, 211-222.

Luk, F. C., Johnson, T. M., and Beckers, C. J. (2008). N-linked glycosylation of proteins in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol *157*, 169-178.

Lycke, E., Carlberg, K., and Norrby, R. (1975). Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. Infect Immun *11*, 853-861.

M

Magno, R. C., Lemgruber, L., Vommaro, R. C., De Souza, W., and Attias, M. (2005). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. Microsc Res Tech *67*, 45-52.

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

Mann, T., and Beckers, C. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol *115*, 257-268.

Mann, T., Gaskins, E., and Beckers, C. (2002). Proteolytic processing of TgIMC1 during maturation of the membrane skeleton of *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem *277*, 41240-41246.

Manthri, S., Guther, M. L., Izquierdo, L., Acosta-Serrano, A., and Ferguson, M. A. (2008). Deletion of the TbALG3 gene demonstrates site-specific N-glycosylation and N-glycan processing in *Trypanosoma brucei*. Glycobiology *18*, 367-383.

Martin, V., Supanitsky, A., Echeverria, P. C., Litwin, S., Tanos, T., De Roodt, A. R., Guarnera, E. A., and Angel, S. O. (2004). Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol *11*, 704-710.

Mason, N. J., Fiore, J., Kobayashi, T., Masek, K. S., Choi, Y., and Hunter, C. A. (2004). TRAF6-dependent mitogen-activated protein kinase activation differentially regulates the production of interleukin-12 by macrophages in response to *Toxoplasma gondii*. Infect Immun *72*, 5662-5667.

Matthiesen, S. H., Shenoy, S. M., Kim, K., Singer, R. H., and Satir, B. H. (2003). Role of the parafusin orthologue, PRP1, in microneme exocytosis and cell invasion in *Toxoplasma gondii*. Cell Microbiol *5*, 613-624.

McBride, M. J. (2001). Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. Annu Rev Microbiol *55*, 49-75.

McConville, M. J., Mullin, K. A., Ilgoutz, S. C., and Teasdale, R. D. (2002). Secretory pathway of trypanosomatid parasites. Microbiol Mol Biol Rev *66*, 122-154; table of contents.

McCormick, C. J., Tuckwell, D. S., Crisanti, A., Humphries, M. J., and Hollingdale, M. R. (1999). Identification of heparin as a ligand for the A-domain of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related adhesion protein. Mol Biochem Parasitol *100*, 111-124.

McFadden, G. I., Reith, M. E., Munholland, J., and Lang-Unnasch, N. (1996). Plastid in human parasites. Nature *381*, 482.

McGwire, B. S., and Chang, K. P. (1996). Posttranslational regulation of a *Leishmania* HEXXH metalloprotease (gp63). The effects of site-specific mutagenesis of catalytic, zinc binding, N-glycosylation, and glycosyl phosphatidylinositol addition sites on N-terminal end cleavage, intracellular stability, and extracellular exit. J Biol Chem *271*, 7903-7909.

Mehlert, A., Sullivan, L., and Ferguson, M. A. (2010). Glycotyping of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein MITat1.8. Mol Biochem Parasitol *174*, 74-77.

Mehta, S., and Sibley, L. D. (2010). *Toxoplasma gondii* actin depolymerizing factor acts primarily to sequester G-actin. J Biol Chem *285*, 6835-6847.

Meissner, M., Reiss, M., Viebig, N., Carruthers, V. B., Toursel, C., Tomavo, S., Ajioka, J. W., and Soldati, D. (2002a). A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters. J Cell Sci *115*, 563-574.

Meissner, M., Schluter, D., and Soldati, D. (2002b). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. Science *298*, 837-840.

Melo, E. J., Carvalho, T. M., and De Souza, W. (2001). Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. Biocell *25*, 53-59.

Menard, R. (2001). Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. Cell Microbiol *3*, 63-73.

Mencke, N., O'Donoghue, P., Lumb, R., Smith, P., Tenter, A. M., Thummel, P., and Rommel, M. (1991). Antigenic characterisation of monoclonal antibodies against *Sarcocystis muris* by western blotting and immuno-electron microscopy. Parasitol Res *77*, 217-223.

Mercier, C., Dubremetz, J. F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., and Cesbron-Delauw, M. F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. Mol Biol Cell *13*, 2397-2409.

Mercier, C., Adjogble, K. D., Daubener, W., and Delauw, M. F. (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? Int J Parasitol *35*, 829-849.

Mescher, M. F., and Strominger, J. L. (1976). Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*. J Biol Chem *251*, 2005-2014.

Mevelec, M. N., Chardes, T., Mercereau-Puijalon, O., Bourguin, I., Achbarou, A., Dubremetz, J. F., and Bout, D. (1992). Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. Mol Biochem Parasitol *56*, 227-238.

Miller, S. A., Thathy, V., Ajioka, J. W., Blackman, M. J., and Kim, K. (2003). TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase. Mol Microbiol *49*, 883-894.

Mineo, J. R., and Kasper, L. H. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). Exp Parasitol *79*, 11-20.

Mital, J., Meissner, M., Soldati, D., and 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.

Mondragon, R., and Frixione, E. (1996). Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. J Eukaryot Microbiol *43*, 120-127.

Montoya, J. G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. Lancet *363*, 1965-1976.

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

Morisaki, J. H., Heuser, J. E., and Sibley, L. D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. J Cell Sci *108 (Pt 6)*, 2457-2464.

Morrissette, N. S., Murray, J. M., and Roos, D. S. (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci *110 (Pt 1)*, 35-42.

Morrissette, N. S., and Sibley, L. D. (2002a). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. Microbiol Mol Biol Rev *66*, 21-38.

Morrissette, N. S., and Sibley, L. D. (2002b). Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci *115*, 1017-1025.

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

Muller, I. B., Knockel, J., Eschbach, M. L., Bergmann, B., Walter, R. D., and Wrenger, C. (2010). Secretion of an acid phosphatase provides a possible mechanism to acquire host nutrients by *Plasmodium falciparum*. Cell Microbiol *12*, 677-691.

Murray, H. W., Aley, S. B., and Scott, W. A. (1981). Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxygen intermediates. Mol Biochem Parasitol *3*, 381-391.

Murray, H. W., Rubin, B. Y., Carriero, S. M., Harris, A. M., and Jaffee, E. A. (1985). Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. J Immunol *134*, 1982-1988.

N

Naik, R. S., Venkatesan, M., and Gowda, D. C. (2001). *Plasmodium falciparum*: the lethal effects of tunicamycin and mevastatin on the parasite are not mediated by the inhibition of N-linked oligosaccharide biosynthesis. Exp Parasitol *98*, 110-114.

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

Naguleswaran, A., Alaeddine, F., Guionaud, C., Vonlaufen, N., Sonda, S., Jenoe, P., Mevissen, M., and Hemphill, A. (2005). *Neospora caninum* protein disulfide isomerase is involved in tachyzoite-host cell interaction. Int J Parasitol *35*, 1459-1472.

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

Ngo, H. M., Yang, M., Paprotka, K., Pypaert, M., Hoppe, H., and Joiner, K. A. (2003). AP-1 in *Toxoplasma gondii* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment. J Biol Chem *278*, 5343-5352.

Nicholle, C., (1907). Sur une piroplasmose nouvelle d'un rongeur. C. R. Soc. Biol. *63*, 213-213.

Nicholle, C., and Manceaux, L. (1908). Sur un protozoaire nouveau du *gondii*. C. R. Acad. Sci. *148*, 369.

Nichols, B. A., and O'Connor, G. R. (1981). Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. Lab Invest *44*, 324-335.

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

Nichols, B. A., Chiappino, M. L., and Pavesio, C. E. (1994). Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res *80*, 91-98.

Nishi, M., Hu, K., Murray, J. M., and Roos, D. S. (2008). Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci *121*, 1559-1568.

O

Odenthal-Schnittler, M., Tomavo, S., Becker, D., Dubremetz, J. F., and Schwarz, R. T. (1993). Evidence for N-linked glycosylation in *Toxoplasma gondii*. Biochem J *291 (Pt 3)*, 713-721.

O'Keeffe, A. H., Green, J. L., Grainger, M., and Holder, A. A. (2005). A novel Sushi domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol *140*, 61-68.

Olafson, R. W., Thomas, J. R., Ferguson, M. A., Dwek, R. A., Chaudhuri, M., Chang, K. P., and Rademacher, T. W. (1990). Structures of the N-linked oligosaccharides of Gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. J Biol Chem *265*, 12240-12247.

Olliaro, P., Gorini, G., Jabes, D., Regazzetti, A., Rossi, R., Marchetti, A., Tinelli, C., and Della Bruna, C. (1994). In-vitro and in-vivo activity of rifabutin against *Toxoplasma gondii*. J Antimicrob Chemother *34*, 649-657.

Ong, Y. C., Reese, M. L., and Boothroyd, J. C. (2010). *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. J Biol Chem *285*, 28731-28740.

Opitz, C., Di Cristina, M., Reiss, M., Ruppert, T., Crisanti, A., and Soldati, D. (2002). Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Embo J *21*, 1577-1585.

Opitz, C., and Soldati, D. (2002). 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Mol Microbiol *45*, 597-604.

Ortega-Barria, E., and Boothroyd, J. C. (1999). A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. J Biol Chem *274*, 1267-1276.

P

Parodi, A. J., Lederkremer, G. Z., and Mendelzon, D. H. (1983). Protein glycosylation in *Trypanosoma cruzi*. The mechanism of glycosylation and structure of protein-bound oligosaccharides. J Biol Chem *258*, 5589-5595.

Parodi, A. J. (1993). N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. Glycobiology *3*, 193-199.

Patron, S. A., Mondragon, M., Gonzalez, S., Ambrosio, J. R., Guerrero, B. A., and Mondragon, R. (2005). Identification and purification of actin from the subpellicular network of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Int J Parasitol *35*, 883-894.

Pays, E., and Nolan, D. P. (1998). Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol *91*, 3-36.

Pelletier, L., Stern, C. A., Pypaert, M., Sheff, D., Ngo, H. M., Roper, N., He, C. Y., Hu, K., Toomre, D., Coppens, I.*, et al.* (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. Nature *418*, 548-552.

Penhoet, E., Kochman, M., Valentine, R., and Rutter, W. J. (1967). The subunit structure of mammalian fructose diphosphate aldolase. Biochemistry *6*, 2940-2949.

Pernas, L., and Boothroyd, J. C. (2010). Association of host mitochondria with the parasitophorous vacuole during *Toxoplasma* infection is not dependent on rhoptry proteins ROP2/8. Int J Parasitol *40*, 1367-1371.

Pezzella-D'Alessandro, N., Le Moal, H., Bonhomme, A., Valere, A., Klein, C., Gomez-Marin, J., and Pinon, J. M. (2001). Calmodulin distribution and the actomyosin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii*. J Histochem Cytochem *49*, 445-454.

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

Pfefferkorn, L. C., and Pfefferkorn, E. R. (1980). *Toxoplasma gondii*: genetic recombination between drug resistant mutants. Exp Parasitol *50*, 305-316.

Pfluger, S. L., Goodson, H. V., Moran, J. M., Ruggiero, C. J., Ye, X., Emmons, K. M., and Hager, K. M. (2005). Receptor for retrograde transport in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Eukaryot Cell *4*, 432-442.

Pinder, J. C., Fowler, R. E., Dluzewski, A. R., Bannister, L. H., Lavin, F. M., Mitchell, G. H., Wilson, R. J., and Gratzer, W. B. (1998). Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. J Cell Sci *111 (Pt 13)*, 1831-1839.

Pizarro, J. C., Vulliez-Le Normand, B., Chesne-Seck, M. L., Collins, C. R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Blackman, M. J., Faber, B. W., Remarque, E. J., Kocken, C. H.*, et al.* (2005). Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. Science *308*, 408-411.

Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. Annu Rev Biophys Biomol Struct *36*, 451-477.

Pollard, A. M., Onatolu, K. N., Hiller, L., Haldar, K., and Knoll, L. J. (2008). Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. Infect Immun *76*, 103-110.

Pomel, S., Luk, F. C., and Beckers, C. J. (2008). Host cell egress and invasion induce marked relocations of glycolytic enzymes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. PLoS Pathog *4*, e1000188.

Porchet, E., and Torpier, G. (1977). Freeze fracture study of *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infective stages (author's transl). Z Parasitenkd *54*, 101-124.

Poulsen, N. C., Spector, I., Spurck, T. P., Schultz, T. F., and Wetherbee, R. (1999). Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system. Cell Motil Cytoskeleton *44*, 23-33.

Poupel, O., and Tardieux, I. (1999). *Toxoplasma gondii* motility and host cell invasiveness are drastically impaired by jasplakinolide, a cyclic peptide stabilizing F-actin. Microbes Infect *1*, 653-662.

Poupel, O., Boleti, H., Axisa, S., Couture-Tosi, E., and Tardieux, I. (2000). Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments. Mol Biol Cell *11*, 355-368.

Q

Que, X., Ngo, H., Lawton, J., Gray, M., Liu, Q., Engel, J., Brinen, L., Ghosh, P., Joiner, K. A., and Reed, S. L. (2002). The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. J Biol Chem *277*, 25791-25797.

R

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

Ratner, D. M., Cui, J., Steffen, M., Moore, L. L., Robbins, P. W., and Samuelson, J. (2008). Changes in the N-glycome, glycoproteins with Asn-linked glycans, of *Giardia lamblia* with differentiation from trophozoites to cysts. Eukaryot Cell *7*, 1930-1940.

Rees-Channer, R. R., Martin, S. R., Green, J. L., Bowyer, P. W., Grainger, M., Molloy, J. E., and Holder, A. A. (2006). Dual acylation of the 45 kDa gliding-associated protein (GAP45) in *Plasmodium falciparum* merozoites. Mol Biochem Parasitol *149*, 113-116.

Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. J Exp Med *186*, 1819-1829.

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

Robben, P. M., Mordue, D. G., Truscott, S. M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L. D. (2004). Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. J Immunol *172*, 3686-3694.

Robben, P. M., LaRegina, M., Kuziel, W. A., and Sibley, L. D. (2005). Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. J Exp Med *201*, 1761-1769.

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

Rossanese, O. W., Soderholm, J., Bevis, B. J., Sears, I. B., O'Connor, J., Williamson, E. K., and Glick, B. S. (1999). Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol *145*, 69-81.

Roth, J. (2002). Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. Chem Rev *102*, 285-303.

Russell, D. G., and Sinden, R. E. (1981). The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. J Cell Sci *50*, 345-359.

Russell, D. G., and Burns, R. G. (1984). The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. J Cell Sci *65*, 193-207.

S

Saeij, J. P., Boyle, J. P., Coller, S., Taylor, S., Sibley, L. D., Brooke-Powell, E. T., Ajioka, J. W., and Boothroyd, J. C. (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. Science *314*, 1780-1783.

Saeij, J. P., Coller, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W., and Boothroyd, J. C. (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. Nature *445*, 324-327.

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

Samuelson, J., Banerjee, S., Magnelli, P., Cui, J., Kelleher, D. J., Gilmore, R., and Robbins, P. W. (2005). The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 1548-1553.

Santos, J. M., Lebrun, M., Daher, W., Soldati, D., and Dubremetz, J. F. (2009). Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. Int J Parasitol *39*, 153-162.

Saouros, S., Edwards-Jones, B., Reiss, M., Sawmynaden, K., Cota, E., Simpson, P., Dowse, T. J., Jakle, U., Ramboarina, S., Shivarattan, T.*, et al.* (2005). A novel galectin-like domain from *Toxoplasma gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly, and transport of a cell adhesion complex. J Biol Chem *280*, 38583-38591.

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

Schwab, J. C., Beckers, C. J., and Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 509-513.

Schwartzman, J. D., and Pfefferkorn, E. R. (1981). Pyrimidine synthesis by intracellular *Toxoplasma gondii*. J Parasitol *67*, 150-158.

Schwartzman, J. D., and Pfefferkorn, E. R. (1982). *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. Exp Parasitol *53*, 77-86.

Sellers, J. R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. Biochim Biophys Acta *1496*, 3-22.

Senaud, J. (1966). The ultrastructure of the micropyle of *Toxoplasma*sida. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D *262*, 119-121.

Shams-Eldin, H., Blaschke, T., Anhlan, D., Niehus, S., Muller, J., Azzouz, N., and Schwarz, R. T. (2005). High-level expression of the *Toxoplasma gondii* STT3 gene is required for suppression of the yeast STT3 gene mutation. Mol Biochem Parasitol *143*, 6-11.

Sharma, S. D., Araujo, F. G., and Remington, J. S. (1984). *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol *133*, 2818-2820.

Shaw, M. K., Roos, D. S., and Tilney, L. G. (1998). Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. Parasitology *117 (Pt 5)*, 435-443.

Shaw, M. K., Compton, H. L., Roos, D. S., and Tilney, L. G. (2000). Microtubules, but not actin filaments, drive daughter cell budding and cell division in *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci *113 (Pt 7)*, 1241-1254.

Shaw, M. K., Roos, D. S., and Tilney, L. G. (2001). DNA replication and daughter cell budding are not tightly linked in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Microbes Infect *3*, 351-362.

Shaw, M. K., Roos, D. S., and 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.

Shea, M., Jakle, U., Liu, Q., Berry, C., Joiner, K. A., and Soldati-Favre, D. (2007). A family of aspartic proteases and a novel, dynamic and cell-cycle-dependent protease localization in the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. Traffic *8*, 1018-1034.

Sheffield, H. G., and Melton, M. L. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol *54*, 209-226.

Sheiner, L., and Soldati-Favre, D. (2008). Protein trafficking inside *Toxoplasma gondii*. Traffic *9*, 636-646.

Sheiner, L., Santos, J. M., Klages, N., Parussini, F., Jemmely, N., Friedrich, N., Ward, G. E., and Soldati-Favre, D. (2010). *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. Mol Microbiol.

Sher, A., Oswald, I. P., Hieny, S., and Gazzinelli, R. T. (1993). *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. J Immunol *150*, 3982-3989.

Sibley, L. D., Adams, L. B., Fukutomi, Y., and Krahenbuhl, J. L. (1991). Tumor necrosis factor-alpha triggers antiToxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. J Immunol *147*, 2340-2345.

Sibley, L. D., Pfefferkorn, E. R., and Boothroyd, J. C. (1991). Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. Parasitol Today *7*, 327-328.

Sibley, L. D., Hakansson, S., and Carruthers, V. B. (1998). Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. Curr Biol *8*, R12-14.

Sibley, L. D. (2004). Intracellular parasite invasion strategies. Science *304*, 248-253.

Sinai, A. P., Webster, P., and Joiner, K. A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. J Cell Sci *110 (Pt 17)*, 2117-2128.

Sinai, A. P., and Joiner, K. A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. J Cell Biol *154*, 95-108.

Soldati, D., Dubremetz, J. F., and Lebrun, M. (2001). Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol *31*, 1293-1302.

Soldati, D., and Meissner, M. (2004). *Toxoplasma* as a novel system for motility. Curr Opin Cell Biol *16*, 32-40.

Spaccapelo, R., Naitza, S., Robson, K. J., and Crisanti, A. (1997). Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium berghei* and parasite motility. Lancet *350*, 335.

Starnes, G. L., Jewett, T. J., Carruthers, V. B., and Sibley, L. D. (2006). Two separate, conserved acidic amino acid domains within the *Toxoplasma gondii* MIC2 cytoplasmic tail are required for parasite survival. J Biol Chem *281*, 30745-30754.

Stedman, T. T., Sussmann, A. R., and Joiner, K. A. (2003). *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. J Biol Chem *278*, 5433-5443.

Starnes, G. L., Coincon, M., Sygusch, J., and Sibley, L. D. (2009). Aldolase is essential for energy production and bridging adhesin-actin cytoskeletal interactions during parasite invasion of host cells. Cell Host Microbe *5*, 353-364.

Stenmark, H., and Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. Genome Biol *2*.

Stokkermans, T. J., Schwartzman, J. D., Keenan, K., Morrissette, N. S., Tilney, L. G., and Roos, D. S. (1996). Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. Exp Parasitol *84*, 355-370.

Strang, A. M., Allen, A. K., Holder, A. A., and van Halbeek, H. (1993). The carbohydrate structures of *Trypanosoma brucei brucei* MITat 1.6 variant surface glycoprotein. A re-investigation of the C-terminal glycan. Biochem Biophys Res Commun *196*, 1430-1439.

Strath, M., Scott-Finnigan, T., Gardner, M., Williamson, D., and Wilson, I. (1993). Antimalarial activity of rifampicin in vitro and in rodent models. Trans R Soc Trop Med Hyg *87*, 211-216.

Straub, K. W., Cheng, S. J., Sohn, C. S., and Bradley, P. J. (2009). Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. Cell Microbiol *11*, 590-603.

Straw, A. D., MacDonald, A. S., Denkers, E. Y., and Pearce, E. J. (2003). CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. J Immunol *170*, 727-734.

Striepen, B., He, C. Y., Matrajt, M., Soldati, D., and Roos, D. S. (1998). Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol *92*, 325-338.

Striepen, B., Soldati, D., Garcia-Reguet, N., Dubremetz, J. F., and Roos, D. S. (2001). Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol *113*, 45-53.

Striepen, B., Crawford, M. J., Shaw, M. K., Tilney, L. G., Seeber, F., and Roos, D. S. (2000). The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. J Cell Biol *151*, 1423-1434.

Striepen, B. (2007). Switching parasite proteins on and off. Nat Methods *4*, 999-1000.

Striepen, B., Jordan, C. N., Reiff, S., and van Dooren, G. G. (2007). Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. PLoS Pathog *3*, e78.

Stwora-Wojczyk, M. M., Kissinger, J. C., Spitalnik, S. L., and Wojczyk, B. S. (2004). O-glycosylation in *Toxoplasma gondii*: identification and analysis of a family of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. Int J Parasitol *34*, 309-322.

Sugi, T., Kato, K., Kobayashi, K., Pandey, K., Takemae, H., Kurokawa, H., Tohya, Y., and Akashi, H. (2009). Molecular analyses of *Toxoplasma gondii* calmodulin-like domain protein kinase isoform 3. Parasitol Int *58*, 416-423.

Sugi, T., Kato, K., Kobayashi, K., Watanabe, S., Kurokawa, H., Gong, H., Pandey, K., Takemae, H., and Akashi, H. (2010). Use of the kinase inhibitor analog 1NM-PP1 reveals a role for *Toxoplasma gondii* CDPK1 in the invasion step. Eukaryot Cell *9*, 667-670.

Sultan, A. A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K. J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. S., and Menard, R. (1997). TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. Cell *90*, 511-522.

Supply, P., Sutton, P., Coughlan, S. N., Bilo, K., Saman, E., Trees, A. J., Cesbron Delauw, M. F., and Locht, C. (1999). Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. Vaccine *17*, 705-714.

Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., and Ward, G. E. (1996). *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 8413-8418.

Sweeney, K. R., Morrissette, N. S., Lachapelle, S., and Blader, I. J. (2010). Host Cell Invasion by *Toxoplasma gondii* is Temporally Regulated by the Host Microtubule Cytoskeleton. Eukaryot Cell.

Szymanski, C. M., and Wren, B. W. (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. Nat Rev Microbiol *3*, 225-237.

T

Taniguchi, T., Mizuochi, T., Banno, Y., Nozawa, Y., and Kobata, A. (1985). Carbohydrates of lysosomal enzymes secreted by *Tetrahymena pyriformis*. J Biol Chem *260*, 13941-13946.

Tardieux, I., Liu, X., Poupel, O., Parzy, D., Dehoux, P., and Langsley, G. (1998). A *Plasmodium falciparum* novel gene encoding a coronin-like protein which associates with actin filaments. FEBS Lett *441*, 251-256.

Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S. J., Tang, K., Beatty, W. L., Hajj, H. E., Jerome, M., Behnke, M. S*., et al.* (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. Science *314*, 1776-1780.

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

Tomavo, S., Dubremetz, J. F., and Schwarz, R. T. (1992a). Cell-free synthesis of glycolipid candidate precursor(s) for glycosyl-phosphatidylinositol anchors of *Toxoplasma gondii* surface proteins. Biochem Soc Trans *20*, 166S.

Tomavo, S., Dubremetz, J. F., and Schwarz, R. T. (1992b). A family of glycolipids from *Toxoplasma gondii*. Identification of candidate glycolipid precursor(s) for *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. J Biol Chem *267*, 11721-11728.

Tomavo, S., Dubremetz, J. F., and Schwarz, R. T. (1993). Structural analysis of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface glycoprotein gp23. Biol Cell *78*, 155-162.

Tomley, F. M., Bumstead, J. M., Billington, K. J., and Dunn, P. P. (1996). Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. Mol Biochem Parasitol *79*, 195-206.

Tonkin, C. J., Kalanon, M., and McFadden, G. I. (2008). Protein targeting to the malaria parasite plastid. Traffic *9*, 166-175.

Tran, J. Q., de Leon, J. C., Li, C., Huynh, M. H., Beatty, W., and Morrissette, N. S. (2010). RNG1 is a late marker of the apical polar ring in *Toxoplasma gondii*. Cytoskeleton (Hoboken) *67*, 586-598.

Trybus, K. M. (1994). Role of myosin light chains. J Muscle Res Cell Motil *15*, 587-594.

Tzen, M., Benarous, R., Dupouy-Camet, J., and Roisin, M. P. (2007). A novel *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase. Parasite *14*, 141-147.

U

Udeinya, I. J., and Van Dyke, K. (1981). Concurrent inhibition by tunicamycin of glycosylation and parasitemia in malarial parasites (*Plasmodium falciparum*) cultured in human erythrocytes. Pharmacology *23*, 165-170.

V

Valere, A., Garnotel, R., Villena, I., Guenounou, M., Pinon, J. M., and Aubert, D. (2003). Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion. Parasite *10*, 59-64.

Vallochi, A. L., Muccioli, C., Martins, M. C., Silveira, C., Belfort, R., Jr., and Rizzo, L. V. (2005). The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. Am J Ophthalmol *139*, 350-351.

Velge-Roussel, F., Chardes, T., Mevelec, P., Brillard, M., Hoebeke, J., and Bout, D. (1994). Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. Mol Biochem Parasitol *66*, 31-38.

Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., De Braekeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E., and Verschueren, H. (2000). DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. Infect Immun *68*, 38-45.

Villegas, E. N., Elloso, M. M., Reichmann, G., Peach, R., and Hunter, C. A. (1999). Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to *Toxoplasma gondii*. J Immunol *163*, 3344-3353.

Villegas, E. N., Lieberman, L. A., Carding, S. R., and Hunter, C. A. (2002). Susceptibility of interleukin-2-deficient mice to *Toxoplasma gondii* is associated with a defect in the production of gamma interferon. Infect Immun *70*, 4757-4761.

Vivier, E., and Petitprez, A. (1969). The outer membrane complex and its development at the time of the formation of daughter cells in *Toxoplasma gondii*. J Cell Biol *43*, 329-342.

W

Wan, K. L., Carruthers, V. B., Sibley, L. D., and Ajioka, J. W. (1997). Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. Mol Biochem Parasitol *84*, 203-214.

Wang, J., Morris, A. J., Tolan, D. R., and Pagliaro, L. (1996). The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants. J Biol Chem *271*, 6861-6865.

Wang, J., Bohme, U., and Cross, G. A. (2003). Structural features affecting variant surface glycoprotein expression in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol *128*, 135-145.

Wetzel, D. M., Hakansson, S., Hu, K., Roos, D., and Sibley, L. D. (2003). Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. Mol Biol Cell *14*, 396-406.

White, M. W., Jerome, M. E., Vaishnava, S., Guerini, M., Behnke, M., and Striepen, B. (2005). Genetic rescue of a *Toxoplasma gondii* conditional cell cycle mutant. Mol Microbiol *55*, 1060-1071.

Whitley, P., Nilsson, I. M., and von Heijne, G. (1996). A nascent secretory protein may traverse the ribosome/endoplasmic reticulum translocase complex as an extended chain. J Biol Chem *271*, 6241-6244.

Wright, P. S., Cross-Doersen, D. E., Schroeder, K. K., Bowlin, T. L., McCann, P. P., and Bitonti, A. J. (1991). Disruption of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadherence to human melanoma cells with inhibitors of glycoprotein processing. Biochem Pharmacol *41*, 1855-1861.

Y

Yao, C., Donelson, J. E., and Wilson, M. E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. Mol Biochem Parasitol *132*, 1-16.

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

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

Yong, E. C., Chi, E. Y., and Henderson, W. R., Jr. (1994). *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced anti*Toxoplasma* activity. J Exp Med *180*, 1637-1648.

Z

Zheng, B., He, A., Gan, M., Li, Z., He, H., and Zhan, X. (2009). MIC6 associates with aldolase in host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res *105*, 441-445.

Zhu, G., Marchewka, M. J., Woods, K. M., Upton, S. J., and Keithly, J. S. (2000). Molecular analysis of a Type I fatty acid synthase in *Cryptosporidium parvum*. Mol Biochem Parasitol *105*, 253-260.

Zinecker, C. F., Striepen, B., Tomavo, S., Dubremetz, J. F., and Schwarz, R. T. (1998). The dense granule antigen, GRA2 of *Toxoplasma gondii* is a glycoprotein containing O-linked oligosaccharides. Mol Biochem Parasitol *97*, 241-246.

Implication de la *N*-glycosylation dans les mécanismes de motilité et d'invasion des cellules hôtes chez *Toxoplasma gondii*

RESUME

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire unicellulaire qui se développe à l'intérieur d'une cellule hôte. Chez les parasites Apicomplexa, peu de chose sont connues sur la *N*-glycosylation. Nous avons mis en évidence la présence de *N*-glycannes parasitaires totaux et démontré que ces *N*-glycannes sont de type riche en mannose. En utilisant une lectine, nous avons purifié de nombreuses *N*-glycoprotéines parasitaires intervenant majoritairement dans les mécanismes de motilité, d'invasion et de trafic intracellulaire. Nous avons démontré qu'un traitement par une drogue inhibant la synthèse des *N*-glycannes perturbe plusieurs processus biologiques. Nous avons étudié les fonctions biologiques des *N*-glycannes de TgGAP50 qui appartient au glidéosome, un moteur impliqué dans la motilité du parasite. Nous avons déterminé que TgGAP50 porte des *N*-glycannes hétérogènes riches en mannoses. Nous avons montré que la *N*-glycosylation de TgGAP50 est impliquée dans le trafic de la protéine et dans l'interaction avec les partenaires du glidéosome. Nos travaux démontrent que *T. gondii* est capable de synthétiser des *N*-glycoprotéines et que les *N*-glycannes sont potentiellement impliqués dans le trafic des protéines et dans les interactions moléculaires importantes pour la motilité et l'invasion des cellules hôtes par le parasite.

Deciphering *N*-glycosylation Structures and Functions in *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* penetrates virtually any kind of mammalian cell using proteins released from late secretory organelles and a unique form of gliding motility. How *T. gondii* glycosylated proteins mediate host-parasite interactions remains elusive. Here, we report comprehensive proteomics and glycomics analyses showing that several key components required for interactions between *T. gondii and* host cells are *N*-glycosylated. Detailed structural characterization confirmed that *N*-glycans from *T. gondii* total protein extracts consist of oligomannosidic and paucimannosidic sugars, which are rarely present on mature eukaryotic glycoproteins. *In situ* fluorescence using concanavalin A and *Pisum sativum* agglutinin predominantly stained the entire parasite body. Visualization of *Toxoplasma* glycoproteins purified by affinity chromatography identified components involved in gliding motility, moving junction, and other additional functions. Importantly, tunicamycin-treated parasites were considerably reduced in motility, host cell invasion, and growth. In addition, we show that all three potential *N*-glycosylated sites of GAP50 are occupied by unusual *N*-glycan structures with terminal glucoses. Using site-directed mutagenesis, we demonstrate that *N*-glycosylation is a prerequisite for GAP50 transport into the inner membrane complex. Assembly of key partners into gliding complex by unglycosylated GAP50 and parasite motility are severely impaired. Collectively, these results provide the first molecular description of *T. gondii N*-glycosylation functions that are vital for parasite motility and host cell entry.