

Le rôle d'une sérine-thréonine phosphatase de type 2C parasitaire (TgPP2C) dans l'interaction Toxoplasma gondii - cellule hôte: Identification des modules interactifs au sein du tricomplexe actine-toxofiline-TgPP2C et étude de ses propriétés fonctionnelles dans le parasite et la cellule infectée Gaëlle Jan

▶ To cite this version:

Gaëlle Jan. Le rôle d'une sérine-thréonine phosphatase de type 2C parasitaire (TgPP2C) dans l'interaction Toxoplasma gondii - cellule hôte : Identification des modules interactifs au sein du tricomplexe actine-toxofiline-TgPP2C et étude de ses propriétés fonctionnelles dans le parasite et la cellule infectée. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0015 . pastel-00002663

HAL Id: pastel-00002663 https://pastel.hal.science/pastel-00002663

Submitted on 15 Oct 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)

Spécialité : Parasitologie

présentée et soutenue publiquement par

Gaëlle JAN

le 12 juin 2007

Le rôle d'une sérine-thréonine phosphatase de type 2C parasitaire (TgPP2C)

dans l'interaction Toxoplasma gondii – cellule hôte :

Identification des modules interactifs au sein du tricomplexe actine-toxofiline-TgPP2C et étude de ses propriétés fonctionnelles dans le parasite et la cellule infectée

Directeur de thèse : Isabelle TARDIEUX

Travail réalisé à l':Institut Cochin, INSERM U537, CNRS UMR8104, Université Paris V, F-75014 Paris

Devant le jury :

Monsieur le Professeur Jean-Claude MEUNIER	Président
Madame le Docteur Nancy GUILLEN-AGHION	Rapporteur
Madame le Professeur Isabelle VILLENA	Rapporteur
Monsieur le Docteur Xavier CAYLA	Examinateur
Monsieur le Professeur Jean DUPOUY-CAMET	Examinateur
Madame le Docteur Isabelle TARDIEUX	Directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	2
	5
ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION GENERALE	11
I- LA TOXOPLASMOSE, UNE INFECTION COMMUNE GENERALEMENT SANS CONSEQUENCE	11
A. Epidémiologie humaine	11
B. Pathologie humaine	12
C. La toxoplasmose chez les animaux	13
II- LE PARASITE RESPONSABLE : TOXOPLASMA GONDII, MEMBRE DU PHYLUM DES APICOMPLEXA	15
A. Le cycle biologique de T. gondii	15
B. Ultrastructure du tachyzoïte de T. gondii	18
C. Les différentes lignées de T. gondii	18
III- UN ZOÏTE MOBILE QUI ENVAHIT SA CELLULE HOTE PAR UN PROCESSUS ACTIF	21
A. La mobilité et l'invasion, des processus dépendants du moteur actomyosine du parasite	21
B. Un préalable à l'invasion : l'attachement réversible à la cellule hôte	22
C. La première étape de l'invasion : l'importance des protéines micronémales dans l'attachement ap	vical
D. La vôla d'AMA1 at das protéinas du cou das rhontrios dans la formation de la ionation mobila lov	23 s. do. la
D. Le role à AMAT et des proteines du cou des rhopiries dans la jormation de la jonction mobile lors pénétration	s ae ia 26
<i>E. Le rôle des protéines de rhoptries dans la formation de la vacuole parasitophore.</i>	27
<i>F. Le rôle des protéines des granules denses dans le fonctionnement de la vacuole parasitophore</i>	
IV-OBJECTIFS.	29
CHAPITRE I	32
ACTINE-TOXOFILINE-TGPP2C	
LINTRODUCTION	32
I- INTRODUCTION A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion	32
I- INTRODUCTION A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion 1- Les propriétés dynamiques de l'actine.	32 32
I- INTRODUCTION A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion 1- Les propriétés dynamiques de l'actine 2- La régulation du cytosquelette d'actine par les protéines associées	32 32 34 36
 I- INTRODUCTION A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion	32 32 34 36 38
 I- INTRODUCTION A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion 1- Les propriétés dynamiques de l'actine 2- La régulation du cytosquelette d'actine par les protéines associées a) Les protéines nucléatrices b) Les protéines séquestrantes 	32 32 34 36 38 40
 I- INTRODUCTION	32 32 34 34 36 38 40 40
 I- INTRODUCTION	
 I- INTRODUCTION	32 32 34 36 38 40 40 40 41 38
 I- INTRODUCTION	32 32 34 34 36 38 40 40 40 41 41 41 43
 I- INTRODUCTION	32 33 34 36 38 40 40 41 41 41 43 35 45
 I- INTRODUCTION	32 334 34 36 38 40 40 40 41 41 41 43 43 43 45 47
 I- INTRODUCTION	32 334 34 36 38 40 40 40 41 41 43 3 43 43 45 47 48
 I- INTRODUCTION	32 334 34 36 38 40 40 41 41 41 43 43 43 45 47 48 50
 I- INTRODUCTION	32 32 34 36 38 40 41 43 45 47 48 50 50
 I- INTRODUCTION	32 32 34 36 38 40 41 43 45 47 48 50 52
 I- INTRODUCTION	32 32 34 36 38 40 41 43 45 47 48 50 52 54
 I- INTRODUCTION	32 32 34 36 38 40 41 41 43 45 50 52 54
 I- INTRODUCTION	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
 I- INTRODUCTION. A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion. 1- Les propriétés dynamiques de l'actine 2- La régulation du cytosquelette d'actine par les protéines associées a) Les protéines nucléatrices b) Les protéines séquestrantes. c) Les protéines coupantes e) Les protéines responsables de l'arrangement dans l'espace des filaments. 3- Rôle des myosines dans la locomotion. B. La locomotion de T. gondii : le glissement rotatif. 1- Les particularités de l'actine de T. gondii 2- Les particularités de l'actine parasitaire par les protéines liant l'actine. C. Une protéine liant l'actine spécifique de T. gondii : la toxofiline 1- Identification et propriétés fonctionnelles de la CKII et de la TgPP2C. 3- La localisation de la toxofiline : une protéine sécrétée ? D. Objectifs et démarche expérimentale. II- MATERIEL ET METHODES A. Préparation des protéines recombinantes. 	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
 I- INTRODUCTION	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
 I- INTRODUCTION A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion 1- Les propriétés dynamiques de l'actine 2- La régulation du cytosquelette d'actine par les protéines associées a) Les protéines nucléatrices b) Les protéines coiffantes c) Les protéines coupantes e) Les protéines responsables de l'arrangement dans l'espace des filaments 3- Rôle des myosines dans la locomotion B. La locomotion de T. gondii : le glissement rotatif. 1- Les particularités de l'actine de T. gondii 2- Les particularités de la myosine de T. gondii 3- Contrôle de la dynamique de l'actine parasitaire par les protéines liant l'actine C. Une protéine liant l'actine spécifique de T. gondii : la toxofiline 1- Identification et propriétés fonctionnelles de la toxofiline 2- Régulation de l'activitie de la toxofiline : rôle de la CKII et de la TgPP2C. 3- La localisation de la toxofiline : une protéine sécrétée ? D. Objectifs et démarche expérimentale. II- MATERIEL ET METHODES A. Préparation des protéines recombinantes. 1- Clonage des differents fragments de la toxofiline 2- Purification et protéines recombinantes. 	$\begin{array}{c} 32 \\ 32 \\ 34 \\ 36 \\ 38 \\ 40 \\ 40 \\ 41 \\ 41 \\ 41 \\ 43 \\ 45 \\ 45 \\ 47 \\ 48 \\ 50 \\ 50 \\ 52 \\ 54 \\ 54 \\ 56 \\ 56 \\ 56 \\ 56 \\ 56 \\ 57 \\ 57 \\ 57$
 I-INTRODUCTION. A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion. 1- Les propriétés dynamiques de l'actine	$\begin{array}{c} 32 \\ 32 \\ 34 \\ 36 \\ 38 \\ 40 \\ 40 \\ 41 \\ 41 \\ 41 \\ 43 \\ 45 \\ 50 \\ 50 \\ 50 \\ 52 \\ 54 \\ 56 \\ 56 \\ 56 \\ 56 \\ 57 \\ 57 \\ 57 \\ 58 \\ 58 \\ 58 \\ 58 \\ 58$
 I-INTRODUCTION. A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion. 1- Les propriétés dynamiques de l'actine par les protéines associées. a) Les protéines nucléatrices. b) Les protéines séquestrantes. c) Les protéines couffantes. d) Les protéines responsables de l'arrangement dans l'espace des filaments. 3- Rôle des myosines dans la locomotion. B. La locomotion de T. gondii : le glissement rotatif. 1- Les particularités de l'actine par les protéines liant l'actine. C. Une protéine liant l'actine spécifique de T. gondii. 2- Les particularités de la myosine de T. gondii. 2- Les particularités de la toxofiline parasitaire par les protéines liant l'actine. C. Une protéine liant l'actine spécifique de T. gondii. 1- Identification et propriétés fonctionnelles de la CKII et de la TgPP2C. 3- La localisation de la toxofiline : une protéine sécrétée ? D. Objectifs et démarche expérimentale. II- MATERIEL ET METHODES A. Préparation des protéines recombinantes. 1- Clonage des différents fragments de la toxofiline. 2- Purification des protéines recombinantes. 3- Roles antifs. 3- Cattine 	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
 I-INTRODUCTION A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
 I-INTRODUCTION. A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
 I-INTRODUCTION. A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$

1- Tests de liaison à la TgPP2C	60
2- Tests de liaison du complexe actine-CC1-TgPP2C	60
F. Peptide-spot mapping	60
III- RESULTATS	63
A. Identification des sites de liaison entre la toxofiline et l'actine	63
1- La toxofiline se lie à et séquestre l'actine G via son domaine CC1A	63
2- Trois sequences peptidiques lineaires au sein de CCIA se lient à l'actine G	65
B. Identification des sites de ligison entre la toxofiline et la TaPP2C	70
1- Le complexe CC1-actine G se lie à la ToPP2C via CC1B mais pas CC1A	72
2- La toxofiline présente deux sites de liaison potentiels à la TgPP2C, respectivement au sein de CC1B et de	NoCC
	74
IV- DISCUSSION	75
CHAPITRE II	
ANALYSE DES PROPRIETES FONCTIONNELLES DE LA TGPP2C DE <i>TOXOPLASMA GON</i> PAR SUREXPRESSION DANS LES TACHYZOÏTES	<i>D11</i> 80
I- INTRODUCTION	80
A. Les serine-threonine phosphatases de type 2C	82
1- Caracteristiques des serme-infeonine phosphatases	82 84
3- Propriétés fonctionnelles connues des PP2C	
a) Les PP2C, le cycle cellulaire et l'apoptose	85
b) Les PP2C et l'activation des voies de réponse au stress	86
c) Les PP2C et la régulation de la dynamique de l'actine	87
B. Les phosphatases de T. gondii	87
1- Les phosphatases connues chez les Apicomplexes	87
2- La IgPP2C : caracteristiques et fonctions connues	90
C. La replication au tachyzoite de 1. gonati : l'endodyogenie	92
1- Les différentes étapes du cycle cellulaire : moyens d'étude comparaison et implications pour T gondii	
3- Division cellulaire et évolution du contenu nucléaire	
D. Obiectifs et démarche expérimentale	94
II- MATERIEL ET METHODES	95
A. Parasites et culture cellulaire	95
1- Culture cellulaire	95
2- Culture des parasites	95
B. Constructions plasmidiques codant pour différentes formes de la TgPP2C	95
1- Constructions permettant la surexpression de la TgPP2C dans le tachyzoïte	97
2- Construction des formes mutées « inactives » de pMAH14-TgPP2C	
3- Construction de pMAH14-1 gPP2CANter et de chimeres portant le domaine Nter	9/
C. Transfection des parasites	100
D. Marquage des lachyzolles par immunojluorescence	100
A La surannession de la TaPP2C dans les tachyzoïtes bloque leur division	103
A. La surexpression de la TgPP2C active provoque un défaut de dévelopmement des parasites	103
2- Les parasites surexprimant la TgPP2C possèdent un novau aberrant	105
3- La TgPP2C endogène est localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme du parasite	105
B. La TgPP2C surexprimée est sécrétée dans la cellule hôte via son domaine N-terminal	107
1- La TgPP2C est sécrétée dans la cellule hôte	107
2- La TgPP2C n'est pas sécrétée si le domaine N-terminal est tronqué	111
3- Le domaine N-terminal suffit à faire sécréter une protéine exogène	111
IV-DISCUSSION	114
A. La IgPP2C semble impliquee dans la multiplication du parasite	114
D. Lu 1g1 1 20 esi secretee uuns iu centute note	110
CHAPITRE III	119
ETUDE DU ROLE DE LA TGPP2C DANS LA CELLULE INFECTEE	119
RECHERCHE DE SUBSTRATS/PARTENAIRES HOTES	119
I-INTRODUCTION	119
A T gondii agit directement sur certaines voies de signalisation de sa cellule hôte	119
B. Des sérine-thréonine kinases et phosphatases parasitaires sécrétées agissent sur la cellule hôte	120

C. Objectifs et démarche expérimentale	121
II- MATERIEL ET METHODES	
A. Expression hétérologue de la TgPP2C	
1- Clonage des vecteurs d'expression de la TgPP2C sauvage et mutée dans les cellules de mammifère	
2- Transfection de cellules de mammifère	122
B. Analyse par cytométrie en flux des cellules transfectées	123
1- Calibrage du cycle cellulaire des cellules de mammifère	123
2- Marquage de l'ADN à l'iodure propidium pour l'analyse du cycle cellulaire	123
3- Marquage des cellules à l'annexine V pour l'analyse de l'apoptose	
C. Analyse par immunofluorescence des cellules transfectées	
1- Marquage anti-tubuline des cellules transfectées	
2- Marquage du noyau des cellules transfectées	
3- Marquage TUNEL des cellules transfectées	
D. Crible double hybride	
<i>E. Purification des protéines recombinantes Spire</i>	
1- Clonage des différentes formes de Spire en vue d'une expression bactérienne	
2- production et purification de la protéine recombinante GST-Spire1WH2	
F. Tests de liaison Spire-TgPP2C	
G. Extraction d'ARN et RT-PCR spécifique de Spire1 et Spire2	128
III- RESULTATS	
A. L'expression ectopique de la TgPP2C dans les cellules de mammifère bloque leur cycle et ind	luit leur
apoptose	
1- La TgPP2C bloque les cellules en phase G2/M	
2- Les cellules exprimant la TgPP2C présentent un phénotype nucléaire atypique	
3- La TgPP2C induit l'apoptose des cellules transfectées	
B. La protéine Spire comme partenaire de la TgPP2C dans la cellule hôte	
1- La TgPP2C interagit avec plusieurs protéines en crible double hybride	
2- Les protéines TgPP2C et Spire1 interagissent in vitro	
3- Spire1 et Spire2 sont transcrits dans les lignées de cellules de mammifère utilisées	
IV- DISCUSSION	144
DISCUSSION GENERALE	150
I- UNE NOUVELLE VOIE DE SECRETION DE PROTEINES PARASITAIRES ?	150
A. La TgPP2C n'est pas localisée dans les organites de sécrétion apicaux	
B. Le domaine N-terminal est nécessaire et suffisant à la sécrétion	
II- DES CIBLES SIMILAIRES DANS LE TACHYZOÏTE ET LA CELLUI E HOTE	153
A La $T \circ PP ?C$ affecte la division cellulaire	153
R La ToPP?C agit indirectement sur le cytosauelette d'actine	155
III- A LA RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA TGPP2C	
BIBLIOGRAPHIE	160
PUBLICATION	172

TABLE DES FIGURES

Introduction générale

Figure 1 : Membres du phylum des Sporozoaires ou Apicomplexa	14
Figure 2: Diagramme représentant le cycle biologique de <i>T. gondii</i>	14
Figure 3 : Ultrastructure des tachyzoïtes	17
Figure 4 : Modèle de l'invasion par <i>T. gondii</i>	20
Figure 5 : La mobilité par glissement rotatif chez <i>T. gondii</i>	20
Figure 6 : Les complexes adhésifs protéiques de <i>T. gondii</i>	24

<u>Chapitre1</u>

Figure 7 : Structure 2D de l'actine G	. 33
Figure 8 : Représentation du cycle "en tapis roulant" de l'actine F à l'état d'équilibre	. 35
Figure 9 : Les différents rôles des protéines liant l'actine	. 35
Figure 10 : Les différentes protéines nucléatrices	. 37
Figure 11 : Mécanisme de nucléation de l'actine par la protéine Spire	. 39
Figure 12 : Schéma mécanochimique du cycle d'actomyosine	. 42
Figure 13 : Modèle d'un cycle complet du glissement observé chez T. gondii	. 44
Figure 14 : Distribution de l'actine dans le réseau subpelliculaire	. 44
Figure 15 : Photographie en microscopie électronique d'un parasite attaché à la surface de la	a
cellule hôte pendant le processus de pénétration	. 46
Figure 16 : L'expression de la GFP-toxofiline affecte la dynamique de l'actine dans les	
cellules de mammifère	. 49
Figure 17 : La sérine 53 est importante pour les propriétés de la toxofiline sur le cytosquele	tte
d'actine	. 51
Figure 18 : Localisation de la toxofiline dans le tachyzoïte pendant son mouvement et son	
entrée dans la cellule hôte	. 53
Figure 19 : Représentation schématique de la toxofiline totale et des domaines de la toxofili	ine
utilisés dans cette étude	. 62
Figure 20 : La toxofiline capture l'actine via son domaine CC1	. 62
Figure 21 : La toxofiline lie et séquestre l'actine G via son domaine CC1A	. 64
Figure 22 : La toxofiline séquestre l'actine G via CC1A qui contient trois sites de liaison	. 66
Tableau 1: Analyse du criblage avec le logiciel "pattinprot" de la base de données	
UniProt/SwissProt avec deux motifs de CC1A liant l'actine	. 68
Figure 23 : NoCC se lie à l'actine G mais n'affecte ni la vitesse ni la quantité de	
polymérisation	. 69
Figure 24 : Le complexe CC1 - actine G se lie à la TgPP2C par CC1B mais pas CC1A	. 71
Figure 25 : Deux séquences dans la toxofiline se lient à la TgPP2C	. 73

<u>Chapitre2</u>

Tableau 2 : Récapitulatif des inhibiteurs principaux des différentes PPP	81
Figure 26 : Vue orthogonale d'une représentation en ruban de la structure secondaire de la	
ΡΡ2Cα	83
Figure 27 : Représentation schématique de la TgPP2C	89
Figure 28 : Les tachyzoïtes surexprimant la forme active de la TgPP2C présentent un défau	ut
de développement	89
Figure 29 : Représentation schématique des différentes étapes de l'endodyogénie	91
Figure 30 : Représentation du vecteur pMAH14-TgPP2C-HA-FLAG	96

Figure 31 : Représentation des différentes protéines chimères construites pour étudier le rôle du domaine N-terminal de la TgPP2C
Figure 32 : Les tachyzoïtes surexprimant la TgPP2C possédant un domaine catalytique actif
ne se multiplient pas normalement dans la vacuole parasitophore
Figure 33 : Graphique indiquant le pourcentage de tachyzoïtes présentant un défaut de
réplication pour chaque type de transfection
Figure 34 : Les parasites surexprimant la TgPP2C possèdent un noyau aberrant 104
Figure 35 : La TgPP2C endogène est localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des
tachyzoïtes
Figure 36 : La TgPP2C est sécrétée par les tachyzoïtes dans la cellule hôte via son domaine
N-terminal
Figure 37 : Graphique indiquant le pourcentage de cellules infectées dans lesquelles la
TgPP2C-HA est détectée
Figure 38 : La TgPP2C est sécrétée par les tachyzoïtes dans la cellule hôte dès 12 h après
l'invasion110
Figure 39 : Le domaine N-terminal de la TgPP2C induit la sécrétion de la protéine avec
laquelle il est en fusion

<u>Chapitre3</u>

Figure 40 : Calibrage du cycle cellulaire de cellules HeLa	. 129
Figure 41 : Les cellules exprimant la TgPP2C sont bloquées en phase G2/M du cycle cellu	ılaire
	. 131
Figure 42 : Les cellules exprimant la TgPP2C restent reliées par un pont cytoplasmique	
contenant de l'ADN	. 133
Figure 43 : L'expression ectopique de la TgPP2C induit l'apoptose des cellules	. 135
Figure 44 : L'ADN des cellules exprimant la TgPP2C est fragmenté et condensé	. 137
Figure 45 : Domaines structuraux des protéines Spire	. 139
Figure 46 : Spire1 et TgPP2C interagissent in vitro	. 141
Figure 47 : Spire est transcrit dans les cellules HeLa, CaCo2 et U373	. 141

ABREVIATIONS

ABP	Actin binding protein
ADF	Facteur de dépolymérisation de l'actine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
ARN	Acide ribonucléique
Arp	Protéine reliée à l'actine
ARPC	Sous-unité du complexe Arp2/3
ATP	Adénosine triphosphate
BAD	Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter
BSA	Sérum albumine bovine
CIP	Calf intestinal phosphatase
CK2	Caséine kinase 2
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Milieu minimum essentiel modifié de Dulbecco
Cdk	Cyclin dependant kinase
CTD	Domaine carboxyterminal
dTMP	Thymidine monophosphate
DTT	Dithiotréitol
dTTP	Thymidine triphosphate
EF-1	Facteur d'élongation 1
EGF	Epithelial growth factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FACT	Facilitates chromatin transcription
FDU	5'-fluoro-2'-deoxyuridine
FEM2	Feminization of XX and XO animals 2
FIN13	Fibroblast growth factor inducible protein 13
FITC	Fluoresceine Isothiocyanate
FH1/2	Formin homology 1/2
GFP	Green fluorescent protein
GPI	Glycosylated phosphatidylinositol
GRO1/2	Growth regulated oncogene 1/2
GST	Glutathion-S-transférase
h	Heure
HA	Influenza hemagglutin epitope
HDAC	Histone déacétylase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFF	Human foreskin fibroblast
HPTR	Histine patch thioredoxine
hRIP	Human Rev-interacting protein
HRP	Horse radish peroxydase
I-1/2	Inhibiteur 1/2
IAEDANS	N-(iodoacétyl)-N'-1-sulfo-5-naphtylethylamine
IL1/2	Interleukine 1/2

IMC	Complexe de membranes interne
	Isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside
JNK	Jun N-terminai kinase
KD	Kilobase
kDa	Kilodalton
	Leukemia inhibitory factor
MACFI	Microtubule-actin crosslinking factor I
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPK kinase kinase
min	Minute
MOPI	Member of PAS protein I
MP2C	Medicago phosphatase 2C
MPP1/2	Microneme protein protease ¹ / ₂
NLS	Nuclear localization signal
NP-40	Nonidet P-40
NPF	Facteur promouvant la nucléation
PAK	P21-activated kinase
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PFA	Paraformaldéhyde
PfSBP1	Plasmodium falciparum skeleton binding protein 1
Pi	Phosphate inorganique
PIP2	Phosphatidylinositol bisphosphate
РКА	Protéine-kinase A
РКС	Protéine-kinase C
POPX1/2	Partner of PIX 1/2
PP1	Protéine phosphatase de type 1
PP2A	Protéine phosphatase de type 2A
PP2B	Protéine phosphatase de type 2B
PP2C	Protéine phosphatase de type 2C
PP4/5/6	Protéine phosphatase de type 4/5/6
PPM	Protéine phosphatase M
PPP	Protéine phosphatase P
PVM	Membrane de la vacuole parasitophore
RFP	Red fluorescent protein
rPP2C	PP2C recombinante
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
SAG	Antigène de surface
SB3-14	N-tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (sulfobétaïne 3-14)
SCAR	Suppresseur du récepteur de l'AMPc
SDS	Sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIMK	Salt stress-inducible MAPK
siRNA	Short interfering RNA
Src	Sarc
SRS	Séquence reliée à SAG
SSRP1	Structure-specific recognition protein 1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SVF	Sérum de veau fétal

TAK1	TGF-β activated kinase 1
TBS	Tris buffer saline
TBST	Tris buffer saline 0,1% tween 20
TdT	Désoxynucléotidyl transférase terminale
TgPP2C	Protéine Phosphatase de type 2C de T. gondii
TPK2	Toxoplasma gondii CDC2-related protein kinase
TUNEL	Terminal-transférase-mediated ddUTP-digoxigenin nick-end labelling
TX-100	Triton X-100
u. a.	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
WASP	Wiscott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin homology protein
WCA	WH2, central and acidic domain
WH2	Wiskott-Aldrich homology 2
Wip 1	Wild-type p53-inducible phosphatase 1
YFP	Yellow fluorescent protein

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

I-La toxoplasmose, une infection commune généralement sans conséquence

La toxoplasmose est une infection commune dans la population humaine mondiale. Généralement bénigne, elle peut conduire à des pathologies graves chez le fœtus, le nouveauné et le malade immunodéprimé.

A. Epidémiologie humaine

La toxoplasmose est présente sur la totalité de la planète. Cependant de grandes disparités géographiques sont observées. En effet, alors qu'environ un tiers de la population possède des anticorps spécifiques contre *Toxoplasma gondii*, le protozoaire responsable de la maladie, la séroprévalence varie de 90% en France à environ 11% en Islande (Ho-Yen et Joss, 1992).

Plusieurs paramètres expliquent cette différence si importante. La cause principale de ces variations réside dans la diversité des régimes alimentaires et des conditions d'hygiène. En effet, la contamination par *T. gondii* se fait principalement, soit par l'ingestion de kystes contenus dans la viande consommée, soit par l'absorption d'oocystes présents dans les fèces de félins, l'hôte définitif du parasite dans lequel il réalise son cycle sexué. Des habitudes de cuisson faible de la viande expliquent en partie les différences observées entre les Etats-Unis (30%) et la France par exemple.

Du fait du cycle de vie de *T. gondii*, la distribution de la maladie est également dépendante de la présence des félidés. C'est pourquoi très peu de cas de toxoplasmose sont recensés dans les atolls du Pacifique qui n'hébergent pas de chats. D'autre part, la persistance du parasite est favorisée par un environnement chaud et humide, dans lequel les oocystes sont plus résistants. La séroprévalence est ainsi particulièrement forte dans les zones tropicales (90% au Salvador par exemple) et au contraire faible dans les zones froides, comme en Islande (Ho-Yen et Joss, 1992).

B. <u>Pathologie humaine</u>

Chez les adultes et les enfants immunocompétents, la toxoplasmose est généralement asymptomatique. Dans 10% des cas, une atteinte des chaînes cervicales ganglionnaires peut quand même être observée, accompagnée d'une faible fièvre, de malaises et de maux de tête. Exceptionnellement, en particulier lors d'infections en laboratoire à partir d'inuculums importants, des formes graves existent, caractérisées par une fièvre importante, une atteinte de l'état général, des arthralgies, des éruptions cutanées, et des signes pulmonaires, myocardiques, hépatiques ou cérébraux.

En revanche, chez les patients immunodéprimés, tels que les malades du SIDA, la maladie peut être mortelle. Il s'agit généralement d'une réactivation d'une infection chronique, dont le siège est souvent le système nerveux central. Les manifestations cliniques sont composées d'un changement du statut mental, d'épilepsies, de déficits moteurs focaux, de perturbations nerveuses crâniennes, d'anomalies sensorielles et de désordres du mouvement. De plus, d'autres organes peuvent être impliqués : on observe des choriorétinites, des pneumonites, et des troubles hémodynamiques semblables à un choc sceptique.

La toxoplasmose peut également être particulièrement sévère lorsqu'elle atteint le fœtus. On parle alors de toxoplasmose congénitale, observable uniquement lorsque la mère est infectée pour la première fois au cours de sa grossesse. Dans ce cas, le parasite présent chez la mère passe à l'enfant via une infection placentaire puis diffuse dans le sang fœtal. Le taux de transmission dépend du moment auquel la mère est infectée : il varie de 17 à 25% pour une infection pendant les deux premiers trimestres de la grossesse, à 65% pour une infection au cours du troisième trimestre (Frenkel, 1990). En revanche, la gravité de la maladie est inversement proportionnelle à la fréquence de transmission : une infection pendant les deux premiers trimestres de grossesse risque de provoquer une toxoplasmose congénitale sévère, pouvant causer la mort du fœtus *in utero* ou un avortement spontané, tandis que les enfants naissant après une infection de la mère au cours du troisième trimestre de grossesse sont généralement normaux (Montoya et Liesenfeld, 2004). Les formes graves correspondent à des hydrocéphalées, des convulsions, des calcifications intracrâniennes et des choriorétinites. Les formes atténuées sont généralement oculaires (strabisme, choriorétinite) ou neurologiques (hypotonie, somnolence transitoire). Elles peuvent également provoquer de manière récurrente des retards psychomoteurs de plus en plus manifestes, des convulsions et des hydrocéphalées.

C. <u>La toxoplasmose chez les animaux</u>

Parmi les espèces d'élevage, la toxoplasmose touche plus particulièrement les ovins, les caprins et les porcins. Elle peut provoquer des encéphalites, des pneumonies ou des mortalités néonatales chez ces animaux. Il s'agit de plus d'une des causes principales d'avortement chez les brebis et les chèvres.

Ainsi entre 1983 et 1989, 14 à 18% des avortements spontanés chez la brebis ont été attribués à une infection par le toxoplasme (Dubey, 1990). En effet, chez les animaux gestants, lorsque la primo-infection a lieu dans les 40 à 50 premiers jours de grossesse, le fœtus meurt et est soit expulsé soit réabsorbé, ce qui passe généralement inaperçu, la brebis étant considérée comme stérile pendant la saison. Si la contagion survient entre le 50^{ème} et le 120^{ème} jour de gestation, on assiste à des avortements tardifs autour du quatrième mois ainsi qu'à des naissances d'agneaux non viables qui meurent à 3 ou 4 jours. En revanche, lors d'infections pendant les derniers mois de gestation, les toxoplasmoses sont inapparentes, sans aucun symptôme, ou avec une simple fièvre, des douleurs musculaires, ou des écoulements nasaux et oculaires pendant un à deux jours. De manière globale, des enquêtes réalisées entre 1960 et 1997 ont montré une séroprévalence chez les ovins comprise entre 15 et 92% avec de grandes disparités selon les régions et les techniques utilisées (Rozette *et al.*, 2005).

Chez le porc, la toxoplasmose constitue un problème de salubrité des aliments plutôt qu'un problème de santé animale. En effet, la plupart du temps, il s'agit d'une infection subclinique, bien qu'elle puisse s'accompagner de signes cliniques, surtout chez les porcelets non sevrés. En revanche, en Europe et aux Etats-Unis, le porc est considéré comme la source majeure d'infection par *T. gondii* chez les humains, *via* l'ingestion de kystes présents dans les tissus. La prévalence de l'infection chez le porc a cependant diminué de manière significative depuis les dix dernières années grâce aux changements des conditions d'élevage. La séroprévalence des porcs en engraissement dans les fermes intensives est ainsi maintenant inférieure à 10% dans de nombreux pays (Tenter *et al.*, 2000). En comparaison, on trouve rarement de kystes dans les viandes de bœuf ou de buffle, alors que la présence d'anticorps spécifiques dans 92% des troupeaux bovins et 20% des buffles est la preuve d'une exposition passée au parasite.

Classe	Ordre	
Coccidies		Eimeria spp Cryptosporidium spp Isospora belli Cyclospora catenayensis Toxoplasma gondii Sarcocystis spp
Hématozoaires	Hémosporidies	Plasmodium spp Haemoproteus Leucocytozoon
	Piroplasmes	Babesia spp (= Piroplasma) Theileria spp
Grégarines		Grégarina Monocystis et Pseudomonocystis Ophriocystis





D'après Ferguson, 2004

Figure 2: Diagramme représentant le cycle biologique de T. gondii

II-<u>Le parasite responsable : *Toxoplasma gondii*, membre du phylum des *Apicomplexa*</u>

Le microorganisme aujourd'hui appelé *Toxoplasma gondii* a été observé pour la première fois en 1900 par Laveran dans le sang d'un oiseau américain (Laveran, 1900) mais sa première description précise a été rapportée en 1908 par Nicolle et Manceaux, suite à sa détection dans le sang, la rate et le foie de rongeurs d'Afrique du Nord, *Ctenodactylus gondii* (Nicole et Manceaux, 1908). Son nom *Toxoplasma gondii* fait référence à sa forme caractéristique en croissant et à son hôte.

T. gondii appartient au phylum des *Apicomplexa*, comme *Plasmodium* ou *Cryptosporidium*, et fait partie de l'ordre des Eucoccidiorida, ordre auquel appartiennent également *Isospora*, *Eimeria*, *Neosporum* et *Sarcocystis* (Figure 1).

A. Le cycle biologique de T. gondii

Il existe deux étapes principales dans le cycle de *T. gondii* : une étape sexuée qui n'a lieu que dans l'intestin de ses hôtes définitifs, les félins, et une étape asexuée chez ses hôtes intermédiaires, les homéothermes (Figure 2).

Lorsqu'un félin ingère des kystes, la paroi est dissoute par les enzymes protéolytiques du tube digestif, libérant ainsi des bradyzoites. Ceux-ci pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin et initient le développement de nombreuses générations de *T. gondii*. Cinq types morphologiquement distincts, désignés A à E, s'y développent avant que la gamétogonie ne débute. Cette multiplication se réalise *via* une forme spécifique de schizogonie dans laquelle le noyau se divise à plusieurs reprises sans division cytoplasmique. A la dernière division nucléaire, des cellules filles appelées mérozoïtes se forment. Ces mérozoïtes libérés des schizontes initient la formation des gamètes. Tandis que les gamontes femelles contiennent un noyau central unique, le noyau des gamontes mâles se divise pendant la microgamétogenèse pour produire 10 à 21 noyaux. Des microgamètes sont ainsi formés, contenant principalement du matériel nucléaire et possèdant deux flagelles, qui leur permettent de nager pour aller fertiliser les macrogamètes matures et former des zygotes. Après cette fertilisation, une paroi se forme autour du zygote ou oocyste, qui est libéré dans le lumen intestinal. Il est ensuite

excrété par le félin, et ce n'est que dans l'environnement extérieur que la sporulation débute, un à cinq jours après l'excrétion (Dubey *et al.*, 1998). Ces oocystes sporulés contenant des sporozoïtes sont contaminants par voie digestive et le restent dans le sol pendant plusieurs mois.

Le noyau de l'oocyste se divise deux fois produisant ainsi quatre noyaux avant que le cytoplasme ne se divise aussi, formant deux sporoblastes contenant chacun deux noyaux. La sporulation continue ensuite par la formation des sporocystes. Des sporozoïtes se forment dans ces sporocystes : les noyaux se divisent chacun en deux et sont incorporés dans les quatre sporozoïtes. Quand les oocystes sporulés sont ingérés par un hôte intermédiaire, les sels biliaires et la trypsine stimulent l'excystation : les sporocystes se rompent, libérant les sporozoïtes qui envahissent les cellules épithéliales de l'instestin où ils se différencient en tachyzoïtes. Ces tachyzoïtes font environ 5 μ m de long sur 2 μ m de large. Ils ont la particularité de pouvoir envahir n'importe quelle cellule nuclée, quelle soit phagocytaire ou non, dans laquelle ils se multiplient de manière asexuée jusqu'à ce que la cellule meure. Ils vont ensuite envahir d'autres cellules et disséminer le processus parasitaire.

Ces tachyzoïtes atteignent de nombreux tissus (en particulier le système nerveux central, les yeux, les muscles cardiaque et squelettiques et le placenta) *via* les réseaux sanguin et lymphatique. Plus précisément, il a été montré dans des modèles murins, que les tachyzoïtes utilisent tout d'abord les cellules dendritiques CD11c⁺ pour atteindre les nodules lymphatiques mésentériques, puis dans le sang ils ont été détectés associés avec des monocytes CD11c⁻ CD11b⁺, ce qui leur permet d'atteindre le cerveau (Courret *et al.*, 2006). Puis, sous la pression de la réponse immune de l'hôte, les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes.

Les bradyzoïtes sont regroupés dans des kystes tissulaires mesurant de 10 à 100 μ m et sont responsables de l'infection chronique. Ils correspondent à une phase de multiplication lente et expriment des molécules antigèniques spécifiques.

Ces trois stades morphologiques, sporozoïte, tachyzoïte et bradyzoïte, diffèrent principalement par leur pouvoir réplicatif, mais ils ont tous en commun une ultrastructure d'ailleurs conservée chez l'ensemble des zoïtes du phylum.



<u>Figure 3</u> : Ultrastructure des tachyzoïtes

(d'après Dubey et al., 1998).

- A) Photographie en microscopie électronique à transmission d'un tachyzoïte de *T. gondii* à l'intérieur d'un macrophage de souris.
 Am : granule d'amylopectine, Co : conoïde, Dg : granules denses, Go : appareil de Golgi, Mn : micronèmes, No : nucléole, Nu : noyau, Pv : vacuole parasitophore, Rh : rhoptrie.
- B) Schéma d'un tachyzoïte

B. <u>Ultrastructure du tachyzoïte de T. gondii</u>

Le tachyzoïte possède trois types d'organites sécrétoires : les micronèmes et les rhoptries, localisés au niveau du pôle apical, et les granules denses situés dans l'ensemble du cytoplasme (Figure 3). Ces organites sont mobilisés lors de l'invasion de la cellule hôte par le parasite. Les produits des micronèmes sont plus particulièrement impliqués dans l'adhésion du parasite à la cellule hôte et son invasion. La sécrétion de protéines adhésives serviraient en effet de pont, direct ou indirect, entre le système acto-myosine du parasite et la surface de la cellule hôte (Soldati *et al.*, 2001). Les produits des rhoptries participent à l'élaboration de la vacuole parasitophore, compartiment subcellulaire dans lequel le parasite se développe et se multiplie. Enfin, les protéines des granules denses sont impliquées dans l'élaboration d'un réseau intravacuolaire.

T. gondii possède également un cytosquelette complexe organisé autour de microtubules. Au pôle antérieur de la cellule, deux anneaux préconoïdaux surmontent le haut du conoïde, une structure en forme de tube. Deux microtubules partent des anneaux préconoïdaux et s'étendent jusqu'au corps de la cellule, en passant par le centre du conoïde. Sous le conoïde, un anneau polaire sert de centre organisateur de microtubules. Il en émerge vingt-deux microtubules qui s'enroulent jusqu'au deux tiers du corps.

D'autre part, le tachyzoïte possède un complexe de membranes internes (IMC), composé de vésicules membranaires qui reposent juste sous la membrane plasmique, et soustendu par les microtubules. Cette structure s'étend des anneaux préconoïdaux à l'extrémité postérieure du parasite. La seule interruption latérale apparente correspond au micropore, situé au milieu du corps de la cellule, qui serait un site actif d'endocytose.

T. gondii est également doté d'un apicoplaste, un organelle de quatre membranes contenant une molécule d'ADN circulaire de 35 kb, correspondant à un plaste, situé dans sa région antérieure. Ce plaste proviendrait de l'endosymbiose secondaire d'une algue verte (Kohler *et al.*, 1997).

C. Les différentes lignées de T. gondii

Une combinaison d'analyses phylogénétiques et statistiques a permis de montrer il y a dix ans que la population de *T. gondii* était constituée de trois lignées prédominantes hautement clonales (Howe et Sibley, 1995) : les souches I, II et III. Les types I et III sont en fait le résultat de seulement un ou deux croisements entre le type II ancestral et une souche

apparentée mais distincte (Howe et Sibley, 1995). Le génotype de type II est responsable de près de deux tiers des cas humains. Mais de grandes différences de phénotypes sont observées selon les souches. En particulier, le type I (dont fait partie la souche RH utilisée en routine dans notre laboratoire) est hautement virulent chez la souris tandis que les types II et III le sont beaucoup moins (Kim et Weiss, 2004). Plusieurs caractéristiques peuvent expliquer ces différences de pathogénicité : les tachyzoïtes de type I montrent une migration plus importante *in vitro* par rapport aux types II et III (Barragan et Sibley, 2002), ils restent également infectieux plus longtemps lorsqu'ils sont extracellulaires (Saeij *et al.*, 2005).

Afin d'identifier plus spécifiquement les protéines responsables de ces différences, de nombreuses équipes ont étudié les variations génomiques existant chez ces lignées. Cinq loci de virulence ont ainsi été caractérisés (Saeij et al., 2006) mais les gènes impliqués sont plus difficilement identifiables. Il a cependant été démontré que le phénotype de migration accrue observé chez le type I était associé au loci situé sur le chromosome VIIa (VIR3) (Barragan et Sibley, 2003). D'autre part, des études récentes ont identifié deux gènes candidats sur la base de leur fonction prédite, de leur polymorphisme, et de leur expression selon les souches. La protéine ROP18 a ainsi été caractérisée : il s'agit d'une kinase fonctionnelle faisant partie du protéome des rhoptries, sécrétée dans la cellule hôte (El Hajj et al., 2007) et qui présente un polymorphisme et une expression différente selon les souches (Taylor et al., 2006). De même la protéine ROP16 est une kinase des rhoptries, extrêmement variable selon les souches, sécrétée dans le cytoplasme, et impliquée dans l'induction, spécifique selon les souches, de la sécrétion de l'interleukine 12 par les macrophages murins ainsi que dans les voies de transcription de la cellule hôte, dont celles médiées par STAT3/6 (Saeij et al., 2006). Beaucoup d'autres protéines doivent être responsables de ces différences de virulence, mais aucun des autres loci de virulence ne présente des gènes candidats possèdant des caractéristiques aussi typiques que ROP16 ou ROP18 (Saeij et al., 2006).



Figure 4 : Modèle de l'invasion par *T. gondii*

(d'après Carruthers et Boothroyd, 2006)



Figure 5 : La mobilité par glissement rotatif chez T. gondii

(Sibley, 2003)

Photographie en immunofluorescence d'une trainée laissée par un tachyzoïte en mouvement obtenue après marquage avec un anticorps spécifique de la protéine de surface SAG1 et visualisé avec des anticorps secondaires conjugués fluorescents.

III-<u>Un zoïte mobile qui envahit sa cellule hôte par un processus</u> actif

T. gondii envahit sa cellule hôte par un processus actif (Figure 4), qui résulte en l'invagination de la membrane plasmique hôte suivie de la résidence du parasite dans une vacuole cytoplasmique. Ce processus diffère de l'internalisation par phagocytose selon plusieurs critères (Morisaki *et al.*, 1995). Tout d'abord, des études en vidéomicroscopie et de microscopie électronique ont montré que l'invasion est polarisée, le parasite présentant toujours son pôle apical à la cellule hôte. Ensuite, l'entrée est très rapide (15 à 30 s contre 2 à 4 min pour une phagocytose) et une constriction est observée sur le corps du parasite lorsqu'il pénètre dans la cellule. Enfin, ces études n'ont pas permis de détecter de « ruffling » membranaire ou de formation de pseudopodes de la cellule hôte. En parallèle, aucune réorganisation des microfilaments d'actine et aucune phosphorylation de résidus tyrosine n'ont été détectées lors de l'invasion, contrairement à ce qui se passe au cours de la phagocytose, qu'elle soit induite ou non par les microorganismes au cours de leur internalisation.

A. La mobilité et l'invasion, des processus dépendants du moteur actomyosine du parasite

Avant d'envahir une cellule hôte *in vivo*, le parasite doit se déplacer à sa surface afin d'atteindre sa cible. Ce déplacement, qui procède par glissement rotatif ou « gliding », implique la redistribution de protéines transmembranaires depuis le pôle apical du parasite, le long du complexe actomyosine subcortical, vers le pôle postérieur du tachyzoïte (Sibley *et al.*, 1998). La trajectoire peut être observée directement *in vitro* par microscopie à contraste de phase ou indirectement grâce au marquage des protéines de surface déposées sur le substrat (Figure 5). Il s'agit de rotations hélicoïdales autour de l'axe longitudinal de la cellule (Hakansson *et al.*, 1999).

Le processus d'invasion est intimement lié à la mobilité du parasite. En particulier, ils dépendent tous les deux du cytosquelette d'actine du parasite. Le rôle de ces microfilaments dans le glissement a été mis en évidence il y a plusieurs dizaines d'années, et ce chez un

certain nombre de membres du phylum des Apicomplexa, par l'utilisation de différentes drogues affectant les différents types de cytosquelette des parasites. En particulier, il a été démontré dès 1981 que la cytochalasine B, qui perturbe spécifiquement les microfilaments d'actine, bloquait le glissement des sporozoïtes d'*Eimeria* (Russell et Sinden, 1981). Le rôle du cytosquelette d'actine parasitaire dans l'invasion a ensuite été confirmé par l'étude de mutants de parasites et de cellules hôtes résistants à la cytochalasine D (Dobrowolski et Sibley, 1996). La comparaison, en présence de cytochalasine, des taux d'invasion, par des tachyzoïtes, de lignées de cellules épithéliales sauvage ou mutée au niveau de l'actine β ' (conférant une résistance à la cytochalasine) a en effet montré que le blocage de l'invasion par ce traitement était dû à un effet sur l'actine du parasite. Il a également été montré que des inhibiteurs de l'activité de la myosine du parasite, tels que l'inhibiteur de la myosine ATPase, bloquaient eux-aussi la mobilité et l'invasion (Dobrowolski *et al.*, 1997a), mettant ainsi en avant le rôle essentiel du moteur d'actomyosine du parasite dans la mobilité et la pénétration dans la cellule hôte.

B. <u>Un préalable à l'invasion : l'attachement réversible à la cellule hôte</u>

Après s'être déplacé sur son substrat, le tachyzoïte atteint une cellule cible à envahir et s'engage à la surface de cette cellule. Cet engagement se concrétise par différentes étapes d'attachement à la cellule, qui font intervenir différents types de protéines parasitaires. Le stade initial serait réversible et contrôlé par les protéines de surface du parasite (Carruthers et Boothroyd, 2007).

Toute la surface du tachyzoïte est recouverte de protéines dites SAG (antigènes de surface à ancre GPI) et SRS (séquence reliée à SAG). Parmi elles, six sont prédominantes : SAG 1 à 3 et SRS 1 à 3 (Lekutis *et al.*, 2001). Plusieurs études successives ont montré le rôle des protéines SAG dans l'attachement initial du tachyzoïte à la cellule hôte. Tout d'abord, le traitement de parasites avec des anticorps dirigés contre SAG1 bloque l'invasion (Mineo *et al.*, 1993). Ensuite, il a été démontré que des tachyzoïtes mutants déficients en SAG3 présentaient une diminution d'invasion de deux fois par rapport aux sauvages, diminution corrélée avec une baisse de l'attachement à la cellule hôte, mise en évidence par des tests de fixation à la glutaraldéhyde qui permettent de séparer les étapes d'attachement et d'invasion (Dzierszinski *et al.*, 2000).

L'abondance et la vaste distribution de ces protéines à la surface des parasites les positionnent de manière optimale pour interagir à relativement faible affinité avec la surface

de la cellule hôte. Le tachyzoïte interagirait initialement avec sa cellule cible avant de se déplacer sur sa surface et engager une interaction plus intime.

Différentes études de microscopie électronique ont montré que les organites de sécrétion participaient aux différentes étapes de l'invasion d'une cellule hôte ainsi qu'au glissement, qu'il s'agisse des granules denses (Leriche et Dubremetz, 1990), des rhoptries (Saffer *et al.*, 1992) ou des micronèmes (Carruthers et Sibley, 1997). La séquence exacte de ces sécrétions a été déterminée : la liaison à la cellule hôte entraîne la libération du contenu des micronèmes au niveau de la zone d'attachement entre les deux partenaires, avant que l'invagination de la membrane plasmique hôte ne soit initiée par la décharge des protéines des rhoptries dans la vacuole parasitophore en formation. Les granules denses libérent leur contenu en dernier permettant que la vacuole parasitophore devienne un compartiment métaboliquement actif (Carruthers et Sibley, 1997, Dubremetz *et al.*, 1993).

C. <u>La première étape de l'invasion : l'importance des protéines</u> micronémales dans l'attachement apical

Environ cent micronèmes sont présents au niveau du complexe apical de chaque tachyzoïte. Ce sont de petits organites allongés le long de l'axe principal du parasite dont le mouvement le long des microtubules ou des microfilaments est nécessaire pour atteindre leur site d'exocytose (Carruthers et Sibley, 1999). Des expériences de sécrétion des micronèmes couplées à des tests d'invasion et dépendantes de la température ont montré le rôle primordial du déchargement des micronèmes pendant le contact entre le pôle apical du parasite et la membrane plasmique de la cellule hôte (Carruthers *et al.*, 1999a).

Onze protéines micronémales (MIC) ont été identifiées jusqu'à présent et il en existe neuf autres potentielles, prédites d'après leurs propriétés de sécrétion ou leur homologie avec d'autres protéines micronémales connues. Elles contiennent une grande variété de domaines adhésifs (Soldati *et al.*, 2001), parmi lesquels des domaines intégrine-like (chez MIC2), des répétitions de type I thrombospondine (chez MIC2 et MIC1), des domaines EGF-like (chez MIC3, et MIC6-9) ou des domaines lectine-like (chez MIC3 et MIC8). Chaque protéine MIC est ainsi structurellement unique. Dans la mesure où ces domaines sont supposés interagir avec les composants de la surface de la cellule hôte, cette diversité pourrait expliquer la grande variété d'hôtes que les tachyzoïtes sont capables d'envahir.



Figure 6 : Les complexes adhésifs protéiques de *T. gondii* (d'après Carruthers, 2002)

Plusieurs études ont tenté d'identifier les récepteurs hôtes des protéines micronémales. Il a ainsi été montré que *T. gondii* utilisait des protéoglycanes sulfatés et la laminine comme récepteurs (Carruthers *et al.*, 2000a, Ortega-Barria et Boothroyd, 1999). Comme ces protéines de la matrice extracellulaire sont exprimées dans de nombreux types cellulaires, ce sont des récepteurs potentiels pertinents pour expliquer le vaste spectre de cellules hôtes du parasite.

Les protéines MIC fonctionnent très souvent en complexes dits « adhésifs » contenant tous, d'une part une protéine transmembranaire responsable de l'ancrage à la membrane du parasite, de l'adressage aux micronèmes et qui est le site du clivage protéolytique libérant le complexe de la surface du parasite, et d'autre part au moins une protéine dont on pense qu'elle lie le(s) récepteur(s) de la cellule cible (Figure 6).

Ainsi, MIC1 est partenaire des protéines MIC4 et MIC6. En supprimant les gènes MIC1, MIC4 et MIC6, l'équipe de D. Soldati a déterminé précisément le rôle de chacun des membres du complexe. MIC1 et MIC4 se lient à la cellule hôte et sont responsables des propriétés adhésives du complexe. MIC4 interagit directement avec MIC1 tandis que MIC6 se lie à MIC1 *via* un domaine EGF-like. De plus, MIC6 possède au niveau de sa queue cytoplasmique une séquence responsable de l'adressage du complexe aux micronèmes. Enfin, MIC1 semble servir de contrôle qualité dans la mesure où le complexe ne peut plus quitter les compartiments de la voie de sécrétion chez les parasites dont le gène MIC1 a été éliminé (Reiss *et al.*, 2001).

De même, MIC3 et MIC8 forment un complexe adhésif libéré à la surface du parasite pendant l'invasion. MIC3 représente l'adhésine du complexe et contient des domaines EGFlike et un domaine liant la chitine, pouvant être impliqués dans des interactions protéineprotéine ou protéine-carbohydrate (Garcia-Reguet *et al.*, 2000), tandis que MIC8 sert de chaperon au complexe en l'ancrant à la membrane du parasite *via* son segment transmembranaire, et en l'adressant aux micronèmes (Meissner *et al.*, 2002a).

Enfin MIC2 interagit avec M2AP (protéine <u>a</u>ssociée à <u>M</u>IC2) sous la forme d'un complexe stable, que ce soit lors de son adressage aux micronèmes, pendant sa sécrétion à la surface du parasite, ou après son clivage (Rabenau *et al.*, 2001). L'association MIC2-M2AP est un complexe hétéro-hexamérique contenant trois entités MIC2-M2AP liées *via* les MIC2 (Jewett et Sibley, 2004). L'élimination du gène M2AP entraîne la rétention de MIC2 dans l'appareil de Golgi, et une très forte diminution du taux d'invasion chez ces parasites mutants (Huynh *et al.*, 2003), suggèrant que le complexe MIC2-M2AP se lierait à un récepteur clé des cellules hôtes. D'autre part, le lien entre le cytosquelette d'actine du parasite et ces adhésines

a été mis en évidence au niveau de MIC2. En effet, il a été montré par GST-« pull down » que la queue cytoplasmique de MIC2 interagissait avec l'aldolase, une protéine capable de lier l'actine F *in vitro* (Jewett et Sibley, 2003).

Tous ces complexes adhésifs pourraient avoir un rôle synergique pendant l'invasion, dans la mesure où l'ablation génique séparée de chacun des gènes atténue l'infection et la virulence *in vitro* (Cerede *et al.*, 2005). En exprimant cette variété de domaines adhésifs, *T. gondii* pourrait ainsi utiliser une large gamme de molécules pour s'attacher à sa cellule hôte, augmentant le spectre de cellules potentiellement permissives.

Ces protéines micronémales sécrétées sont ensuite transloquées à la surface du parasite vers son pôle postérieur au fur et à mesure de son entrée dans la cellule hôte (Opitz *et al.*, 2002). C'est en particulier le cas pour MIC2 (Carruthers *et al.*, 1999a) et MIC3 (Garcia-Reguet *et al.*, 2000) et il a été de plus démontré pour des protéines micronémales d'*Eimeria* que cette translocation était dépendante du cytosquelette d'actine (Bumstead et Tomley, 2000).

Les protéines MIC à domaine transmembranaire sont ensuite clivées, ce qui les libère de la surface du parasite, étape essentielle pour la réalisation de l'invasion (Brossier *et al.*, 2003). Il a été récemment démontré que MIC2 était clivé à différents sites par deux enzymes distinctes : MPP1 en C-terminal et MPP2 en N-terminal (Carruthers *et al.*, 2000b). MIC4 et MIC6 sont elles aussi clivées après leur sécrétion (Brecht *et al.*, 2001, Reiss *et al.*, 2001). Le site de clivage de MIC2 et MIC6 a été identifié au niveau de leur domaine transmembranaire (Opitz *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2004), caractéristique qui, associée au fait que MPP1 n'est inhibée que par un inhibiteur connu des rhomboide protéases, suggérerait que MPP1 pourrait faire partie de cette famille de protéase (Brossier *et al.*, 2005). D'autre part, une subtilisine-like protéine, TgSUP1, une sérine protéase à ancre GPI a été identifiée comme étant sécrétée par les micronèmes (Miller *et al.*, 2001).

D. <u>Le rôle d'AMA1 et des protéines du cou des rhoptries dans la</u> formation de la jonction mobile lors de la pénétration

La troisième étape de l'attachement implique un contact très intime avec la surface de la cellule hôte. Cette étape requiert la protéine AMA1 (<u>antigène membranaire apical 1</u>), localisée dans les micronèmes, comme en témoignent des expériences de « knock-out » conditionnel de AMA1 dans les tachyzoïtes (Mital *et al.*, 2005). Quand les parasites n'expriment plus AMA1, leur capacité d'invasion est fortement diminuée. Plus précisément,

ces parasites sont capables d'exocyter le contenu de leurs micronèmes et de se lier à leur cellule hôte, mais ils ne peuvent plus sécréter les protéines de rhoptries, protéines nécessaires à une pénétration active dans la cellule hôte (Mital *et al.*, 2005). Ceci suggère un lien étroit entre les produits des deux types d'organites secrétoires.

La fonction d'AMA1 a été étudiée par immunoprécipitation à partir de lysats parasitaires. Deux protéines copurifiant avec AMA1 ont ainsi été identifiées (Alexander *et al.*, 2005). Il s'agit de RON2 et RON4, localisées dans la région du cou des rhoptries (Bradley *et al.*, 2005) et qui sont sans doute sécrétées juste avant le reste du contenu des rhoptries. RON2 et RON4 forment un complexe stable avec AMA1. Deux études différentes ont montré qu'elles coopéraient pour former la jonction mobile, la bande en forme d'anneau d'interaction étroite entre le parasite et la cellule hôte (Alexander *et al.*, 2005, Lebrun *et al.*, 2005).

Le parasite pénètre dans la cellule hôte au sein de sa vacuole parasitophore en avançant « à travers » cette jonction mobile. Une des fonctions de cette jonction serait de trier les protéines issues de la membrane plasmique de la cellule hôte et du parasite qui seront contenues dans la membrane de la vacuole parasitophore (PVM). Ainsi elle laisserait « passer » les lipides membranaires de la cellule hôte, qui constituent la majorité des lipides de la PVM, ainsi que certaines protéines de surface à ancre GPI, alors que les protéines transmembranaires seraient exclues (Mordue *et al.*, 1999). De même, les protéines SAG à ancre GPI ainsi que AMA1 semblent franchir la jonction mobile tandis que les autres protéines MIC sont spécifiquement exclues. Cette sélection aboutit à la genèse de la vacuole parasitophore, comme compartiment non fusogène.

E. <u>Le rôle des protéines de rhoptries dans la formation de la vacuole</u> parasitophore.

Les rhoptries sont des organites de grande taille, en forme de club de golf, consistant en un corps bulbeux et en un cou étroit, dense en microscopie électronique et qui s'étend à travers le conoïde. Ce sont les seuls compartiments à pH acide dans le tachyzoïte (Shaw *et al.*, 1998). Le cou sert de canal par lequel les protéines des rhoptries sont sécrétées une fois l'attachement réalisé, au début de l'invasion (Carruthers et Sibley, 1997). L'utilisation d'inhibiteurs de la polymérisation de l'actine a permis de mettre en évidence le rôle essentiel des rhoptries dans la formation de la vacuole parasitophore. En effet, des tachyzoïtes traités à la cytochalasine D sont incapables d'envahir leur cellule hôte, mais ils déchargent quand même le contenu de leurs rhoptries, entraînant la formation de vacuoles sans parasite, appelées evacuoles (Hakansson *et al.*, 2001). Ces evacuoles contiennent des marqueurs de rhoptries et s'associent aux mitochondries et au réticulum endoplasmique hôte, comme des vacuoles parasitophores normales.

Parmi les constituants des rhoptries, se trouvent d'une part des lipides, empaquetés dans un réseau cristallin au sein de l'organite, et d'autre part un certain nombre de protéines, dont les protéines ROP.

Cinq protéines ROP ont été identifiées avant 2005 : ROP1, 2, 4, 8 et 9. ROP1 et ROP9 sont des protéines solubles mais de fonction inconnue (Ossorio *et al.*, 1992, Reichmann *et al.*, 2002). ROP2, ROP4 et ROP8 sont les membres d'une même famille de protéines associées à la PVM.

Le rôle de ROP2 a été particulièrement étudié dans le recrutement des mitochondries et du réticulum endoplasmique de la cellule hôte à la face extérieure de la PVM. En effet, cette membrane forme des associations étroites avec les mitochondries et le réticulum endoplasmique de l'hôte. Ainsi 4 h après l'invasion, 75% de la surface de la PVM est associée à ces organites. Cette association ne peut pas être due à des contraintes stériques dans la mesure où elle n'est pas observée avec les vacuoles d'autres parasites comme *Leishmania amazonensis* ou *Coxiella burnetti* (Sinai *et al.*, 1997). L'équipe de K. Joiner a ainsi mis en évidence par cofractionnement que la protéine ROP2 était insérée dans la PVM (Beckers *et al.*, 1994), et qu'elle copurifiait avec la calnexine, un marqueur du réticulum endoplasmique de la cellule hôte (Sinai *et al.*, 1997). Elle a également montré que cette liaison était due au domaine N-terminal de ROP2, exposé dans le cytosol hôte, et correspondant à un signal d'import mitochondrial (Sinai et Joiner, 2001). Les mitochondries de la cellule hôte reconnaissent ce signal et essaient d'importer ROP2 qui reste fermement ancré dans la PVM, entraînant ainsi les mitochondries hôtes à proximité de la vacuole.

D'autres protéines ont été identifiées dans les rhoptries. Parmi elles, deux protéases : une subtilisine-like protéine (TgSUB2) et une cathepsine-like protéine (Toxopaine-1) sont impliquées dans le processing des protéines de rhoptries (Miller *et al.*, 2003, Que *et al.*, 2002), et un échangeur sodium-hydrogène (TgNHE2) joue un rôle dans l'osmotolérance de l'organite (Karasov *et al.*, 2005).

Les protéines des rhoptries ont fait l'objet de nombreuses études récentes en particulier par une approche protéomique. Trente-huit nouvelles protéines ROP potentielles ont ainsi été identifiées par l'équipe de J. Boothroyd (Bradley *et al.*, 2005). Parmi elles se trouve un certain nombre de kinases, phosphatases et protéases, qui, après sécrétion dans la cellule hôte, pourraient agir sur certaines de ses voies de signalisation.

F. <u>Le rôle des protéines des granules denses dans le fonctionnement de la</u> vacuole parasitophore

Une fois la vacuole formée, les granules denses libèrent leur contenu à partir des pôles antérieur et postérieur du parasite (Carruthers et Sibley, 1997). En particulier, un réseau intravacuolaire se forme à partir de l'extrémité postérieure du tachyzoïte où des vésicules multi-lamellaires sont concentrées après l'invasion. Ces vésicules sont redistribuées pour former de longs tubules de 60 à 90 nm de diamètre qui s'étendent dans toute la vacuole et forment des connections avec la PVM (Sibley *et al.*, 1995).

Ce réseau tubulaire est associé à au moins quatre protéines des granules denses : GRA1, GRA2, GRA4 et GRA6. GRA3, GRA5 et GRA8 sont eux localisés dans la membrane de la vacuole et restent séparés des autres protéines GRA dans le réseau tubulaire. Le mécanisme par lequel ces protéines passent d'une forme soluble dans les granules denses, à une localisation transmembranaire dans la PVM est pour l'instant peu connu mais il implique sans doute un profond changement conformationnel.

Grâce à la composition de sa membrane, la vacuole parasitophore est un compartiment subcellulaire isolé du système de dégradation par endocytose. Mais elle isole également le tachyzoïte du milieu intracellulaire hôte. C'est par le biais de pores qui permettent la libre diffusion de molécules de moins de 1300 daltons (Schwab *et al.*, 1994) que le parasite a accès aux nutriments présents dans le cytoplasme de la cellule hôte. Par exemple, du fait que *T. gondii* est auxotrophe pour la biosynthèse des purines, ces pores doivent lui permettre d'acquérir des purines sous la forme d'ATP du cytosol de la cellule hôte. GRA3, protéine soluble capable de s'oligomériser et de s'insèrer dans la membrane de la vacuole pourrait constituer un complexe impliqué dans la formation de ces pores.

IV-Objectifs

L'équipe d'I. Tardieux a identifié chez le tachyzoïte invasif une protéine, appelée toxofiline, impliquée dans la liaison à l'actine, et jouant un rôle central dans le système

moteur du parasite (Poupel *et al.*, 2000). Une protéine de 36 kDa a été co-purifiée avec le complexe actine G -toxofiline. Après clonage du gène correspondant, cette protéine a été identifiée comme étant un homologue de divers sérine-thréonine phosphatases de type 2C (PP2C) eucaryotes et possède les caractéristiques biochimiques de cette famille.

Mon projet de thèse porte sur la caractérisation fonctionnelle de cette phosphatase (TgPP2C) et s'articule autour de trois objectifs principaux qui seront traités dans les trois chapitres de ce mémoire.

- I) La TgPP2C ayant été purifiée avec le complexe actine G-toxofiline, mon premier objectif a concerné la dissection moléculaire des interactions entre les membres de ce tricomplexe. En particulier, j'ai cherché à identifier, par différentes approches biochimiques, les régions et les acides aminés de la toxofiline, critiques pour sa liaison à l'actine G et à la TgPP2C. Cette étude a donné lieu à une publication jointe en annexe.
- II) Mon deuxième objectif de recherche a porté sur l'analyse des propriétés fonctionnelles de la TgPP2C par une stratégie de surexpression dans les tachyzoïtes. J'ai ainsi montré le rôle de la TgPP2C dans la multiplication intracellulaire du parasite, et j'ai mis en évidence que cette phosphatase était sécrétée dans la cellule hôte.
- III) Enfin, le troisième objectif de mon projet de thèse a consisté à étudier le rôle de la TgPP2C dans la cellule infectée. Pour ce faire, une approche d'expression ectopique de la TgPP2C en cellule de mammifère a d'une part été choisie, et un crible double hybride en levure a d'autre part été réalisé afin d'identifier des partenaires hôtes potentiels de la TgPP2C.

Ces deux deriers objectifs ont abouti à l'obtention de données qui seront prochainement organisées sous la forme de deux manuscrits (travail en cours)

CHAPITRE 1

CHAPITRE I

IDENTIFICATION DES SITES D'INTERACTION ENTRE LES TROIS MEMBRES DU COMPLEXE ACTINE-TOXOFILINE-TGPP2C

I-Introduction

Les propriétés motiles sont au centre du vivant. Elles s'expriment selon des modalités différentes qui reposent sur des mécanismes générateurs d'énergie conservés chez les protozoaires comme les métazoaires.

Un des modes de locomotion est la nage. Elle est utilisée par une grande variété de cellules qui emploient des cils ou des flagelles pour se propulser dans un environnement liquide. Ces appendices ciliaires sont formés autour d'une structure constituée de neuf doublets de microtubules parallèles, arrangés autour d'une paire centrale. La force de propulsion est fournie par des milliers de moteurs de dynéines ancrés sur les côtés des microtubules (Wemmer et Marshall, 2004). La nage permet aux cellules de se déplacer à une vitesse de 10 à 100 μ m/s, voire 1 mm/s chez certains ciliés.

Un second mode de locomotion, très répandu est la reptation sur substrat. Il permet à une cellule de se déplacer à une vitesse allant de $0,01\mu$ m/s à 1μ m/s selon les types cellulaires et les conditions de migration (chemotaxie, ...). La reptation se caractérise par la mise en place d'une protrusion du front de migration de la cellule et l'établissement de nouveaux contacts entre le plasmalemme et le substrat. La portion « traînante » est ensuite rétractée vers l'avant, et adhère tandis que les anciens attachements au substrat sont éliminés, si bien que la cellule avance. Cette dernière doit donc subir des déformations importantes au cours de ce déplacement. Dans la plupart des cas, ce mouvement est mené par des réorganisations dynamiques du cytosquelette d'actine souvent conjuguées avec la mobilisation du cytosquelette de tubuline.

A. Le rôle du cytosquelette d'actine dans la locomotion





1-Les propriétés dynamiques de l'actine

L'actine est une protéine très conservée parmi les espèces. Il s'agit d'une protéine de 42 kDa, constituée de 375 acides aminés, et identifiée pour la première fois en 1942 par Straub, comme faisant partie du complexe d'actomyosine responsable de la genèse de la force contractile dans les muscles de lapin.

L'actine est aussi une des protéines les plus abondantes dans les cellules eucaryotes non musculaires, dans la mesure où elle représente 5 à 10% de la masse protéique de ces cellules. Il existe différentes isoformes codées par des gènes structurellement très proches qui auraient évolué à partir d'un gène ancestral. Chez les vertébrés supérieurs, six isoformes sont dénombrées. Elles ne diffèrent que de quelques acides aminés et sont exprimées spécifiquement selon le tissu cellulaire et le stade du développement. Quatre de ces isoformes sont musculaires, et deux sont cytoplasmiques non musculaires (les actines β et γ).

Les premiers cristaux d'actine exploitables pour une analyse tridimensionnelle, obtenus en 1990 (Kabsch *et al.*, 1990) ont montré une structure globulaire composée d'un petit et d'un grand domaine. Le petit domaine renferme les sous-domaines 1 et 2 tandis que le grand domaine contient les sous-domaines 3 et 4 (Figure 7). Enfin, entre ces deux domaines principaux se trouve le lieu de fixation du cation divalent et du nucléotide (ATP ou ADP) indispensables à la stabilité de la molécule. En effet, l'actine est une ATPase capable d'hydrolyser l'ATP en ADP, une propriété à la base de sa capacité à générer de l'énergie et couplée à la formation de polymères.

Des forces électrostatiques et hydrophobes contribuent à former des polymères d'actine homogènes, non covalents (actine F). Ces filaments sont des structures hélicoïdales d'environ 10 nm de diamètre et pouvant atteindre plusieurs micromètres de longueur.

Le mécanisme de formation de ces filaments, dit de « nucléation-élongation » a été élucidé par Oosawa et son modèle cinétique par Wegner et Engel en 1975 (Wegner et Engel, 1975). La polymérisation se divise en trois étapes fondamentales, plus ou moins lentes, sensibles à la force ionique, aux sels divalents, à la nature du nucléotide lié et à la concentration critique en actine. La première étape est l'activation : le monomère (actine G) se lie à un cation et à de l'ATP, induisant ainsi un changement conformationnel qui le laisse sous forme activée. La deuxième étape est la nucléation qui correspond à l'étape limitante de la polymérisation : les monomères se regroupent en un trimère, fortement instable, avant de pouvoir s'allonger spontanément en



<u>Figure 8</u> : Représentation du cycle "en tapis roulant" de l'actine F à l'état d'équilibre (d'après Carlier, 1998)



Figure 9 : Les différents rôles des protéines liant l'actine

Schéma représentant le rôle des différentes protéines liant l'actine sur le cycle de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine

(d'après Revenu et al., 2004)
filament. La dernière étape est la phase de croissance pendant laquelle le filament s'allonge rapidement.

La liaison formée entre les monomères d'actine dans le filament est une liaison faible. De ce fait, l'actine filamentaire est constamment en équilibre dynamique avec l'actine globulaire. Plus précisément, pour une extrémité donnée, le taux d'association des monomères au filament est proportionnel à la concentration en actine G dans le milieu. Au cours du temps, ces monomères sont consommés et leur concentration diminue jusqu'à atteindre une valeur critique à laquelle la dépolymérisation contrebalance la polymérisation si bien que le filament arrête de croître. *In vivo*, les monomères qui polymérisent préférentiellement sont ceux liés à l'ATP. Une fois dans le filament, l'ATP est hydrolysé du filament en ADP-Pi puis le phosphate inorganique est libéré. Ce processus lent induit une hétérogénéité du filament pour la composition du nucléotide lié selon la proximité du bout pointu ou du bout barbé. De ce fait, le bout barbé va préférentiellement incorporer des monomères tandis que le bout pointu va plutôt en dissocier aux concentrations d'actine disponibles dans les cellules. Ceci est responsable d'un mécanisme de tapis roulant (« treadmilling ») dans lequel la longueur du filament reste stable avec des sous-unités en plus au bout barbé et des sous-unités en moins au bout pointu (Figure 8).

Cependant ce processus est modifié et régulé *in vivo* par l'action de très nombreuses protéines liant l'actine (ABP).

2-La régulation du cytosquelette d'actine par les protéines associées

Il existe une soixantaine de protéines liant l'actine, réparties en cinq groupes selon leur activité sur l'actine (Revenu *et al.*, 2004) (Figure 9). Certaines :

- favorisent la polymérisation des filaments : ce sont les protéines nucléatrices,
- régulent l'addition des monomères en les séquestrant ou en favorisant l'échange entre l'ADP et l'ATP : ce sont les protéines séquestrantes,
- se lient aux extrémités. Celles du bout barbé empêchent l'élongation : ce sont les protéines coiffantes,
- causent la fragmentation des filaments : ce sont les protéines coupantes,
- sont responsables de l'arrangement, dans l'espace, des filaments d'actine entre eux.

La présentation qui suit n'est pas une liste exhaustive de toutes les protéines existantes associées à l'actine. Elle est focalisée sur des protéines dont les propriétés fonctionnelles établies sont caractéristiques d'une activité régulatrice sur la dynamique de l'actine.



<u>Figure 10</u> : Les différentes protéines nucléatrices (Goley et Welch, 2006)

a)Les protéines nucléatrices

La nucléation de nouveaux filaments d'actine est un aspect de la régulation qui nous intéresse particulièrement car les résultats que nous avons obtenus, et qui sont développés dans la suite de ce manuscrit, font référence à des protéines impliquées dans ce processus.

Il existe à ce jour trois classes de protéines facilitant la polymérisation de nouveaux filaments d'actine : le complexe Arp2/3, les formines et la protéine Spire (Figure 10).

Arp2/3 a été identifié chez l'amibe *Acanthamoeba castellani* (Machesky *et al.*, 1994) mais est conservé chez les cellules eucaryotes, depuis les levures jusqu'aux mammifères. Il n'est curieusement pas présent chez les parasites Apicomplexes (Gordon et Sibley, 2005) et diverge fortement chez *Leishmania major* (Berriman *et al.*, 2005). Ce complexe consiste en sept polypeptides : Arp2, Arp3 et ARPC1-5. Seul, il possède une faible activité nucléatrice, mais il est activable par des facteurs favorisant la nucléation (NPF). Ainsi activé, il est capable d'initier la formation d'un nouveau filament fils qui émerge d'un filament père déjà existant, dans une configuration branchée en Y avec un angle de 70° (Amann et Pollard, 2001, Mullins *et al.*, 1998). Ce type de nucléation est appelé nucléation dendritique.

Arp2/3 est régulé par deux classes de NPF parmi lesquelles se trouvent les protéines des familles WASP et WAVE/SCAR. Alors que les membres de la famille WASP sont impliquées en particulier au trafic membranaire et à l'endocytose, WAVE est nécessaire à la formation de protrusions membranaires (Stradal et Scita, 2006). Brièvement, ces protéines possèdent toutes un domaine commun WCA composé d'un domaine WH2 qui se lie à l'actine G de manière à permettre sa polymérisation sur le bout barbé, et d'un domaine acide qui est responsable de la liaison à Arp2/3 (Marchand et al., 2001). WASP délivre un monomère d'actine au complexe Arp2/3, formant ainsi un trimère Arp2-Arp3-actine qui sert de noyau pour initier le nouveau filament. La cortactine est un autre NPF existant chez les métazoaires (Weaver et al., 2001). Elle contient une région acide capable de lier Arp2/3, mais pas de domaine liant l'actine G. En revanche, elle possède un domaine de liaison à l'actine F, nécessaire à l'activation de Arp2/3. Les NPF de classe II activent sans doute Arp2/3 en promouvant son association avec l'actine F qui est elle-même activatrice du complexe (Uruno et al., 2001). Cependant leur fonction la plus importante semble être de stabiliser l'organisation branchée en Y des réseaux d'actine formés par Arp2/3 et les NPF de classe I. Les deux classes d'activateurs peuvent agir en synergie : WASP peut en effet recruter la cortactine domaine SH3. via son



Figure 11 : Mécanisme de nucléation de l'actine par la protéine Spire

(Kerkhoff, 2006)

- A) Un dimère d'actine initial est formé par liaison de deux monomères aux domaines WH2 C et D. La région intermédiaire L3 promouvrait la formation du dimère en stabilisant l'interaction entre les deux monomères.
- B) Deux autres monomères se lient aux domaines WH2 A et B, constituant ainsi un tétramère d'actine longitudinal.
- C) La polymérisation rapide continue à partir de ce noyau.

Les formines qui composent le deuxième groupe de protéines nucléatrices sont conservées chez la plupart des eucaryotes. Elles entraînent la formation de filaments non branchés (Kovar, 2006). Ce sont de grandes protéines constituées en particulier d'un domaine FH2 de 400 acides aminés et d'un domaine FH1 riche en prolines situé près de l'extrémité C-terminale. Ces deux domaines collaborent pour permettre l'assemblage des filaments. Des études cristallographiques réalisées sur les formines de levure ont montré que le domaine FH2 formait un dimère stable et flexible de telle sorte que deux têtes de liaison à l'actine étaient attachées ensemble à chaque extrémité (Xu *et al.*, 2004). Ainsi ce dimère de domaines FH2 stabilise un dimère ou un trimère d'actine, facilitant la nucléation. Il reste ensuite associé avec le bout barbé, ce qui explique le caractère processif des formines (Higashida *et al.*, 2004).

Spire constitue le dernier groupe de protéines nucléatrices caractérisé à ce jour. Il est conservé parmi les métazoaires. Des études chez la drosophile ont montré que les protéines Spire possèdent quatre domaines WH2 capables de lier chacun un monomère d'actine. Ces domaines sont ainsi responsables de l'association longitudinale de quatre sous-unités d'actine, qui servent ensuite d'échafaudage pour la polymérisation d'un nouveau filament non branché (Figure 11) (Quinlan *et al.*, 2005).

b)Les protéines séquestrantes

Les protéines séquestrantes se lient à l'actine monomérique, l'empêchant ainsi de polymériser.

Parmi elles, la profiline séquestre les monomères d'actine *in vitro*. Elle promeut également la polymérisation des filaments (Theriot et Mitchison, 1993), d'une part en facilitant l'incorporation, au niveau d'extrémités coiffées, de monomères auxquels elle est liée, et d'autre part en augmentant la vitesse d'échange ADP/ATP sur ces monomères.

La famille ADF/cofiline joue également un rôle séquestrant, consécutif à son action de dissociation des monomères d'actine - ADP de l'extrémité pointue des filaments d'actine.

Au contraire, la thymosine β 4 se lie avec une très forte affinité aux monomères d'actine G – ATP. En séquestrant ces sous-unités, elle tamponne fortement la quantité d'actine G directement polymérisable.

c)Les protéines coiffantes

Les protéines coiffantes se lient à l'extrémité des filaments d'actine ce qui empêche l'incorporation, comme la dissociation, des monomères. Le prototype des protéines coiffantes est la protéine CapZ, présente dans les cellules musculaires. Ces protéines contrôlent la dynamique de l'actine en établissant une forte concentration d'état d'équilibre de l'actine G – ATP lorsqu'elles coiffent les bouts barbés (Carlier et Pantaloni, 1997).

En parallèle, les protéines de la super-famille des gelsolines, qui cassent les filaments d'actine, coiffent l'extrémité barbée du filament cassé (McGough, A. M. *et al.*, 2003). Ce coiffage est très stable, la dissociation entre ces protéines et le bout barbé étant régulée par le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) (Hartwig *et al.*, 1995).

d)Les protéines coupantes

Les protéines coupantes régulent le nombre et la longueur des filaments d'actine en les clivant. Deux grandes familles constituent ce groupe.

Tout d'abord les membres de la super-famille de la gelsoline, lorsqu'ils sont activés par la présence de calcium, se lient au filament d'actine, ce qui induit une coupure puis une cassure du filament. Ces protéines restent ensuite liées à l'extrémité barbée, bloquant la croissance du filament. Le calcium est ici responsable d'un changement conformationnel de la protéine dont le site de liaison à l'actine est exposé ou non.

Ensuite les membres de la famille ADF/cofiline se lient à l'actine G ou F portant préférentiellement de l'ADP. Cette liaison entraîne un changement de conformation du filament en modifiant de 25% le pas de l'hélice (McGough, A., 1998, McGough, A. *et al.*, 1997). Cette modification fragilise de ce fait la liaison entre les monomères du filament et augmente ainsi la dissociation, au niveau des extrémités pointues, des complexes cofiline-actine-ADP dont elle empêche l'échange de nucléotide (Bamburg *et al.*, 1999). L'activité de la cofiline est régulée par phosphorylation de son domaine N-terminal (Morgan *et al.*, 1993).

e)Les protéines responsables de l'arrangement dans l'espace des filaments

Ces protéines organisent les filaments en structures tridimensionnelles. Parmi elles se trouvent les protéines qui réticulent les filaments d'actine et les organisent en faisceaux, comme la fimbrine et l' α -actinine. La fimbrine arrange les filaments parallèlement de manière très resserrée et dans une orientation identique tandis que l' α -actinine les coordonne dans des orientations inverses, pour former par exemple les fibres de stress et les anneaux contractiles.



Figure 12 : Schéma mécanochimique du cycle d'actomyosine

(Geeves et al., 2005)

- A) A partir du complexe rigide actine-myosine,
- **B)** L'ATP se lie pour dissocier rapidement le complexe et le bras de levier est réprimé en position de pré-propulsion
- C) L'ATP est hydrolysé et le complexe myosine-ADP.Pi se relie à l'actine d'abord faiblement,
- D) Puis fortement.
- E) La liaison à l'actine induit la dissociation du Pi et la propulsion.
- F) L'achèvement du mouvement de la queue est suivi par la libération de l'ADP pour revenir au complexe rigide.

3-Rôle des myosines dans la locomotion

La mobilité cellulaire repose sur la genèse de deux forces différentes par la cellule. Il s'agit d'une part d'une force protrusive, imputable la plupart du temps à la polymérisation de l'actine, et d'autre part d'une force de tension contractile, qui est due aux myosines, moteurs moléculaires associés aux filaments d'actine de manière dépendante de l'ATP. Les myosines sont en effet des ATPases qui convertissent l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP en force mécanique qui permet un mouvement le long du filament d'actine (Highsmith *et al.*, 2000) (Figure 12).

La superfamille des myosines comprend au moins vingt classes différentes (Krendel et Mooseker, 2005). Cette organisation provient de l'analyse phylogénétique des séquences protéiques comprenant le domaine correspondant à la tête de myosine, partie de la molécule où se situe le potentiel mécanochimique de cette protéine moteur. Dans la plupart des myosines, un domaine cou de longueur variable suit le domaine tête et inclut un ou plusieurs motifs IQ, qui pourraient lier la calmoduline ou d'autres types de chaînes légères, et qui contribuent à la régulation de la fonction de la myosine. Chaque myosine est terminée par un domaine queue C terminal, dont la structure et la fonction varient selon les différentes classes de myosine. Ce domaine semble également responsable de la localisation de la myosine ainsi que de ses interactions variées avec d'autres constituants cellulaires (Krendel et Mooseker, 2005).

B. La locomotion de T. gondii : le glissement rotatif

Contrairement à la reptation ou à la nage, le glissement est réalisé sans l'aide d'un battement ciliaire ou flagellaire et sans distorsion importante de la forme de la cellule. Cette mobilité, observée pour la première fois au dix-huitième siècle sur les diatomées, est dépendante du substrat et permet une vitesse rapide de 1 à $10 \mu m/s$.

Chez *T. gondii*, le glissement a été examiné par vidéomicroscopie en temps réel (Hakansson *et al.*, 1999). Il a ainsi été mis en évidence un mouvement vers l'avant réalisé soit par glissement circulaire, pendant lequel le parasite semble tourner circulairement tout en



Figure 13 : Modèle d'un cycle complet du glissement observé chez *T. gondii* (Hakansson *et al.*, 1999)



Figure 14 : Distribution de l'actine dans le réseau subpelliculaire

(Patron et al., 2005)

- A) L'actine est détectée par marquage à l'or avec des anticorps anti-C4 actine. Elle est distribuée dans tout le réseau subpelliculaire (têtes de flèches)
- **B)** Photographie correspondant à un anneau polaire postérieur libéré avec les restes du réseau et décoré à l'or avec les anticorps anti-C4 actine (flèches)
- C) Contrôle négatif : réseau subpelliculaire incubé avec un anticorps monoclonal dirigé contre la dystrophine.

Apr, anneau polaire apical; c, conoïde; Mt, microtubules; Nt, réseau subpelliculaire. Barres = 200 nm

avançant à une vitesse de 1,5 μ m/s, soit par glissement hélicoïdal à une vitesse de 1 à 3 μ m/s, accompagné d'une rotation du parasite de 360° autour de son axe longitudinal (Figure 13).

Le glissement s'articule autour de trois événements : la liaison de la cellule à un substrat, la mobilisation d'un complexe moteur dans le cortex de la cellule, et celle d'un « connecteur » transmembranaire reliant les molécules responsables de l'adhésion avec l'appareil moteur cytoplasmique. Or, il a été fréquemment montré que cette mobilité était sensible à la cytochalasine, mettant en évidence le rôle fondamental du cytosquelette d'actine parasitaire dans ce phénomène.

1-Les particularités de l'actine de T. gondii

Le gène de l'actine de *T. gondii* (ACT1) a été identifié en 1997 (Dobrowolski *et al.*, 1997b). Il s'agit d'un gène à copie unique qui code pour une protéine de 44 kDa. Sa séquence diverge notablement de celle des autres actines conventionnelles eucaryotes. C'est pourquoi ACT1 a été classé dans une sous-famille distincte, avec les actines des autres membres des Apicomplexes, telles que PfACT1 et PfACT2, les deux actines de *P. falciparum*. Alors que PfACT1 est exprimé de manière ubiquitaire à tous les stades du cycle biologique de *P. falciparum*, PfACT2 est restreint aux stades sexués (Schuler *et al.*, 2005b).

Bien que le rôle de l'actine dans la mobilité du tachyzoïte de *T. gondii* ait été suggéré depuis les années 80 grâce à l'utilisation de la cytochalasine D, sa visualisation a été sujette à plus de controverses. En effet, les premières études réalisées avec des anticorps spécifiques d'actines hétérologues ont mis en évidence une localisation apicale et parfois corticale de l'actine parasitaire. Elle n'a été détectée dans le cytoplasme qu'exceptionnellement. Les anticorps spécifiques de l'actine de *T. gondii* ont fourni des informations comparables (Dobrowolski *et al.*, 1997b). Il est à noter qu'aucun marquage n'était observé avec de la phalloidine. L'utilisation de la microscopie électronique a également permis de mettre en évidence que le réseau sous-pelliculaire identifié en association étroite avec l'IMC (Mann et Beckers, 2001) était constitué de filaments d'actine (Figure 14) (Patron *et al.*, 2005).

Jusqu'à la fin des années 90, la disposition des filaments d'actine dans le parasite n'avait pas été élucidée car les études de microscopie électronique n'avaient pas permis d'identifier de filaments de manière convaincante (Shaw et Tilney, 1999). Au contraire, des études de fractionnement cellulaire ont indiqué que plus de 97% de l'actine était sous forme monomérique (Dobrowolski *et al.*, 1997b) mais capable de polymériser (Poupel et Tardieux, 1999). Les études ont avancé de manière importante suite à l'utilisation de jasplakinolide, qui stabilise l'actine F et induit sa polymérisation. Ainsi, son addition lors de l'isolement de



<u>Figure 15</u> : Photographie en microscopie électronique d'un parasite attaché à la surface de la cellule hôte pendant le processus de pénétration

(Schatten et al., 2003)

La membrane cellulaire a été éliminée par un traitement en 0,15% Triton X-100 dans un tampon préservant le cytosquelette.

Le réseau de fibres d'actine du parasite est indiqué par des flèches tandis que celui de la cellule hôte est indiqué par des têtes de flèche.

fractions contenant le cytosquelette parasitaire, permet d'augmenter significativement la quantité d'actine F et sa récupération (Poupel et Tardieux, 1999, Wetzel *et al.*, 2003). Il est alors possible, par microscopie à balayage et haute résolution, de visualiser des filaments d'actine situés juste sous la membrane plasmique du parasite (Figure 15) (Schatten *et al.*, 2003). De plus, la jasplakinolide affecte la mobilité. En particulier, alors que le mouvement circulaire du glissement est inhibé, le mouvement hélicoïdal est accéléré mais donne lieu à des inversions rapides de direction de la part du parasite, entraînant un mouvement avant-arrière, empêchant tout déplacement net vers l'avant (Wetzel *et al.*, 2003). Ce changement de direction est attribué à une modification de la quantité des filaments d'actine, mettant en évidence le rôle clé de la polymérisation de l'actine dans la régulation du glissement.

2-Les particularités de la myosine de T. gondii

Suite à la mise en évidence du rôle du cytosquelette d'actine dans la mobilité du tachyzoïte, il était naturel de rechercher un moteur de myosine pouvant interagir avec l'actine pour contribuer à la force nécessaire au glissement.

L'utilisation d'anticorps hétérologues a permis de détecter la présence de myosines, petites par rapport aux autres myosines eucaryotes, et localisées au niveau du pôle antérieur du parasite (Dobrowolski *et al.*, 1997a). La même étude a mis en évidence que des inhibiteurs de la fonction ATPasique de la myosine bloquent la mobilité du parasite, prouvant son rôle dans le glissement.

Trois myosines ont été identifiées et clonées chez *T. gondii* : elles possèdent une séquence qui diffère de manière significative de celle des autres myosines connues. C'est pourquoi elles ont été regroupées dans une nouvelle classe de myosines, la classe XIV (Heintzelman et Schwartzman, 1997). Parmi elles, TgMyoA est très particulière car elle ne possède pas le domaine cou existant chez toutes les autres myosines, quelque soit leur classe. TgMyoA est localisée dans la périphérie du tachyzoïte, en association avec la membrane. L'utilisation de mutants a permis de préciser que cette localisation était imputable au domaine queue de TgMyoA (Hettmann *et al.*, 2000). De plus, des études sur son orthologue chez *Plasmodium* ont montré qu'elle était localisée au niveau de l'IMC, et non au niveau de la membrane plasmique (Bergman *et al.*, 2003). Malgré ces particularités, TgMyoA conserve les caractéristiques biochimiques des myosines : elle peut lier l'actine de manière dépendante de l'ATP (Herm-Gotz *et al.*, 2002) et il semble qu'il s'agisse d'un moteur rapide et non processif, permettant une avancée de $5,2 \mu m/s$. Son rôle dans le glissement a ensuite été démontré par la construction de « knock-outs » conditionnels sur les tachyzoïtes (Meissner *et*

al., 2002b). Les parasites qui n'expriment plus TgMyoA sont en effet incapables de glisser sur un substrat ou de disséminer vers d'autres cellules une fois que leur cellule hôte est lysée.

3-Contrôle de la dynamique de l'actine parasitaire par les protéines liant l'actine

Alors que le cytosquelette d'actine est un élément crucial dans la mobilité et l'invasion des différents membres du phylum des Apicomplexa, le génome de ces organismes ne présente que peu de protéines potentielles régulant la dynamique de l'actine. En particulier, de nombreuses familles de protéines, considérées comme régulateurs clés de l'actine chez la levure ou les eucaryotes supérieurs, n'ont pas été retrouvées. Ainsi, la gelsoline, le complexe Arp2/3, et la plupart des familles des protéines coiffantes, coupantes et réticulantes sont-ils absents (Schuler et Matuschewski, 2006). Un certain nombre de protéines interagissant avec l'actine a quand même été identifié principalement chez *P. falciparum* et *T. gondii*.

Une ADF a ainsi été caractérisée chez *T. gondii* (Allen *et al.*, 1997). Il a été démontré qu'elle se liait aux monomères et dépolymérisait les filaments d'actine. Des analyses par immunofluorescence et par microscopie électronique ont montré qu'elle était située au niveau de la pellicule, coïncidant avec la localisation de l'actine. En revanche, son homologue chez *P. falciparum*, PfADF1 n'interagit pas avec les polymères d'actine (Schuler *et al.*, 2005a).

D'autre part, un complexe de 32/34 kDa a été copurifié avec une heat shock protein 70 chez *Plasmodium via* une chromatographie d'affinité avec l'actine F (Tardieux *et al.*, 1998a). Ce complexe inhibe l'élongation des filaments d'actine en les coiffant, activité régulée par PIP2.

Un homologue de la coronine a également été identifié chez *Plasmodium* (Tardieux *et al.*, 1998b). La coronine participe, dans d'autres systèmes, à l'organisation du cytosquelette d'actine cortical en activant la polymérisation et la réticulation des filaments.

Enfin, une autre protéine associée à l'actine a été identifiée uniquement chez *T. gondii*. Il s'agit à ce jour de la protéine liant l'actine parasitaire la plus étudiée : la toxofiline.



<u>Figure 16</u> : L'expression de la GFP-toxofiline affecte la dynamique de l'actine dans les cellules de mammifère

(Poupel et al., 2000)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec la GFP ou la GFP-toxofiline et fixées 20 h après transfection avant d'être marquées avec de la phalloïdine-rhodamine.

A) Cellules HeLa exprimant la GFP.

B-D) Cellules HeLa exprimant la GFP-toxofiline.

C. <u>Une protéine liant l'actine spécifique de T. gondii : la toxofiline</u>

1-Identification et propriétés fonctionnelles de la toxofiline

La toxofiline est une protéine de 27 kDa identifiée dans des extraits de tachyzoïtes, par chromatographie d'affinité et gel natif, comme liant de l'actine G de muscle de lapin (Poupel *et al.*, 2000). Elle ne possède pas de séquence consensus pour une liaison à un nucléotide ou à l'actine, et n'a d'homologue dans aucun autre organisme. En revanche elle possède un signal peptide à son extrémité N-terminale. Elle semble de plus être codée par un gène à copie unique chez *T. gondii*.

Le gène de la toxofiline a été cloné et la protéine produite en système bactérien. L'obtention de toxofiline recombinante a permis d'étudier ses propriétés sur la dynamique de l'actine, à la fois par gel natif, par des tests de polymérisation de l'actine marquée au pyrène, et par des tests de cosédimentation d'actine. Le ralentissement de la migration de l'actine en gel natif, en présence de toxofiline, montre que la toxofiline lie directement l'actine monomérique. D'autre part, les tests de polymérisation/dépolymérisation de l'actine pyrène ont mis en évidence que la toxofiline inhibe la polymérisation de l'actine de manière dose-dépendante et limite également la vitesse de dissociation des monomères à partir de filaments pré-existants. Enfin, les tests de cosédimentation montrent que la toxofiline coprécipite avec l'actine F, laissant penser que la toxofiline est également capable de se lier aux filaments (Poupel *et al.*, 2000). Ces résultats démontrent donc que la toxofiline est à la fois une protéine séquestrante et une protéine coiffante. Des études de microscopie électronique ont d'ailleurs permis de préciser que cette coiffe se trouvait au niveau d'une extrémité du filament.

Cet effet de la toxofiline sur les filaments d'actine a été confirmé *in vivo* par expression ectopique de la protéine dans des cellules de mammifère. En effet, des cellules HeLa exprimant la GFP-toxofiline ne présentent plus de fibres de stress contrairement à celles qui n'expriment que la GFP. Elles présentent souvent un marquage d'actine par la phalloïdine sous forme d'agrégats similaire à celui observé pour des cellules traitées à la cytochalasine D (Figure 16).

La liaison de la toxofiline avec l'actine parasitaire a été démontrée par coprécipitation de l'actine et de la toxofiline sur colonne de DNase I. Des anticorps anti-toxofiline ont également été utilisés pour immunoprécipiter la toxofiline endogène, ce qui a permis de récupérer la quasi-totalité de cette protéine ainsi que la très grande majorité de l'actine G



<u>Figure 17</u> : La sérine 53 est importante pour les propriétés de la toxofiline sur le cytosquelette d'actine

(Delorme et al., 2003)

Microscopie à fluorescence sur des cellules CV1 exprimant la GFP seule, la GFP-toxofiline S53A, la GFP-toxofiline sauvage ou la GFP-toxofiline-S53E. L'actine est visualisée par un marquage phalloïdine-Alexa 560.

parasitaire (Delorme *et al.*, 2003). De plus, la toxofiline a également été copurifiée avec une fraction contenant l'actine F parasitaire, confirmant sa double propriété de liaison à l'actine G et l'actine F.

2-<u>Régulation de l'activité de la toxofiline : rôle de la CKII et de la</u> <u>TgPP2C</u>

La régulation de l'activité de la toxofiline a d'abord été étudiée *in vitro*. Une protéine de 35 kDa a été copurifiée avec le complexe toxofiline-actine G (Poupel *et al.*, 2000). Cette protéine a été identifiée comme étant un homologue de sérine-thréonine phosphatase de type 2C. L'activité sélective phosphatase 2C de cette protéine a été confirmée par la déphosphorylation d'un substrat multiphosphorylé (caséine marquée au phosphate radioactif), déphosphorylation indépendante de la présence d'acide okadaïque, mais dépendante du magnésium. L'activité de cette phosphatase (TgPP2C) a été estimée à 0,3% de l'activité sérine-thréonine phosphatase de type 2C totale mesurée dans le cytosol parasitaire (Delorme *et al.*, 2003). Afin de vérifier la pertinence de l'association de la TgPP2C au complexe actine-toxofiline, le statut de phosphorylation de la toxofiline a été examiné.

La toxofiline est phosphorylable à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation d'inhibiteurs de sérine-thréonine kinases a montré qu'une activité de type caséine kinase II (CKII) pouvait transférer un groupement phosphate au niveau de la sérine 53.

Afin de comprendre l'impact de cette phosphorylation sur l'activité de la toxofiline, cette dernière a été exprimée de manière ectopique, sous sa forme sauvage ou mutée au niveau de la sérine 53, dans des cellules de mammifère. Il a alors été observé que les cellules qui expriment la toxofiline avec une alanine à la place de la sérine 53 (empêchant ainsi sa phosphorylation) présentent des quantités significatives de fibres de stress, tandis que celles qui expriment la toxofiline portant un acide aspartique à la place de la sérine 53 (mimant ainsi une phosphorylation « constitutive ») présentent une désorganisation massive du réseau d'actine F. En particulier, on note l'absence de fibres de stress (Figure 17) (Delorme et al., 2003). Afin d'expliquer ces différences de phénotype, des études au Biacore ont été menées. Elles montrent que les paramètres cinétiques de liaison de la toxofiline à l'actine G sont différents selon que la sérine 53 est phosphorylée ou non. Plus précisément, l'actine G se lie à la toxofiline non phosphorylée avec une constante de vitesse d'association trois fois plus élevée et une constante de vitesse de dissociation quatre fois plus faible que celles obtenues avec la toxofiline phosphorylée. En d'autres termes, la toxofiline est 14 fois plus affine pour l'actine G lorsqu'elle est à l'état déphosphorylé (Delorme et al.. 2003).



<u>Figure 18</u> : Localisation de la toxofiline dans le tachyzoïte pendant son mouvement et son entrée dans la cellule hôte

(Poupel et al., 2000).

1-3) Les tachyzoïtes ont été déposés sur des lamelles de verre puis fixés, marqués avec un anti-p30, spécifique d'une protéine de surface, perméabilisés et marqués avec un anti-toxofiline. Le noyau a été marqué au DAPI.

4-5) Les tachyzoïtes ont été incubés 10 min avec des cellules HFF, lavés en PBS, fixés et marqués comme pour 1-3.

D'autre part, l'inhibition de la phosphorylation de la toxofiline par des drogues entraîne une diminution importante du glissement et de l'invasion, sans doute à cause de la séquestration de l'actine monomérique et de l'arrêt de la polymérisation de filaments.

3-La localisation de la toxofiline : une protéine sécrétée ?

Afin de mieux déterminer le rôle de la toxofiline lors du glissement et de l'invasion, elle a été localisée dans le parasite tout d'abord par immunofluorescence (Figure 18). Il a alors été observé qu'elle se trouvait principalement au niveau du pôle apical des tachyzoïtes et exclue du noyau (Poupel *et al.*, 2000). Cependant, sa localisation semble varier considérablement d'une cellule à l'autre chez les parasites extracellulaires. En effet, elle a été observée soit sous forme dense au niveau du cytoplasme apical, soit en « patchs » dans la partie apicale du cytoplasme. Elle est également souvent localisée en « flèche » au niveau du pôle antérieur, ainsi que parfois sous le noyau dans la partie distale du parasite. De manière intéressante, dans des parasites en cours d'entrée dans une cellule hôte, elle est toujours située dans la partie distale de la membrane du parasite (Poupel *et al.*, 2000).

Récemment, une analyse protéomique du contenu des rhoptries a suggéré que la toxofiline faisait partie des protéines des rhoptries (Bradley *et al.*, 2005). Cette localisation dans les rhoptries a été confirmée par immunofluorescence par colocalisation des anticorps anti-toxofiline et anti-ROP2, ainsi que par marquage anti-HA dans des tachyzoïtes exprimant une construction toxofiline-HA. Du fait de cette localisation dans les rhoptries, des organites de sécrétion, il est pertinent d'envisager que la toxofiline puisse être sécrétée dans la cellule hôte au moment de l'invasion. Aucune détection de la toxofiline dans la cellule hôte ou dans la vacuole parasitophore n'a cependant été mise en évidence jusqu'à présent, y compris après utilisation d'une toxofiline fluorescente, peut-être en raison de la très faible quantité qui serait sécrétée.

D. Objectifs et démarche expérimentale

Suite à la mise en évidence du tricomplexe actine-toxofiline-TgPP2C, nous avons cherché à identifier les domaines d'interaction de la toxofiline avec ses deux partenaires. En effet, l'identification des sites impliqués dans ces liaisons, et dans les différentes propriétés de la toxofiline, pourrait permettre de comprendre la singularité de cette protéine liant l'actine, qui n'a pas d'homologue connu à ce jour dans d'autres organismes.

Ne sachant pas qu'elle est l'origine de l'actine ciblée par la toxofiline, parasitaire, hôte, voire les deux, nous avons choisi de réaliser notre étude avec de l'actine de mammifère. En effet, la production d'actine parasitaire recombinante est particulièrement difficile.

Par différentes approches biochimiques, nous avons ainsi identifié les domaines de la toxofiline responsables de son interaction avec l'actine et la TgPP2C. Ce travail a été réalisé alors qu'une collaboration avec une équipe de structuralistes (R. Dominguez, Philadelphie, USA) devrait bientôt conduire à l'élucidation de la structure tridimensionnelle du complexe actine-toxofiline.

II-Matériel et méthodes

A. Préparation des protéines recombinantes

1-Clonage des différents fragments de la toxofiline

La toxofiline entière a été clonée dans le vecteur pGex6-p3 (Poupel et al., 2000).

Les différents fragments de la toxofiline : CC1, CC1A, CC1Aa, CC1Ab, CC1B, CC1BCC2, NoCC et CC2 ont été clonés de la manière suivante.

La séquence du fragment CC1 a été amplifiée par PCR avec comme amorce amont, l'amorce 5'-GGCCGGATCCCAACAGGAACTAGGGCTGCTC-3' qui contient un site (souligné) l'amorce 5'-BamH1 et comme amorce aval GGCCGTCGACCCTCTGCTCGTTGAGGATTTG-3' qui contient un site SalI (souligné). La même amorce amont a été utilisée pour cloner CC1A tandis que l'amorce aval était 5'-GGCCGTCGACCTCAGTTGCGAAAGATCCCTC-3' (site Sall souligné). En ce qui concerne CC1B; l'amorce amont était 5'-GGCCGGATCCCCGGAAACGAAGGCTTTGC-3' (site BamHI souligné) tandis que l'amorce aval était la même que celle utilisée pour CC1. Pour CC1Aa, l'amorce amont était la même que celle de CC1 et l'amorce aval était 5'-GGCCGTCGACCGTGGCTCTGAGAATTTCGTC-3' (site Sall souligné). Pour CC1Ab, l'amorce amont était 5'-GGCCGGATCCCAAAATTTGGACCTCAGGAAGTAC-3' (site BamHI souligné) tandis que l'amorce aval était la même que celle de CC1A. En ce qui concerne CC1BCC2, l'amorce amont était la même que celle de CC1B et l'amorce aval la même que celle de la toxofiline. Pour NoCC, l'amorce amont était la même que celle de la toxofiline, tandis que l'amorce aval était 5'-GGCCGTCGACGCGTGCTGCGACGGAGGG-3' (site SalI souligné). Enfin pour CC2, l'amorce amont était 5'-GGCC<u>GGATCC</u>GATGCGAGTGGAGCATTAC-3' (site BamHI souligné) alors que l'amorce aval était la même que celle utilisée pour la toxofiline.

Tous ces produits de PCR, ainsi que le vecteur pGex6-p3, ont ensuite été digérés successivement par BamHI et SalI (Biolabs). Les inserts ont ensuite été ligués, avec la ligase T4 (Biolabs), dans le vecteur digéré et les produits de ligation électroporés dans des souches d'*Escherichia coli* XL1 Blue. Les clones obtenus, vérifiés par PCR sur colonie puis par séquençage, ont ensuite été transférés en souche d'*E. coli* BL21 en vue de l'expression des protéines recombinantes.

2-Purification des protéines recombinantes

L'expression des protéines recombinantes en fusion avec la GST a été induite, à partir de 500 ml de culture, avec soit 0,2 mM IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) pendant 2 h à 37°C (CC1, CC1A, CC1Aa, CC1Ab, CC1B et CC1BCC2) soit 0,1 mM IPTG pendant 1 h à 30°C (NoCC, CC2 et toxofiline). Les protéines recombinantes ont ensuite été purifiées à partir de bactéries lysées dans 5 ml de PBS supplémenté en 0,5% (v/v) Triton X-100 (TX-100) avec (NoCC, CC2 et toxofiline) ou sans (CC1, CC1A, CC1Aa, CC1Ab, CC1B et CC1BCC2) 0,5% (v/v) SB3-14 (myristyl sulfobetaine). Après centrifugation à 20 000 g pendant 20 min à 4°C, les surnageants ont été incubés avec de la Glutathion-Sépharose (GE Healthcare) pendant 3 h à 4°C. Les polypeptides taggués recombinants ont été élués dans 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM Glutathion réduite ou, selon les cas, les tags ont été clivés avec de la Prescission protéase (GE Healthcare) pendant 4 h à 4°C.

L'expression de la HPTR-TgPP2C (rPP2C) a été induite, à partir de 250 ml de culture, avec 0,1 mM IPTG pendant 2 h à 37°C. La protéine recombinante a été purifiée à partir de bactéries lysées dans 10 ml de tampon de lyse Probond [20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,8, 500 mM NaCl]. Après centrifugation à 20 000 g pendant 20 min à 4°C, le surnageant a été incubé avec de la résine Ni-NTA (QIAGen) pendant la nuit à 4°C. La protéine a ensuite été éluée en 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6, 500 mM NaCl, 200 mM imidazole.

Après purification les protéines recombinantes ont été dialysées contre le tampon nécessaire pour le test de liaison réalisé ensuite. Elles ont été dosées et supplémentées en inhibiteurs de protéases et gardées sur glace jusqu'à utilisation.

B. Gels natifs

L'électrophorèse en gel natif a été réalisée avec un gel à 7,5% d'acrylamide. De l'actine G, préparée à partir d'actine F marquée avec du N-(iodoacétyl)-N'-1-sulfo-5naphtylethylamine (1-5 IAEDANS, 500 μ M, Molecular Probes), a été utilisée. 50 μ g d'actine G marquée IAEDANS a été incubée avec ou sans équimolarité de GST-toxofiline, GST-CC1, GST-NoCC ou GST-CC2 recombinantes, pendant 1 h à température ambiante, avant électrophorèse. De l'actine F a été utilisée en contrôle. Les bandes fluorescentes ont été visualisées sous lampe UV (λ = 321 nm).

C. <u>Tests de liaison à l'actine</u>

1-<u>Tests de liaison à l'actine G</u>

De l'actine de muscle de lapin a été purifiée à partir de poudre acétonique (Sigma) selon le protocole de Pardee et Spudich (Pardee et Spudich, 1982). La poudre a été remise en suspension en tampon A (2 mM Tris-HCl pH 8, 0,2 mM Na₂ATP, 0,1 mM CaCl₂, 0,5 mM β -mercaptoéthanol, 0,005% NaN₃). Le mélange a ensuite été centrifugé à 100 000 g pendant 3 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot a été lavé en tampon A et remis en suspension dans le même tampon. L'actine ainsi extraite a été dialysée pendant 3 jours contre du tampon A en changeant le tampon tous les jours. La solution d'actine G a ensuite été clarifiée par centrifugation à 100 000 g pendant 1 h. Le surnageant contenant l'actine G a été conservé dans la glace. L'actine G a été diluée pour être à une concentration de 55 μ M dans du tampon A.

 $4,2 \ \mu g \ (2 \ \mu M)$ d'actine G purifiée a été incubée pendant la nuit à 4°C avec 4 μ M de protéines tagguées GST préparées dans 50 μ l de tampon B (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂). 30 μ l de résine à 50% (v/v) de Glutathion-Sépharose lavée en tampon B ont été ajoutés au mélange supplémenté en 1 mM DTT, 0,05% (v/v) Tween 20 et incubés pendant 3 h à 4°C. La fraction non liée a été récupérée par centrifugation tandis que la résine a été lavée en tampon B supplémenté en 0,05% Tween 20.

Les échantillons correspondants aux fractions non liées et aux éluats SDS ont ensuite été analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Dans certains cas, un Western Blot a été réalisé. Les protéines ont alors été transférées sur membrane de nitrocellulose (GE Healthcare). La membrane a été bloquée et l'actine détectée en utilisant des anticorps anti-C4 actine (Chemicon; 1/1000, 2 h, température ambiante) suivis d'anticorps secondaires anti-souris couplés HRP (Jackson, 1/10000, 2 h, température ambiante). La membrane a été révélée avec le substrat SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce).

2-Tests de compétition pour la liaison à l'actine G

 $4,2 \ \mu g \ (2 \ \mu M)$ d'actine purifiée ont été incubés ou non avec 14,5 $\mu g \ (20 \ \mu M)$ de CC1, 9 $\mu g \ (20 \ \mu M)$ de CC1A, 5,6 $\mu g \ (20 \ \mu M)$ de CC1Aa, 3,3 $\mu g \ (20 \ \mu M)$ de CC1Ab clarifiés ou un mélange de CC1Aa et CC1Ab dans 50 μ l de tampon B pendant 1 h à 4°C. Les mélanges CC1actine et CC1A-actine ont été ajoutés à 10,8 $\mu g \ (4 \ \mu M)$ de GST-toxofiline, tandis que les mélanges CC1Aa-actine et CC1Ab-actine ont été également ajoutés à 8,2 μ g (4 μ M) de GST-CC1. Toutes les réactions ont été incubées pendant la nuit à 4°C.

Les échantillons ont ensuite été traités comme décrit pour les tests de liaison à l'actine G. Les éluats et les fractions non liées ont été analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Des contrôles ont été réalisés en incubant CC1 et CC1A avec de la Glutathion-Sépharose sous les mêmes conditions expérimentales.

D. <u>Cinétique de polymérisation de filaments d'actine pyrène</u>

Trois tests de polymérisation d'actine pyrène indépendants ont été réalisés. Ces tests consistent à mélanger de l'actine G avec une petite quantité d'actine marquée au pyrène et de suivre la polymérisation avec un fluorimètre. La fluorescence est en effet augmentée jusqu'à 20 fois par l'association de monomères d'actine pyrène sous forme de polymères. 2 μ M d'actine G marquée à 20% au pyrène ont été utilisés pour chaque expérience. La polymérisation a été réalisée à température ambiante en tampon C (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 5 mM Tris-HCl pH 8) et visualisée en spectrofluorométrie ($\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 390$ nm). Les valeurs de l'état d'équilibre ont été obtenues après 16 h d'incubation.

Pour les tests de polymérisation supplémentaires, 12,6 μ g (10 μ M) d'actine G purifiée ont été incubés avec 12,3 μ g (10 μ M) de GST-CC1, 10,3 μ g (10 μ M) de GST-NoCC, 10,8 μ g (10 μ M) de GST-CC1A, 9,8 μ g (10 μ M) de GST-CC1Aa ou 9,1 μ g (10 μ M) de GST-CC1Ab clarifiés, ou bien avec les domaines de la toxofiline privés de leur tag GST, dans 30 μ l de tampon A. Puis, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ et 1 mM Na₂ATP ont été ajoutés pour induire la polymérisation de l'actine toute la nuit à 4°C. Les populations de monomères et de polymères ont été séparées par ultracentrifugation à 100 000 g pendant 30 min à 4°C puis analysées par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

Dans certains essais, 12,6 μ g (10 μ M) d'actine G ont été incubés avec un mélange de 4,4 μ g (10 μ M) de CC1 et 14,7 μ g (10 μ M) de rPP2C, avant que la polymérisation ne soit induite.

Enfin, pour étudier l'effet potentiel de NoCC sur l'actine en conditions G, des essais similaires ont été réalisés sans ajouter les conditions de polymérisation.

E. <u>Tests de liaison à la TgPP2C</u>

1-<u>Tests de liaison à la TgPP2C</u>

 $3,9 \ \mu g \ (2 \ \mu M) \ de \ rPP2C \ ont \ été \ immobilisés \ sur 10 \ \mu l \ de \ résine \ de \ 50\% \ (v/v) \ Ni-NTA –agarose (QIAGen) prélavée en tampon D (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,01% (v/v) TX-100) pendant 2 h à 4°C. La rPP2C liée a ensuite été incubée avec les différents domaines de la toxofiline pendant 1 h à 4°C. Les complexes potentiels ont été isolés par centrifugation.$

Les fractions non liées ont été récupérées et la résine lavée avec dix volumes de tampon E (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,01% (v/v) TX-100). Les éluats SDS et les fractions non liées ont ensuite été analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

2-Tests de liaison du complexe actine-CC1-TgPP2C

 $3,9 \ \mu g \ (2 \ \mu M)$ de rPP2C liés à de l'agarose couplé au nickel, ont été incubés soit, directement avec le complexe CC1-actine préformé dans du tampon A (1 h à 4°C) soit, séquentiellement avec 2,3 $\mu g \ (4 \ \mu M)$ de CC1 en tampon B (1 h à 4°C) puis avec 3,4 $\mu g \ (2 \ \mu M)$ d'actine G clarifiée en tampon B (1 h à 4°C). Après les incubations, la résine a été lavée en tampon D et traitée comme décrit pour les tests de liaison à la TgPP2C.

F. <u>Peptide-spot mapping</u>

Nous avons obtenu par collaboration (F. Roncal, Madrid, Espagne) des membranes sur lesquelles des séries de peptides de douze acides aminés de longueur, représentant la toxofiline ou CC1A et qui sont décalés de deux acides aminés les uns par rapport aux autres, ont été fixés.

Avant utilisation, les membranes ont été mouillées dans de l'eau puis du TBS supplémenté en 0,1% (v/v) Tween 20 (TBST) et saturées dans du TBST contenant 3% (m/v) de lait écrémé et 3% (m/v) de sérum albumine bovine (BSA) pendant 2 h à température ambiante.

Pour détecter les séquences responsables de l'interaction toxofiline ou CC1A – actine G, les membranes ont ensuite été incubées toute la nuit à 4°C avec 1 μ g/ml d'actine G biotinylée, dans du tampon A supplémenté avec 1% (m/v) de lait écrémé. Après trois lavages en TBST, les membranes ont été incubées avec de la streptavidine-HRP diluée au 1:2000 (Upstate) pendant 2 h à température ambiante.

Pour détecter les séquences responsables de l'interaction toxofiline-TgPP2C, les membranes de toxofiline ont été incubées toute la nuit à 4°C avec 4 μ g/ml de rPP2C dans du TBST supplémenté avec 1% (m/v) de lait écrémé. Les membranes ont été lavées en TBST, incubées tout d'abord avec des anticorps polyclonaux anti-TgPP2C purifiés par affinité, à une dilution de 1:4000 pendant 2 h à température ambiante, puis avec des anticorps anti-lapin-HRP (Jackson) utilisés à une dilution de 1:10000 pendant 2 h à température ambiante. Après 10 lavages en TBST et TBST 0,2% Tween 20, les spots positifs ont été détectés avec le substrat SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce).



<u>Figure 19</u> : Représentation schématique de la toxofiline totale et des domaines de la toxofiline utilisés dans cette étude

Les acides animés sont numérotés en haut des schémas. Les tirets représentent les deux domaines en super-hélice.



Figure 20 : La toxofiline capture l'actine via son domaine CC1

Un gel natif de 7,5% d'acrylamide a été réalisé en utilisant 50 μ g d'actine G marquée IAEDANS incubée sans (colonne a) ou avec des quantités équimolaires de GST-toxofiline (colonne b), GST-CC1 (colonne c), GST-NoCC (colonne d) ou GST-CC2 (colonne e) recombinants. De l'actine F a été déposée en contrôle (colonne f).

III-<u>Résultats</u>

A. Identification des sites de liaison entre la toxofiline et l'actine

Pour étudier les relations structure-fonction de la toxofiline, nous avons réalisé une série de tests avec de l'actine de mammifère purifiée. L'analyse de la séquence de la toxofiline suggère que la protéine est globulaire avec deux régions en super hélice (contenues dans les domaines CC1 et CC2 respectivement). Elle porterait également une séquence de peptide signal à son extrémité N-terminale. Pour identifier les domaines de la toxofiline impliqués dans la liaison à l'actine, nous avons tout d'abord produit plusieurs polypeptides comprenant ou non les régions en super hélice (Figure 19) et nous avons testé leurs propriétés de liaison à l'actine G.

1-La toxofiline se lie à et séquestre l'actine G via son domaine CC1A

Nous avons testé les capacités de liaison des différents polypeptides de la toxofiline à l'actine G par des tests de « pull-down » et d'électrophorèse en gel natif. Etant donné que la toxofiline a été isolée par test sur gel natif avec de l'actine marquée IAEDANS (Poupel *et al.*, 2000), nous avons utilisé les mêmes conditions expérimentales pour définir les régions de la toxofiline qui lient l'actine G.

Lorsque l'actine G marquée fluorescente est incubée avec la toxofiline recombinante totale ou avec les différents polypeptides de la toxofiline, CC1 (14,6 kDa), CC2 (5,5 kDa) et NoCC (7,5 kDa), puis soumise à électrophorèse sur gel natif, seuls la toxofiline et CC1 induisent un ralentissement visible de la migration de l'actine dans le gel (Figure 20). NoCC et CC2 ne modifient pas la migration de l'actine. Il est cependant à noter que l'addition de NoCC à l'actine G empêche une partie du pool d'actine monomérique de rentrer dans le gel, situation semblable à ce qui est observé quand l'actine F est déposée dans le gel. Ceci semble suggérer que NoCC pourrait lier l'actine G et promouvoir son oligomérisation ou sa nucléation.

En résumé, ces résultats indiquent que le site de liaison à l'actine G est situé dans le polypeptide CC1 et est suffisant pour capturer l'actine.

Afin d'identifier plus précisément le domaine minimal de liaison à l'actine G, le domaine CC1 de 14,5 kDa a été coupé en deux polypeptides : CC1A de 8,9 kDa et CC1B de



Figure 21 : La toxofiline lie et séquestre l'actine G via son domaine CC1A

- A) Des tests de liaison à l'actine G ont été réalisés sur de la GST-toxofiline (GST-Tf, colonnes ac), GST-CC1 (colonnes d-f), GST-CC1A (colonnes g-i), GST-CC1B (colonnes j-l), GST-CC2 (colonnes m-o) ou GST seule (colonnes p-r) immobilisés. Après incubation pendant la nuit, la résine a été lavée et les protéines ont été éluées en tampon d'échantillon SDS avant SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. C indique la charge totale, N indique la fraction totale non liée et L indique la fraction totale liée. La flèche indique la position de l'actine G.
- B) Les tests de compétition ont été réalisés sur (a) de la GST-toxofiline immobilisée (GST-Tf) en utilisant de l'actine G préincubée sans (colonne b) ou avec CC1 (colonne c) ou CC1A (colonne d). (b) Des tests ont aussi été réalisés sur GST-CC1 immobilisé en utilisant de l'actine G préincubée ou non avec CC1A (colonnes b-c). Les échantillons ont été traités comme en A). C indique la charge totale et L indique la fraction totale liée. La présence du fragment compétitif est indiquée au dessus de la photographie du gel.
- C) Cinétiques de polymérisation de l'actine pyrène en présence de différents fragments de la toxofiline. (a) Les tests de polymérisation d'actine pyrène ont été réalisés en présence ou absence de 500 nM GST-CC1 (□) et GST-CC1A (×) ou (b) en présence ou absence de 500 nM GST-CC1 (□) et GST-CC2 (Δ). Les nombres à la droite des courbes représentent les valeurs à l'état d'équilibre. * La différence avec la valeur contrôle (○) est statistiquement significative à P = 0,05 (test de Student). NS : non significatif. u. a., unités arbitraires.

5,5 kDa (Figure 19). Nous avons ensuite réalisé une chromatographie sur Glutathion-Sépharose avec les polypeptides taggués GST pré-incubés avec l'actine G. Dans ce cas, seuls la GST-toxofiline, GST-CC1 et GST-CC1A sont capables de capturer l'actine G. GST-CC1B, GST-CC2 et GST (en contrôle) ne la retiennent pas (Figure 21A).

Afin de confirmer que le polypeptide CC1A de 8,9 kDa peut à lui seul lier l'actine G, nous avons testé sa capacité à entrer en compétition avec soit la toxofiline totale, soit CC1, pour la liaison à l'actine G. On peut alors observer une inhibition totale de la liaison à l'actine G par la GST-toxofiline en présence de CC1 ou CC1A, 5 fois en excès molaire (Figure 21Ba). De même, la liaison de l'actine G par GST-CC1 est complètement bloquée par la présence de CC1A, 5 fois en excès molaire (Figure 21Bb). Nous avons vérifié en contrôle que l'actine, CC1 et CC1A ne se liaient pas à la résine de Glutathion-Sépharose dans nos conditions expérimentales. Ces données montrent que CC1A se comporte comme un inhibiteur de la liaison toxofiline - actine G, ce qui suggère que le site de liaison à l'actine G est situé au sein du domaine CC1A.

Nous avons ensuite cherché à savoir si la capacité de CC1A à se lier à l'actine G était associée à une activité séquestrante déjà décrite pour la toxofiline entière. Nous avons réalisé pour ce faire une analyse de la cinétique de polymérisation des filaments d'actine à partir de monomères marqués au pyrène. Ces tests démontrent que CC1 et CC1A sont tous les deux suffisants pour observer un effet séquestrant sur l'actine G (Figure 21Ca). Cependant, les valeurs des états d'équilibre obtenus avec les deux polypeptides sont significativement différentes, d'après le test de Student (22,7 u.a. pour CC1 et 62,8 u.a. pour CC1A, valeurs représentatives de triplicata de trois expériences différentes). L'activité de séquestration observée avec CC1A est donc plus faible que celle observée avec CC1, ce qui témoigne d'une affinité plus faible de CC1A pour l'actine G. En contrôle, nous avons vérifié que la présence de GST-CC2 ne modifiait pas la cinétique de polymérisation de l'actine (Figure 21Cb), ce qui est en accord avec les résultats obtenus en tests de « pull-down ».

2-Trois séquences peptidiques linéaires au sein de CC1A se lient à l'actine G

Afin d'identifier les acides aminés importants, contenus dans CC1A, qui pourraient expliquer la liaison à l'actine G, nous avons réalisé un test de « peptide spot mapping ». Pour



Figure 22 : La toxofiline séquestre l'actine G via CC1A qui contient trois sites de liaison

- A) La séquence entière, en acides aminés, de CC1A est représentée sur une membrane de nitrocellulose par des spots successifs de dodécapeptides décalés de 2 acides aminés chacun. La membrane a été incubée avec de l'actine G biotinylée et de la spreptavidine conjuguée à HRP.
- **B)** Les séquences correspondant aux spots positifs sont représentées et encadrées. Le premier acide aminé de chaque ligne est numéroté sur la gauche.
- C) Des tests de compétition ont été réalisés sur GST-CC1 immobilisé en utilisant de l'actine G préincubée avec CC1A (colonnes a-c), CC1Aa (colonne d), CC1Ab (colonne e) ou un mélange des deux (colonne f).

Les échantillons ont été traités comme décrit dans la figure 21A. C indique la charge totale et L indique la fraction totale liée. La présence du fragment compétitif est indiquée au dessus de la photographie du gel. Les fléches sur la gauche indiquent la position de l'actine G et de GST-CC1 sur le gel.

D) Des tests de polymérisation de l'actine ont été réalisés en ajoutant 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ et 1 mM Na₂ATP à l'actine G pendant la nuit à 4°C. Après centrifugation, les surnageants (S) et les culots (C) ont été soumis à SDS-PAGE suivi de coloration au bleu de Coomassie. L'actine seule polymérise efficacement (colonnes a-b) tandis que l'actine G préincubée avec GST-CC1 (colonnes c-d) et GST-CC1A (colonnes e-f) ne le fait pas. Au contraire, GST-CC1Aa (colonnes g-h) et GST-CC1Ab (colonnes i-j) ne parviennent pas à empêcher la

polymérisation.

cela, nous avons utilisé des dodécapeptides chevauchants fixés sur une membrane de cellulose. La totalité de la séquence de CC1A a été ainsi représentée, chaque peptide ne différant du suivant que par un décalage de deux acides aminés.

Quand la membrane est incubée avec de l'actine G biotinylée, comme décrit dans le matériel et méthodes, trois séries de spots sont détectées de manière reproductible (trois expériences indépendantes). Ainsi les spots numérotés de 6 à 8, et partageant la séquence 'AGQAKAAA', lient l'actine G dans nos conditions expérimentales. Les spots 21 à 23, partageant la séquence 'DEILRATQ', et les spots 25 à 27, qui ont en commun la séquence 'NLDLRKYE', réagissent très fortement avec l'actine G (Figure 22A-B).

En criblant la base de données protéiques Swissprot Uniprot (contenant 216 380 séquences en mai 2006) avec les logiciels « pattern » (Cockwell et Giles, 1989) et « pattinprot » (Combet *et al.*, 2000), nous avons identifié un certain nombre de protéines interagissant potentiellement avec l'actine, ou connues pour interagir avec elle, et qui présentent une forte similarité (plus de 70%) avec les motifs 'AGQA[K/R]AAA' et 'DEIL[R/K]A[T/S]Q' dégénérés (Tableau 1). Par exemple, l'angiomotine, plusieurs myosines de mammifère et les talines ont été détectées lors du crible avec le motif 'AGQAKAAA'. D'autre part, plusieurs scindérines de mammifère et des ADF de mammifère, qui sont toutes connues pour lier l'actine G, ont été identifiées avec la séquence 'DEILRATQ'. La chaîne lourde de la myosine de type II, la myosine Vc, la troponine de muscle squelettique, la spinophiline neurale (neurabine II) et la nesprine (protéine d'ancrage nucléaire) ont également été identifiées avec ce motif. En revanche, la troisième séquence, obtenue dans CC1A comme liant l'actine G, n'a permis d'identifier dans les bases de données qu'une protéine connue liant l'actine. Ceci suggère que la séquence 'NLDL[R/K][R/K]YE' est un motif de liaison à l'actine plus particulièrement spécifique de la toxofiline. La protéine identifiée est MACF1, la protéine de réticulation microtubule-actine. MACF1 appartient à la famille spectraplakine des protéines réticulantes du cytosquelette (Kodama et al., 2003).

Sur la base de ces résultats, nous avons réalisé des tests de compétition pour la liaison à l'actine G. Nous avons utilisé deux polypeptides issus de CC1A : CC1Aa ($_{69}Q-T_{119}$) et CC1Ab ($_{120}Q-S_{149}$), en compétition avec GST-CC1. Comme indiqué plus haut, l'addition de CC1A entre en compétition de manière efficace avec GST-CC1 pour lier l'actine G. En revanche, ce n'est pas le cas quand CC1Aa ou CC1Ab sont ajoutés (Figure 22C). De même, un mélange de CC1Aa et CC1Ab ne peut pas non plus restaurer l'effet compétiteur de CC1A. Ceci suggère que les affinités pour l'actine G de ces deux polypeptides indépendants sont plus faibles que celle de CC1A et que l'intégrité de la séquence est nécessaire pour la liaison à

Α

Numéro d'accession	Nom de la protéine	Séqu	ence						
		Α	G	Q	Α	K/R	Α	Α	Α
CAB72264	Toxofiline	Α	G	Q	Α	K	Α	Α	Α
Q4VCS5	Angiomotine	Α	G	Q	i	р	Α	Α	Α
Q21624	Coronine-like	Α	G	Q	r	R	Α	Α	Α
Q9QY06	Myosine-9B	Α	e	Q	Α	R	e	Α	Α
P05659	Myosine-2 chaîne lourde	Α	q	e	Α	R	Α	Α	Α
O96064	Paramyosine	Α	G	1	A	K	Α	k	A
P54939	Taline-1 de poulet	Α	q	Q	Α	K	р	Α	Α
P26039	Taline-1 murine	Α	S	Q	Α	K	р	Α	Α
Q9Y4G6	Taline-2 humaine	Α	k	Q	Α	а	Α	Α	Α
Q7ILX4	Taline-2 murine	Α	k	Q	Α	а	Α	Α	Α

В

Numéro d'accession	Nom de la protéine	Séqu	ence						
		D	E	Ι	L	R/K	Α	T/S	Q
CAB72264	Toxofiline	D	Ε	Ι	L	R	Α	Т	Q
Q28046	Adseverine bovine	у	Ε	r	L	K	Α	S	Q
Q60604	Adseverine murine	у	E	r	L	K	Α	S	Q
Q29297	Adseverine porcine	у	Ε	r	L	K	Α	S	Q
Q28372	ADF équine	f	Ε	r	L	K	Α	Τ	Q
P06396	ADF humaine	у	Ε	r	L	K	Α	Τ	Q
P13020	ADF murine	f	Ε	f	L	K	Α	Τ	Q
P20305	ADF porcine	у	Ε	r	L	K	Α	Τ	Q
Q96SB3	Neurabine II humaine	D	Ε	h	L	R	e	Τ	Q
Q6R891	Neurabine II murine	D	Ε	h	L	R	e	Τ	Q
O35274	Neurabine II de rat	D	Ε	h	L	R	e	Т	Q
Q8WXH0	Nesprine 2	D	Ε	d	L	S	Α	Т	Q
P02588	Troponine de poulet	g	Ε	Ι	L	R	Α	Т	g
P10246	Troponine de dinde	g	Ε	Ι	L	R	Α	Т	g
Q9NQX4	Myosine 5C	V	E	Ι	L	R	Α	S	k

<u>Tableau 1</u>: Analyse du criblage avec le logiciel "pattinprot" de la base de données UniProt/SwissProt avec deux motifs de CC1A liant l'actine

- A) 'AGQA[K/R]AAA'B) 'DEIL[R/K]A[T/S]Q'



Figure 23 : NoCC se lie à l'actine G mais n'affecte ni la vitesse ni la quantité de polymérisation

- A) Des tests de liaison à l'actine ont été réalisés en utilisant de la GST immobilisée (colonnes ab) ou GST-NoCC immobilisé (colonnes c-d). Les échantillons ont été analysés par Western Blot en utilisant des anticorps anti-actine (clone C4).
- B) Des cinétiques de polymérisation de l'actine ont réalisées en présence ou absence de 500 nM GST-NoCC (◊) ou 500 nM GST-CC1 (□) en utilisant de l'actine pyrène. Les nombres à droite des courbes représentent les valeurs à l'état d'équilibre de l'actine, obtenues 16 h après l'essai.
 *Les différences avec les valeurs contrôles (○) sont statistiquement significatives à P = 0,05 (test de Student). NS, non significatif. u. a., unités arbitraires.
- C) Les tests de polymérisation de l'actine ont été réalisés comme décrit dans la figure 21C. L'actine seule a été incubée sous conditions polymérisantes (colonnes a-b) ou avec GST-NoCC dans les mêmes conditions (colonnes c-d). Les surnageants (S) et les culots (C) ont été soumis à SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Les positions de l'actine et de GST-NoCC sont indiquées par des flèches sur la gauche.
- D) Des tests de nucléation de l'actine ont été réalisés en présence ou absence de 20 nM (◊) ou 100 nM (+) GST-NoCC en utilisant de l'actine pyrène. Comme contrôle positif, la villine a été utilisée à 20 nM (Δ). u. a., unités arbitraires.

l'actine G. Nous avons également cherché à savoir, par des tests de précipitation d'actine polymérisée, si CC1Aa et CC1Ab pouvaient empêcher l'actine de polymériser. Il semble, dans nos conditions expérimentales, que l'intégrité de CC1A soit également nécessaire pour conserver la propriété séquestrante de la toxofiline (Figure 22D).

3-<u>NoCC se lie à l'actine G sans induire de séquestration ou de</u> nucléation

Comme précisé plus haut, le test de gel natif suggère que l'incubation de NoCC avec l'actine G a transformé, au moins partiellement, les monomères d'actine en oligomères trop gros pour pénétrer dans le gel. De plus, un test de « peptide spot mapping » a montré que NoCC pouvait lier l'actine G.

Nous avons donc cherché à savoir si NoCC capture l'actine G dans des tests de « pull down ». Nous avons réalisé six expériences indépendantes, et il apparaît par Western Blot, que dans nos conditions expérimentales, GST-NoCC est capable de capturer une petite quantité d'actine G, ceci de manière reproductible alors que la GST et GST-CC2 n'en sont pas capables (Figure 23A).

De plus, nous avons mis en évidence que GST-NoCC n'affectait pas de manière significative la cinétique de polymérisation de l'actine quand du sel, du magnésium et de l'ATP étaient ajoutés dans un test d'actine pyrène, ce qui est en accord avec les données du gel natif (Figure 23B). Ce résultat indique donc que, dans des conditions expérimentales identiques, GST-NoCC n'a pas l'activité séquestrante que possède CC1. En effet, comme attendu, les valeurs d'équilibre obtenues avec CC1 sont statistiquement différentes de celles obtenues avec NoCC et en contrôle. Cependant, nous avons remarqué à chaque fois que les valeurs à l'état d'équilibre de l'intensité de fluorescence associée à la quantité d'actine F étaient légèrement plus faibles quand GST-NoCC était ajouté. Les échantillons ont été ultracentrifugés et analysés par SDS-PAGE, mais nous n'avons pas détecté de différences significatives dans les quantités d'actine F en absence ou présence de GST-NoCC (Figure 23C).

Comme GST-NoCC capture faiblement l'actine G, nous nous sommes intéressés à une éventuelle nucléation de l'actine induite par NoCC, ceci par des tests d'actine pyrène. Alors que la villine, qui est connue pour lier l'actine et induire sa polymérisation, montre une activité de nucléation à une concentration de 20 nM dans nos conditions expérimentales, GST-NoCC ne présente pas une telle activité que ce soit à 20 ou 100 nM (Figure 23D).



Figure 24 : Le complexe CC1 - actine G se lie à la TgPP2C par CC1B mais pas CC1A

A) Le complexe CC1 – actine G se lie à la TgPP2C.
 rPP2C immobilisée sur Ni-NTA a été incubée soit avec le complexe CC1-actine G préformé (colonnes a-b) soit séquentiellement avec CC1 puis l'actine G (colonnes c-d) soit avec l'actine G seule (colonnes e-f) pendant 1 h à 4°C. Après de nombreux lavages, les protéines liées à la résine Ni-NTA ont été éluées en tampon d'échantillon SDS et soumises à SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.
 N indique la fraction totale non liée et L indique la fraction totale liée. Les fléches sur la

N indique la fraction totale non liée et L indique la fraction totale liée. Les fléches sur la gauche indiquent les positions de l'actine G, CC1 et rPP2C.

B) CC1 se lie à la TgPP2C via CC1B mais pas CC1A rPP2C immobilisée a été incubée avec la toxofiline (Tf, colonnes a-b), CC1 (colonnes c-d), CC1A (colonnes e-f), CC1B (colonnes g-h), CC1BCC2 (colonnes i-j) ou CC2 (colonnes k-l). Les échantillons ont été traités comme décrit dans la figure 21A. La flèche sur la gauche indique la position de rPP2C.
Enfin, nous avons regardé si la sérine 53, qui se trouve dans le domaine NoCC et qui est responsable de la régulation par phosphorylation de l'affinité de la toxofiline pour l'actine G, pouvait avoir un effet sur la nucléation de l'actine. Nous n'avons pas observé d'effet significatif.

B. <u>Identification des sites de liaison entre la toxofiline et la TgPP2C</u>

Il a été démontré que la TgPP2C se liait au complexe actine-toxofiline (Delorme *et al.*, 2003). Afin de définir les domaines responsables de cette interaction entre les trois partenaires, nous avons réalisé des tests de « pull-down » avec de la PP2C parasitaire recombinante purifiée (rPP2C).

1-Le complexe CC1-actine G se lie à la TgPP2C via CC1B mais pas CC1A

La rPP2C a été pré-immobilisée sur de la résine d'agarose couplée au nickel, ceci *via* son tag histidine, puis incubée avec ou sans les polypeptides de la toxofiline et l'actine G. Nous avons tout d'abord testé si le domaine CC1 était suffisant pour lier à la fois l'actine G et la rPP2C. Nous avons reconstitué *in vitro* le complexe tripartite en utilisant le domaine CC1 (Figure 24A). Ceci a été réalisé en incubant la rPP2C avec le complexe pré-formé CC1-actine G (CC1/actine G), ou en effectuant une incubation séquentielle de la rPP2C avec CC1 puis avec l'actine G (CC1+actine G) à partir du moment où du magnésium était ajouté au mélange dans le dernier cas. Etant donné que l'actine G n'est pas capable de se lier directement à la rPP2C dans nos conditions expérimentales, ces résultats indiquent que le domaine CC1 de la toxofiline contient les sites de liaison distincts de la TgPP2C et de l'actine. Il est de plus à noter que la présence de rPP2C n'affecte pas l'effet séquestrant de CC1 dans les tests de polymérisation de l'actine que nous avons réalisés.

Afin de définir plus précisément le site d'interaction entre la toxofiline et la TgPP2C, nous avons incubé la rPP2C avec la toxofiline entière ou ses différents polypeptides. Comme attendu, la toxofiline entière et CC1 sont capturés par la rPP2C immobilisée. En revanche, seuls les polypeptides qui contiennent le domaine CC1B, à savoir CC1B et CC1BCC2, interagissent avec la rPP2C (Figure 24B). En effet, CC1A et CC2, qui ne portent pas la séquence de CC1B, ne se lient pas à la rPP2C. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant la PP2C recombinante purifiée de Xénope, en fusion avec un tag histidine.



Figure 25 : Deux séquences dans la toxofiline se lient à la TgPP2C

- A) La séquence protéique entière de la toxofiline est représentée sur une membrane de nitrocellulose par des spots de dodécapeptides décalés de deux acides aminés chacun. La région CC1B est représentée en pointillés. La membrane a été successivement incubée avec la rPP2C, dans anticorps polyclonaux anti-TgPP2C et des anticorps anti-lapin couplés à HRP.
- **B)** Les séquences correspondant aux spots positifs sont représentées et encadrées. Le premier acide aminé de chaque ligne est numéroté sur la gauche. Dans la première série positive de 28 acides aminés, la sérine 53 connue pour être substrat de la TgPP2C est en gras et soulignée.

2-La toxofiline présente deux sites de liaison potentiels à la TgPP2C, respectivement au sein de CC1B et de NoCC

Afin d'identifier les acides aminés de la toxofiline responsables de la liaison à la TgPP2C, nous avons réalisé un « peptide spot mapping » sur une membrane de nitrocellulose où étaient fixés des dodécapeptides synthétiques chevauchants, décalés les uns des autres de deux acides aminés, et qui représentaient la totalité de la séquence de la toxofiline.

Les membranes ont été incubées avec 4 µg/ml de rPP2C purifiée, comme décrit dans le matériel et méthodes. Deux séries de spots ont été détectées de manière reproductible (Figure 25). L'une contient les spots numérotés de 83 à 87, qui correspondent à une séquence localisée dans le domaine CC1B, ce qui est en accord avec les tests de liaison que nous avons réalisés. De manière intéressante, les trois derniers spots (85-87) présentent un signal plus fort que les deux premiers (83-84). Ils correspondent à la séquence 'KARKLFQRRHYHVTKQ'. Aucune liaison n'est observée au niveau des peptides qui correspondent au domaine CC1A, ce qui est une nouvelle fois en accord avec nos tests de liaison. Ces données semblent donc favoriser un site d'interaction de la TgPP2C localisé dans la région CC1B au sein de CC1.

En parallèle de CC1B, la rPP2C se lie également fortement avec une séquence de 28 acides aminés comprise niveau des 14 à 22 : au spots 'SVQLSEGMKRLSMRGRSPSPKRGRFESG'. Il est intéressant de noter que l'intensité du signal associé aux spots 14 à 18 est plus forte que celle observée pour les spots 19 à 22. Etant donné que le spot 14 (SVQLSEGMKRLS) ne partage aucun acide aminé avec les spots 21 et 22, il est probable que NoCC possède deux sites de liaison à la TgPP2C, indépendants mais connectés. D'autre part, ce second site de liaison situé dans NoCC possède au niveau de sa partie C-terminale la sérine 53 qui a été démontrée comme étant phosphorylée par une CKII et comme étant substrat de la TgPP2C.

IV-Discussion

La toxofiline a été caractérisée comme étant une protéine capable de lier à la fois l'actine G et l'actine F *in vitro*, comme cela a été démontré en utilisant de l'actine de muscle de mammifère et dans des systèmes hétérologues tels que les cellules de mammifère. Il a également été montré qu'elle se liait fortement à l'actine G parasitaire (Poupel *et al.*, 2000). La phosphorylation, par la CKII, de la toxofiline sur sa sérine 53 diminue son affinité pour l'actine G de 14 fois. Au contraire, une phosphatase de type 2C déphosphoryle spécifiquement la sérine 53, stabilisant ainsi le complexe actine-toxofiline (Delorme *et al.*, 2003).

Il n'a pas encore été clairement déterminé si la toxofiline cible l'actine du parasite, celle de la cellule hôte, ou les deux. Des études récentes sur le protéome des rhoptries ont identifié la toxofiline comme étant une protéine des rhoptries (Bradley *et al.*, 2005). De ce fait, la toxofiline pourrait être sécrétée pendant l'invasion de la cellule hôte, comme cela a déjà été montré pour d'autres protéines de rhoptries, qui peuvent soit rester dans l'espace vacuolaire soit être insérées dans la membrane de la vacuole parasitophore. Si la toxofiline est sécrétée dans le cytoplasme de la cellule hôte, il est probable qu'elle agisse sur l'actine de la cellule hôte.

Dans cette étude, nous avons utilisé de l'actine de mammifère pour réaliser une analyse structure-fonction de la toxofiline. Nous avons ainsi caractérisé les domaines de la toxofiline, ainsi que les séquences d'acides aminés, qui sont responsables de ses propriétés de liaison à l'actine G et à la TgPP2C.

En utilisant des électrophorèses en gel natif et des tests de « pull-down », nous avons démontré que la toxofiline possède un domaine suffisant pour lier l'actine G et qui contribue à la séquestration des monomères d'actine dans les tests de polymérisation d'actine. Ce domaine, que nous avons appelé CC1A est localisé dans une région de 9 kDa qui comprend le premier domaine en super hélice.

En utilisant ensuite un test de « peptide spot mapping », nous avons détecté trois séries de peptides chevauchants dans CC1A, qui peuvent lier l'actine G. Le criblage de la banque de données protéiques Swissprot Uniprot (216 380 séquences en mai 2006), réalisé avec le logiciel « pattinprot » sur la base de la séquence commune de ces différents peptides chevauchants 'AGQA[K/R]AAA', a fourni plus de 1000 résultats (1054 précisément) quand

une limite de 70% de similarité était imposée. Parmi ces 1000 protéines, au moins neuf sont des protéines liant l'actine connues. Ceci ne signifie pas que cette séquence doit être considérée comme un motif signature responsable des propriétés de liaison à l'actine. Elle pourrait cependant fournir des indications pour des analyses plus précises sur les protéines pour lesquelles une propriété de liaison potentielle à l'actine n'a jamais été étudiée jusqu'à présent, ou sur des protéines déjà connues pour interagir avec l'actine.

Nous avons également réalisé des tests de « peptide spot mapping » sur des peptides portant des mutations systématiques. Les résultats obtenus dans ce cadre nous ont incités à produire des polypeptides correspondant à CC1 dans lesquels nous avons introduit des mutations uniques (L81, K87 et L91), doubles ou triples au niveau de la séquence 'ERLIAGQAKAAALQTVHQ'. Cependant aucune de ces mutations n'a empêché CC1 de lier l'actine dans les tests de « pull-down ». Ceci suggère donc que d'autres sites sont suffisants pour capturer l'actine G.

En revanche, lorsque la séquence 'DEILRATQNLDLRKYENL' a été coupée au milieu, après la thréonine 119, nous avons pu observer un effet majeur sur les propriétés de liaison de CC1A, ce qui indique que cette séquence correspond à un site crucial pour la liaison à l'actine. Quand ce motif dégénéré 'DEIL[R/K]A[T/S]Q' a été analysé in silico, 487 séquences protéiques ont été identifiées parmi lesquelles 14 protéines connues pour lier l'actine G et/ou l'actine F. C'est le cas de membres de la famille ADF/cofiline, des familles gelsoline et adsévérine et de la superfamille des myosines. D'un autre côté, dans les résultats obtenus lorsque la séquence 'NLDL[R/K][K/R]YENL' a été étudiée in silico, une seule protéine parmi les 400 détectées a été décrite comme interagissant avec l'actine. Cette protéine, MACF1, interagit également avec les microtubules et peut-être aussi avec les filaments intermédiaires (Sun et al., 2001). Il est de ce fait tentant de supposer que la toxofiline pourrait jouer un rôle dans la régulation des interactions entre les cytosquelettes de microtubules et d'actine, en particulier pour soutenir le développement de la vacuole parasitophore pendant la vie intracellulaire du tachyzoïte. La vacuole parasitophore est en effet connue pour se déplacer rapidement vers le noyau de la cellule hôte après l'invasion, ceci par un processus dépendant des microtubules de l'hôte.

Nous avons également identifié d'autres régions de la toxofiline ayant des capacités de liaison à l'actine, en particulier dans le domaine NoCC. En gel natif, l'addition de NoCC n'induit en effet pas de retard de migration de l'actine G comme cela est observé avec CC1. En revanche, elle empêche l'actine de rentrer dans le gel, sans doute du fait de la formation de complexes plus grands entre NoCC et plusieurs molécules d'actine. Cependant NoCC ne possède pas d'activité séquestrante comme l'a CC1, et aucune activité de nucléation n'a pu être détectée par les tests de cinétique de polymérisation d'actine marquée au pyrène. Ces données suggèrent donc qu'en plus de CC1A, la toxofiline possède d'autres sites de liaison à l'actine mais avec des propriétés et des caractéristiques de liaison différentes.

La résolution complète de la structure tridimensionnelle du complexe actinetoxofiline, ainsi qu'une analyse thermodynamique permettra de fournir des réponses à ces questions. Sur la base de ces données tridimensionnelles, il sera intéressant d'introduire des mutations dans la séquence de la toxofiline, et de tester *in vivo* leur impact sur la survie du parasite.

Comme il a déjà été démontré, la phosphorylation de la toxofiline contribue à ces capacités de liaison à l'actine. Etant donné que la TgPP2C copurifie de plus avec le complexe actine-toxofiline, nous avons aussi recherché les sites d'interaction entre la toxofiline et la TgPP2C. Nous avons ainsi montré, à la fois par des tests de « pull-down » et de « peptide spot mapping », que la région de la toxofiline portant le premier domaine en super hélice, et qui est liée à la partie C-terminale de CC1A, se lie à la TgPP2C.

Une séquence supplémentaire dans NoCC se lie également à la TgPP2C, et pourrait correspondre à deux sites de liaison distincts mais connectés d'après le « peptide spot mapping». Cette séquence dans NoCC contient également la sérine 53, substrat de la TgPP2C. Quand nous avons criblé une banque de données protéiques non redondante comprenant plus de 3 millions de séquences avec le motif 'LFQRRHYHVT' en imposant une limite de 85% de similarité, seule la toxofiline a été obtenue. Quand la limite a été abaissée à 70% de similarité, 17 protéines ont été trouvées. Parmi ces protéines, aucune ne correspond à un partenaire de PP2C connu. Quand le même crible a été réalisé sur la même séquence mais dégénérée les acides aminés phosphorylables basiques pour et ('LFQ[R/K][R/K]HYHV[T/S]'), seule la toxofiline a été obtenue pour une limite de 90% de similarité et 34 protéines ont été trouvées pour une limite de 70% de similarité.

Contrairement à ce qui est connu pour de nombreuses kinases ou pour les sérinethréonine phosphatases PP1 et PP2A, il n'y a pas de séquence signature claire pour identifier les cibles de déphosphorylation par des PP2C, même si la présence d'un acide aminé basique en position N-terminale -3 et l'absence de proline à côté de la partie C-terminale de l'acide aminé phosphorylé semblent favoriser la déphosphorylation par une PP2C (Pinna et Donella-Deana, 1994). La toxofiline possède justement une arginine en position 50 et ne présente pas de proline entre les acides aminés 53 et 60, ce qui est en accord avec le motif favorable théorique indiquant un substrat de PP2C.

La caractérisation de substrats de PP2C est limitée par le manque d'inhibiteurs ou d'activateurs spécifiques, même si plusieurs cibles majeures ont déjà été identifiées. Ces substrats sont principalement impliqués dans le cycle cellulaire (Cheng *et al.*, 1999, De Smedt *et al.*, 2002) ou dans l'apoptose cellulaire (Klumpp *et al.*, 2003). Les PP2C de mammifère ont également été particulièrement étudiées pour leur rôle dans l'homéostasie du système nerveux central. En effet, par exemple, PP2C α interagit avec les canaux Ca²⁺ et contribue à la transmission synaptique dans les neurones (Li, D. *et al.*, 2005a).

De ce fait, la dissection d'un substrat défini, tel que la toxofiline, au niveau des acides aminés nécessaires pour promouvoir à la fois la liaison de la PP2C et son activité phosphatase, devrait représenter un outil utile pour la caractérisation enzymatique des PP2C et pour le criblage de molécules régulatrices. Dans le futur, des stratégies *in vivo* visant à entrer en compétition avec la PP2C endogène pourraient reposer sur l'utilisation de séquences non humaines telle que celle identifiée dans la toxofiline comme étant responsable de la liaison de la TgPP2C.

CHAPITRE 2

CHAPITRE II

Analyse des proprietes fonctionnelles de la TgPP2C de *Toxoplasma gondii* par surexpression dans les tachyzoïtes

I-Introduction

Chez les eucaryotes, la phosphorylation réversible des protéines est une des modifications post-traductionnelles permettant de contrôler les interactions protéine-protéine et le ciblage de ces protéines, qui sous-tendent des processus cellulaires fondamentaux. La phosphorylation des acides aminés sérine, thréonine ou tyrosine, entraîne des changements conformationnels dans les protéines impliquées, exposant des modules qui modifient les affinités pour des protéines potentiellement partenaires ainsi que les propriétés fonctionnelles. A chaque instant le statut de phosphorylation de ces protéines reflète les activités relatives de kinases et de phosphatases.

Alors que les sérine-thréonine kinases sont un centre d'intérêt majeur depuis de nombreuses années, l'analyse des sérine-thréonine phosphatases ne s'est développée que plus récemment. Elle a été facilitée par la découverte d'inhibiteurs spécifiques de ces phosphatases, tels que l'acide okadaïque, la microcystine, la cantharidine, la calyculine, la tautomycine ou la dinophysistoxine-4.

Contrairement aux kinases eucaryotes dont la structure est relativement homogène, les phosphatases sont très diverses. Elles ont été séparées en trois familles géniques distinctes. Deux d'entre elles déphoshorylent spécifiquement les sérines et thréonines et représentent environ la moitié des phosphatases. Ce sont les PPP et les PPM. La troisième famille est la famille des tyrosine phosphatases, qui correspond à l'autre moitié des phosphatases, et déphosphoryle principalement, comme son nom l'indique, les tyrosines.

	PP1	PP2A	PP2B
Microcystine	0,1 nM	0,1 nM	ND
Nodularine	1,8 nM	0,03 nM	8,7 mM
Acide okadaïque	3 nM	0,2-1 nM	>10 mM
Calyculine	0,3-0,7 nM	0,2-1 nM	>10 mM
Tautomycine	0,7 nM	0,7 nM	~70 mM
Cantharidine	0,5-2 mM	0,2 mM	> 1 mM
Thyrsiféryl	> 1 mM	4-16 mM	>10 mM
Inhiniteur 1	0,5-0,8 nM	NI	NI
Inhibiteur 2	0,5-0,8 nM	NI	NI
I-1PP2A	NI	4 nM	NI
I-2PP2A	NI	2 nM	NI

Tableau 2 : Récapitulatif des inhibiteurs principaux des différentes PPP

(Scheppeck *et al.*, 1997). Les données correspondent aux IC₅₀ (concentration inhibant 50% de l'activité phosphatase). NI : non inhibiteur, ND : non déterminé.

A. Les sérine-thréonine phosphatases de type 2C

1-Caractéristiques des sérine-thréonine phosphatases

La première classification des sérine-thréonine phosphatases a été réalisée en 1983 : elle repose sur des différences de phosphorylation des sous-unités de la kinase phosphorylase, utilisée comme substrat *in vitro*.

Deux familles ont ainsi été distinguées : les phosphatases de type 1, qui déphosphorylent la sous-unité β de la kinase phosphorylase et qui sont inhibées par des concentrations nanomolaires des inhibiteurs endogènes I-1 et I-2, et les phosphatases de type 2, qui déphosphorylent la sous-unité α de la kinase déphosphorylase et sont insensibles à I-1 et I-2. Cette dernière famille a été elle-même divisée en trois sous-familles : les phosphatases de type 2A, actives spontanément, les phosphatases de type 2B (calcineurine), dépendantes du calcium, et les phosphatases de type 2C dépendantes du magnésium (Ingebritsen et Cohen, 1983). Cependant, cette discrimination ne reflète pas les relations phylogénétiques réelles existant entre ces phosphatases. Ainsi PP2A est plus apparentée à PP1 qu'à PP2C. C'est pourquoi un autre classement a été réalisé avec d'une part les PPP, comprenant les PP1, PP2A et PP2B, et d'autre part les PPM auxquelles appartiennent les PP2C et la pyruvate déshydrogénase phosphatase (Wera et Hemmings, 1995).

Les sérine-thréonine phosphatases sont toutes des métalloenzymes fixant chacune deux ions métalliques (Fe et Zn pour PP2B, Fe et Mn pour PP1, Mn et Mn pour PP2C) au niveau de leur site actif. Ces ions métalliques participent à la déphosphorylation du substrat par hydrolyse (Das *et al.*, 1996). La similitude du mécanisme catalytique est sans doute due à une structure générale du domaine catalytique relativement commune parmi les sérine-thréonine phosphatases. Cependant, les ions métalliques ne jouent pas exactement le même rôle dans le processus d'hydrolyse selon les sous-familles observées.

La discrimination des PPP est faite sur la base de leur sensibilité à différentes toxines. Un résumé des différents inhibiteurs de ces phosphatases est présenté (Tableau 2). Toutes les PPP sont des holoenzymes dont la grande diversité moléculaire est générée par la combinaison des sous-unités régulatrices avec les domaines catalytiques (Wera et Hemmings, 1995). Cette diversité explique qu'un nombre relativement limité de sous-unités catalytiques est responsable de la déphosphorylation spécifique d'une grande variété de protéines. En effet, une sous-unité régulatrice donnée confère une spécificité de fonction à son enzyme en déterminant sa localisation cellulaire ou en modulant son activité et son affinité pour un



<u>Figure 26</u> : Vue orthogonale d'une représentation en ruban de la structure secondaire de la PP2C α

(Das et al., 1996)

Les acides aminés coordonnant les ions métalliques (Asp38, Asp60, Asp239 et Asp282), les deux ions manganèse (sphères vertes) et l'ion phosphate sont indiqués.

substrat. Ainsi PP1 et PP2A sont impliquées dans la régulation de fonctions cellulaires aussi diverses que le métabolisme du glycogène, la contraction musculaire, le contrôle du cycle cellulaire ou l'épissage des ARN. En revanche, seules deux formes de PP2B ont été identifiées : elles consistent en une sous-unité A avec un domaine catalytique N-terminal et une région régulatrice C-terminale qui contient les sites de liaison à une sous-unité B et à la calmoduline. La protéine possède de plus une séquence auto-inhibitrice à son extrémité C-terminale (Kissinger *et al.*, 1995).

D'autres membres des PPP ont été identifiés plus récemment, comme PP4, PP5 et PP6, qui semblent agir pendant le cycle cellulaire (Cohen, 1997). Les PP4, extrêmement conservées, sont nucléaires et seraient impliquées dans la nucléation des microtubules au niveau du centrosome ; les PP5 sont activées *in vitro* par des acides gras insaturés et participent à la régulation de la transcription des ARN ribosomiques, tandis que les PP6 sont nécessaires à la transition G_1/S chez la levure, et permettent l'accumulation de certaines cyclines requises pour la transition G_2/M .

La deuxième famille de sérine-thréonine phosphatases, la famille des PPM, est représentée majoritairement par les PP2C.

2-Les phosphatases de type 2C

Les PP2C sont présentes à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes. Mais elles sont particulièrement nombreuses dans les plantes. Ainsi 76 gènes codant des PP2C ont été identifiés dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* contre seulement 15 dans le génome humain (Schweighofer *et al.*, 2004). Les PP2C ont été identifiées à l'origine comme des phosphatases dont l'activité est dépendante du magnésium *in vitro*. Ce sont toutes des enzymes considérées comme monomériques. De ce fait, la diversité fonctionnelle observée parmi les PP2C n'est pas due, comme chez les PPP, à la variété de combinaisons possibles entre les sous-unités régulatrices et la sous-unité catalytique, mais à des différences de contexte structural du domaine catalytique au sein de la molécule.

Il existe quatre isoformes principales de PP2C dans les cellules de mammifère. Les PP2C α et PP2C β sont les plus étudiées. Ainsi la structure de PP2C α a été obtenue à une résolution de 2 Å (Das *et al.*, 1996). Cette phosphatase possède deux domaines : un domaine catalytique de 290 acides aminés en N-terminal comprenant six hélices α et onze feuillets β , et un domaine C-terminal de 90 acides aminés composé de trois hélices α . Le domaine catalytique est dominé par une structure en sandwich β formée par l'association de deux feuillets β antiparallèles, chacun étant flanqué d'une paire d'hélices α antiparallèles (Figure

26). Le domaine C-terminal ne semble pas jouer de rôle dans la catalyse enzymatique. En revanche, il pourrait être impliqué dans la spécificité de substrat de la phosphatase. Le site binucléaire de liaison des ions Mn^{2+} ou Mg^{2+} , qui coordonne de manière indirecte l'ion phosphate apporté par le substrat, forme le site catalytique situé précisément au niveau du canal du sandwich β . Ces ions métalliques activent des molécules d'eau qui servent ensuite de nucléophiles pour catalyser l'hydrolyse du groupement phosphate (Barford, 1996).

Il a été identifié dans les domaines catalytiques des PP2C onze motifs conservés contenant huit acides aminés « absolument » conservés (Bork *et al.*, 1996). Ce sont les acides aspartiques des motifs 1 et 2, la thréonine du motif 4, les glycines des motifs 5 et 6, la séquence acide aspartique – glycine du motif 8 et l'acide aspartique du motif 11. La plupart de ces acides aminés conservés se trouvent au niveau ou à proximité des sites de liaison des ions métalliques. Une étude plus approfondie de mutagenèse dirigée sur ces différents acides aminés dans PP2C β a mis en évidence que les acides aspartiques 60 et 243, impliqués dans la liaison des ions Mn²⁺/Mg²⁺, étaient essentiels pour conserver l'activité catalytique de la protéine (Kusuda *et al.*, 1998).

Aucun inhibiteur de PP2C n'a été identifié à ce jour. En revanche, une équipe a montré que les PP2C α et β pouvaient être stimulées *in vitro* par les acides gras insaturés à forte lipophilie tels que l'acide arachidonique, l'acide oléique ou l'acide ginkgolique (Ahlemeyer *et al.*, 2001, Klumpp *et al.*, 1998).

3-Propriétés fonctionnelles connues des PP2C

Les PP2C sont impliquées dans de très nombreuses fonctions cellulaires. Elles interviennent en particulier au cours du cycle cellulaire et de l'induction de l'apoptose, de l'activation des voies de réponse au stress, et de la régulation de la dynamique de l'actine.

a)Les PP2C, le cycle cellulaire et l'apoptose.

Les PP2C participent à la régulation de différentes phases du cycle cellulaire. Ainsi at-il été montré chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* que deux des cinq PP2C identifiées dans le génome, Ptc2p et Ptc3p, étaient responsables de la déphosphorylation *in vitro* et *in vivo* de la thréonine 169 de Cdc28p, une kinase dépendante des cyclines (Cdk) (Cheng *et al.*, 1999). Les Cdk, ainsi déphosphorylées, sont inactives et bloquent la progression du cycle cellulaire. De même, dans l'oocyte de Xénope, il a été montré qu'une PP2C était responsable de la déphosphorylation inactivatrice de Cdc2, aussi appelée Cdk1 (De Smedt *et al.*, 2002).

Les PP2C ont été également plus largement impliquées dans les voies de croissance des cellules. Ainsi, la phosphatase 2C Wip1 a été identifiée lors de la recherche de gènes dont l'expression est activée suite à une exposition aux radiations ionisantes. Son expression dépend de la présence de p53 active et sa surexpression inhibe la croissance cellulaire (Fiscella et al., 1997). Une autre PP2C, FIN13, a été identifiée dans les cellules de mammifère comme inhibant la progression du cycle cellulaire. En effet, les cellules transfectées avec le gène codant pour FIN13, ne se multiplient pas, ne répliquent pas leur ADN et sont bloquées en phase S précoce (Guthridge et al., 1997). De même chez S. cerevisiae, la phosphatase de type 2C Ptc2p semble impliquée dans les « checkpoints » consécutifs à un dommage de l'ADN (Marsolier et al., 2000). Plus récemment, les PP2C ont été directement impliquées dans l'apoptose. Ainsi l'expression ectopique dans les cellules HeLa, de la PP2C FEM-2 de *Caenorhabditis elegans*, dont le gène détermine le sexe, ainsi que la surexpression de son orthologue humain hFEM-2, provoque la mort des cellules par une apoptose caspasedépendante (Tan et al., 2001). De même, dans les cellules neuronales, l'induction de l'apoptose par un traitement aux acides gras a été corrélée avec une stimulation de l'activité des PP2C (Klumpp et al., 2002). L'implication directe de ces phosphatases a été démontrée par ARN interférence sur les PP2C α et β . En effet, les cellules présentant un plus faible niveau d'expression de ces phosphatases sont moins sensibles aux acides gras (Schwarz et al., 2006). Le fait que PP2C soit capable de déphosphoryler BAD in vitro est en faveur de ces observations (Klumpp et al., 2003).

b)Les PP2C et l'activation des voies de réponse au stress

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de PP2C dans les cascades de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase). Les cascades MAPK sont des modules de signalisation intracellulaire composés de trois niveaux de kinases séquentiellement activatrices, généralement appelées MAP kinase (MAPK), MAP kinase kinase (MAPKK) et MAP kinase kinase kinase (MAPKKK). Une MAPKKK activée phosphoryle et active une MAPKK spécifique qui phosphoryle et active ensuite une MAPK spécifique. Dans les cellules de mammifère, trois cascades MAPK distinctes ont été identifiées. L'une d'entre elle est la voie de la MAPK p38. p38 est activée par les MAPKK MKK3 ou MKK6 lors s'un stress environnemental. Il a été démontré que la PP2C α de mammifère déphosphoryle et inactive à la fois *in vitro* et *in vivo* p38 et sa MAPKK MKK6 (Takekawa *et al.*, 1998). De plus, la PP2C β est également impliquée dans la voie de signalisation MAPK p38, dans la mesure où elle déphosphoryle et inactive TAK1, la

MAPKKK responsable de l'activation de MKK6 (Hanada *et al.*, 2001). Ce rôle dans les cascades de signalisation MAPK a aussi été confirmé chez les plantes, en particulier chez *A. thaliana*. Ainsi la PP2C MP2C déphosphoryle et inactive spécifiquement la MAPK SIMK (salt stress-inducible MAPK) (Meskiene *et al.*, 2003).

c)Les PP2C et la régulation de la dynamique de l'actine

Les PP2C ont également été impliquées dans la régulation de la dynamique de l'actine. Deux PP2C, POPX1 et POPX2, ont été impliquées dans les voies de signalisation des Rho GTPases Cdc42. L'activation de Cdc42 promeut la formation de filopodes et la perte des fibres de stress *via* son interaction avec la kinase PAK (p21-activated kinase). Cette liaison entraîne l'activation de PAK par autophosphorylation. POPX1 et POPX2 déphosphorylent et inactivent spécifiquement PAK, inversant ainsi le phénotype observé après l'activation de Cdc42 (Koh *et al.*, 2002).

Dans les plaquettes humaines, une PP2C intervient dans la régulation de l'activité de la moésine. Les moésines appartiennent à la super-famille des ERM (ezrine, radixine, moesine) et sont des protéines localisées dans des structures membranaires riches en actine, telles que les filopodes ou les sillons de clivage formés pendant la mitose, qui, à l'état activé phosphorylé, lient l'actine F. Elles serviraient de lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine. Une PP2C, purifiée à partir de plaquettes humaines, déphosphoryle *in vitro* la moésine, inactivant ainsi sa liaison à l'actine F (Hishiya *et al.*, 1999).

Enfin chez le plasmode *Physarum polycephalum*, la fragmine est déphosphorylée par une PP2C (Waelkens *et al.*, 2000). La fragmine est une protéine de la famille des gelsolines, qui casse et coiffe les filaments d'actine. L'effet de cette déphosphorylation sur la biologie de *P. polycephalum* est encore inconnu.

B. Les phosphatases de T. gondii

Chez *T. gondii*, comme chez les autres membres du phylum des Apicomplexa, l'étude des phosphatases est relativement peu développée par rapport à celles concernant les kinases.

1-Les phosphatases connues chez les Apicomplexes

Un certain nombre de sérine-thréonine phosphatases a été identifié chez les Apicomplexes depuis la fin des années 90. Trois organismes ont fait l'objet d'études plus poussées. Il s'agit de *Theileria parva*, *Plasmodium falciparum* et *T. gondii*.

Une activité phosphatase sensible à la présence d'acide okadaïque a été mise en évidence dans des extraits de *T. parva* purifiés à partir de cellules B infectées. Les protéines responsables de cette activité ne sont pas stimulées par les protamines, ce qui indique que cette activité phosphatase majeure de *T. parva* est due à des PP1 (Cayla *et al.*, 2000).

Plusieurs types de sérine-thréonine phosphatases ont été identifiés chez *P. falciparum*. Tout d'abord un homologue de PP1, appelé PfPP1 a été caractérisé chez les stades intraérythrocytaires du parasite. Il présente 83 à 87% d'identité avec les PP1 de levure et de mammifère, et possède la séquence signature des PPP. PfPP1 pourrait être impliqué dans le métabolisme du glycogène comme le suggère le fait qu'il est capable d'inverser le phénotype observé chez des clones de levure mutants au niveau du gène glc7, codant pour une PP1 (Bhattacharyya *et al.*, 2002). Cette phosphatase pourrait aussi jouer un rôle dans la libération des mérozoïtes depuis les érythrocytes car elle module l'état de phosphorylation du domaine N-terminal de PfSBP1, protéine transmembranaire interagissant avec la membrane de la cellule hôte *via* son domaine C-terminal. Le fait d'inhiber PfPP1 entraîne une hyperphosphorylation de PfSBP1 et bloque la libération des parasites (Blisnick *et al.*, 2006).

Une PP2A, PfPP-β, a été identifiée dans les gamétocytes de *P. falciparum* et pourrait être impliquée dans le développement du stade sexué du parasite (Li, J. L. et Baker, 1997). Une autre activité PP2A a été détectée dans des extraits cytosoliques de stade érythrocytaire, accompagnée d'une activité PP2B (Dobson *et al.*, 1999). Mais aucun substrat n'a été clairement caractérisé pour ces protéines jusqu'à présent, bien qu'il ait été montré que la calcineurine de *P. falciparum* s'associait *in vivo* avec Hsp90 (Kumar *et al.*, 2005). En parallèle, une PPP inhabituelle, PfPPJ a été mise en évidence. PfPPJ possède un domaine Cterminal unique qui pourrait être responsable de sa résistance aux inhibiteurs classiques spécifiques des PP2A (Dobson *et al.*, 2001). Elle a de plus la particularité d'être exprimée différemment selon les stades du cycle de *P. falciparum*. En effet, les niveaux d'ARNm spécifiques détectés sont maximaux dans le stade schizonte, quatre fois plus faibles dans le stade en anneau et quasiment nuls dans le stade trophozoïte, ce qui suggère une régulation dépendant du stade parasitaire. Enfin, un membre de la famille des PP5 a été identifié. Localisé dans le noyau du parasite, il pourrait être impliqué dans le cycle cellulaire (Lindenthal et Klinkert, 2002).

Une des sérine-thréonine phosphatases les plus étudiées de *P. falciparum* est une PP2C, appelée PfPP2C. Il s'agit d'une protéine de 103 kDa composée de deux domaines portant chacun un domaine catalytique, et qui pourrait résulter de la fusion de deux



Figure 27 : Représentation schématique de la TgPP2C

Le domaine catalytique et le domaine N-terminal de 18 acides aminés sont représentés.

Les acides aminés critiques sont indiqués en jaune.

Les sites de phosphorylation potentielle par la CK2 et la PKA situés dans le domaine N-terminal sont indiqués.



Figure 28 : Les tachyzoïtes surexprimant la forme active de la TgPP2C présentent un défaut de développement

Des tachyzoïtes ont été transfectés avec la GFP, la GFP-PP2C sauvage ou la GFP-PP2C D273A inactive et mis au contact de cellules. Les cellules ont été fixées 20 h et 35 h après la transfection et observées en microscopie à fluorescence.

Pour chaque type de transfection, la superposition du contraste de phase et de la fluorescence GFP d'une part, et la fluorescence GFP seule d'autre part, sont présentés. N, noyau.

phosphatases ancestrales. PfPP2C est capable de se dimériser, le domaine 1 d'un monomère se liant au domaine 2 du deuxième. Cette dimérisation permet à la protéine d'exhiber la totalité de son activité (Mamoun *et al.*, 1998). Des substrats de cette phosphatase ont été recherchés par « Far Western ». Parmi les protéines identifiées se trouvent la sous-unité α de l'ARN polymérase II, la H⁺-transporteur ATP synthétase, une sérine-thréonine kinase et le facteur d'élongation 1 β ou PfEF-1 β . Il a été démontré que PfPP2C déphosphorylait *in vitro* PfEF-1 β , ce qui diminue son activité d'échange de nucléotide médiée par la PKC (Mamoun et Goldberg, 2001).

Chez *T. gondii*, aucune activité PP2A n'a été détectée avec les techniques habituelles jusqu'à présent. En revanche, une activité PP1, sensible à l'acide okadaïque, la tautomycine et l'inhibiteur I-2, a été caractérisée dans le cytosol des tachyzoïtes (Delorme *et al.*, 2002). Cette PP1 est impliquée dans l'invasion des parasites dans la mesure où un traitement à l'acide okadaïque ou à la tautomycine diminue de 50% les propriétés invasives des tachyzoïtes (Delorme *et al.*, 2002).

2-La TgPP2C : caractéristiques et fonctions connues

La TgPP2C de *T. gondii* a été mise en évidence par copurification avec le complexe actine G-toxofiline. Il s'agit d'une protéine de 36 kDa, constituée de 331 acides aminés, dont le point isoélectrique s'élève à 5,44. Elle possède les onze motifs conservés et les huit acides aminés signature de la famille des PP2C. En revanche, tout comme les PP2C de bactéries (Obuchowski *et al.*, 2000), elle ne présente pas d'histidine dans le motif 2 conservé 'DGH'. Cet acide aminé est pourtant critique pour l'activité PP2C chez la souris (Kusuda *et al.*, 1998). Elle possède de plus un domaine N-terminal unique de 18 acides aminés présentant deux sites potentiels de phosphorylation par une CKII et une PKA (Figure 27). Son activité PP2C a été confirmée *in vitro* par sa dépendance au magnésium et son insensibilité à l'acide okadaïque (Delorme *et al.*, 2003). Cette seule protéine est responsable de 0,3% de l'activité PP2C totale mesurée dans le cytosol parasitaire.

La TgPP2C déphosphoryle la sérine 53 de la toxofiline, après un transfert de phosphate catalysé spécifiquement par une caséine kinase II. Sous la forme déphosphorylée, la toxofiline est quatorze fois plus affine pour l'actine, comme en témoigne une étude par biacore. Cependant, il est probable que la TgPP2C déphosphoryle d'autres cibles, dans la mesure où un certain nombre de protéines cytosoliques présentent une hyperphosphorylation après déplétion, par immunoprécipitation, de la TgPP2C du cytosol (Delorme *et al.*, 2003).



Figure 29 : Représentation schématique des différentes étapes de l'endodyogénie

(Black et Boothroyd, 2000)

Quand un parasite commence à se diviser, deux complexes membranaires internes (IMC) se développent au milieu de la cellule à partir de ce qui semble être un centre organisateur de microtubule (anneau polaire) et un conoïde rudimentaires.

Pendant que l'IMC s'étend à partir de ces structures, le noyau (N) et la mitochondrie (Mitoch.) se divisent. Les organelles apicaux (NO) naissants se développent au niveau des pôles antérieurs pendant les cellules filles grandissent.

Enfin, le cytoplasme entier est divisé entre les filles et l'IMC de la cellule mère se dissocie. Un sillon de clivage divise les cellules à partir du pôle antérieur. La division continue sur toute la longueur des cellules jusqu'à ce qu'elle atteigne l'extrémité postérieure où il peut rester un corps résiduel connectant les deux cellules filles.

Afin d'identifier les fonctions de la TgPP2C autres que son action sur la toxofiline, la stratégie adoptée au laboratoire a été de surexprimer la protéine dans les tachyzoïtes. Les premiers résultats obtenus par V. Delorme ont mis en évidence que les parasites exprimant la TgPP2C-GFP sous forme active, ne se développent pas normalement dans leur vacuole parasitophore (Figure 28), alors que les parasites exprimant, soit la GFP soit une TgPP2C-GFP inactive, se multiplient normalement. La forme inactive de la TgPP2C est obtenue en introduisant une substitution au niveau de l'acide aspartique 273 (identifié comme critique pour l'activité catalytique). Ces expériences confirment que le défaut de développement serait dû à la présence en excès d'une activité phosphatase de type 2C.

C. La réplication du tachyzoïte de T. gondii : l'endodyogénie

Une fois dans sa cellule hôte, le tachyzoïte se divise, au sein de la vacuole parasitophore, par un processus singulier appelé endodyogénie. Ce processus se caractérise par la formation de deux cellules filles à l'intérieur de la cellule mère. Deux parasites sont ainsi produits à chaque cycle mitotique en sept à dix heures selon les souches (Hu *et al.*, 2002). Cette réplication se fait de manière quasi synchrone dans chaque vacuole parasitophore, donnant lieu à la formation de rosettes caractéristiques.

Même si l'endodyogénie a été décrite il y a 35 ans, le cycle cellulaire de *T. gondii* conduisant à sa réplication reste peu documenté.

1-Les différentes étapes de l'endodyogénie

L'endodyogénie est initiée par la formation de deux membranes pelliculaires formant l'IMC, qui sont synthétisées au milieu de la cellule mère et définissent les futures cellules filles. Pendant que cet IMC fils s'étend, la cellule mère devient plus sphérique alors que les organites apicaux se forment au niveau des deux pôles antérieurs des cellules filles et s'organisent soutenus par le cytosquelette de microtubules. L'enveloppe nucléaire reste toujours intacte tandis que le noyau, l'apicoplaste et une mitochondrie se divisent en deux et se répartissent entre les deux cellules filles (Black et Boothroyd, 2000).

Chaque cellule continue ensuite à maturer jusqu'à ce que le cytoplasme et l'ensemble de son contenu soient divisés entre les deux filles. Enfin, l'IMC du parasite parent est progressivement dégradé alors que le plasmalemme original contribue à la formation de l'enveloppe des deux nouvelles cellules. Les deux filles restent cependant attachées au niveau de leur pôle postérieur par un corps résiduel, ce qui explique la formation de rosettes au fur et à mesure de la réplication des parasites (Figure 29).

2-Les différentes étapes du cycle cellulaire : moyens d'étude, comparaison et implications pour T. gondii

Le cycle cellulaire d'une cellule eucaryote se divise en quatre phases successives. Après la phase M, qui se compose d'une division nucléaire (mitose) et d'une division cytoplasmique, les cellules filles entrent en interphase d'un nouveau cycle. L'interphase débute avec la phase G_1 pendant laquelle les activités biosynthétiques des cellules recommencent à une vitesse élevée. La phase S commence avec la synthèse d'ADN et se termine quand le noyau a doublé en ADN. Les cellules entrent ensuite en phase G_2 qui se poursuit jusqu'au début de la mitose.

De façon générale, une méthode traditionnelle pour étudier le cycle cellulaire d'une cellule consiste à synchroniser la croissance cellulaire, par exemple en lui fournissant de la thymidine exogène. Cette thymidine est récupérée par la cellule grâce à une thymidine kinase qui la convertit en désoxythymidine monophosphate (dTMP), elle-même précurseur de la désoxythymidine triphosphate (dTTP) utilisée pendant la réplication. L'augmentation du pool de dTTP inhibe la ribonucléotide réductase, ce qui crée une déplétion du stock de cytosine, d'où un arrêt réversible du cycle cellulaire en phase G_1 . Une fois la thymidine exogène éliminée, les cellules reprennent leur cycle cellulaire de manière synchrone.

T. gondii ne possèdant pas de thymidine kinase, cette technique n'est pas utilisable dans ce système. Pour palier ce manque, Radke et White ont introduit le gène de la thymidine kinase du virus *Herpes simplex* dans certaines souches. Après traitement et chasse de thymidine, ils ont ainsi synchronisé une population de parasites et déterminé la durée de chaque phase du cycle cellulaire, en analysant le contenu en ADN des cellules. La phase G_1 dure environ quatre heures, tandis que la phase S dure deux heures, et les phases G_2 et M durent à elles deux moins d'une heure (Radke et White, 1998). Il en résulte que dans une population « asynchrone », 60% des parasites possèdent une quantité d'ADN de 1N, ce qui correspond à la phase G_1 , 30% sont en phase S (entre 1N et 2N ADN) et entre 5 et 10% ont 2N ADN et sont donc en phase G_2/M (Radke *et al.*, 2001).

3-Division cellulaire et évolution du contenu nucléaire

Pour mettre en relation les différentes étapes de la division cellulaire et de la réplication du matériel chromosomique, Hu *et al.* ont cloné dans *T. gondii* le gène codant une

protéine de l'IMC, IMC1, fusionné avec un gène rapporteur YFP (Hu *et al.*, 2002). Ce marquage permet de visualiser la formation des IMC des cellules filles au cours de la division.

Ils ont ainsi mis en évidence que la duplication et la séparation des centrioles, ainsi que de l'appareil de Golgi étaient les événements les plus précoces morphologiquement reconnaissables de la division cellulaire. C'est à ce moment que la réplication de l'ADN est initiée (phase S). L'IMC des cellules filles s'organise progressivement avant la fin de la réplication de l'ADN. Une fois que cette réplication est achevée, le noyau s'allonge et se sépare en deux, puis les mitochondries sont divisées entre les deux cellules filles (Hu *et al.*, 2002).

Il est particulièrement intéressant de noter que la perturbation des microtubules du parasite permet de découpler la division nucléaire et la division cytoplasmique, indiquant que les points de contrôle qui régulent la division cellulaire chez les autres eucaryotes sont probablement absents chez *T. gondii* ou s'articulent différemment (Morrissette et Sibley, 2002).

D. Objectifs et démarche expérimentale

L'objectif de cette étude est de caractériser plus précisément le défaut de développement précédemment observé chez les parasites surexprimant la forme active de la TgPP2C. L'analyse de la localisation subcellulaire de la TgPP2C dans les tachyzoïtes nous a conduits à nous focaliser sur le noyau. Nous avons donc cherché des substrats potentiels de la TgPP2C, responsables du phénotype observé. Pour ce faire, nous avons utilisé une construction codant pour la TgPP2C mais sous un promoteur moins fort, afin d'éviter un effet artéfactuel dû à une trop grande quantité de protéine. De plus, nous nous sommes servi d'un tag plus petit, permettant l'expression d'une protéine de taille plus proche de celle de la protéine endogène.

Cette nouvelle construction a permis d'une part, d'identifier un effet de la TgPP2C sur la division du noyau parasitaire, et d'autre part, de mettre en évidence la sécrétion d'une partie de la TgPP2C dans la cellule hôte.

II-Matériel et méthodes

A. Parasites et culture cellulaire

1-Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires humaines ont été utilisées : des cellules épithéliales d'origine tumorale (cellules HeLa) et des cellules fibroblastiques de prépuce (cellules HFF). Les cellules ont été cultivées dans du milieu minimum essentiel modifié de Dulbecco avec Glutamax (DMEM, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fétal (SVF, Dutscher) et en présence d'antibiotiques (pénicilline, 100 U/ml, streptomycine 100 µg/ml ; Gibco) (37°C, 5% CO₂). Le repiquage a été réalisé à l'aide de digestion trypsique (500 mg/ml trypsine, 200 mg/ml EDTA ; Gibco) du tapis cellulaire à confluence.

2-Culture des parasites

Les cellules HFF ont été cultivées à confluence dans des fioles de 25 cm² puis mises en contact avec les parasites extracellulaires récoltés dans un surnageant de cellules parasitées. Ces tachyzoïtes ont été récoltés quelques heures après leur sortie des cellules de façon à optimiser leur taux d'invasivité. Afin d'augmenter la synchronisation de la croissance parasitaire, les parasites extracellulaires ont été éliminés 1 h après l'infection par lavages en PBS. Les cellules parasitées ont été cultivées en milieu DMEM 10% SVF (37°C, 5% CO₂). La multiplicité d'infection était de l'ordre de 10 à 20 parasites par cellule.

Environ 20 h après le contact, la nouvelle génération de parasites a émigré des cellules hôtes qui ont été lysées. Les parasites ont alors été récoltés dans le surnageant et utilisés directement pour des expériences de transfection, d'invasion cellulaire ou pour le maintien de la souche.

B. <u>Constructions plasmidiques codant pour différentes formes de la</u> TgPP2C

Dans tous les cas, les constructions ont été vérifiées par séquençage avant utilisation pour les transfections de parasites.



Figure 30 : Représentation du vecteur pMAH14-TgPP2C-HA-FLAG

1-Constructions permettant la surexpression de la TgPP2C dans le tachyzoïte

La séquence de la TgPP2C a été clonée dans le vecteur pMAH14 (fourni par M.A. Hakimi, CNRS, Grenoble), qui permet une expression spécifique dans le tachyzoïte. Ce vecteur contient la séquence d'un promoteur fort, GRA1, et d'un terminateur SAG1. Deux tags, HA et FLAG, sont présents en aval du multi-site de clonage.

La TgPP2C a été amplifiée par PCR à l'aide d'amorces contenant les sites BamH1 en 5' et EcoR1 en 3'. Le vecteur pMAH14 et l'insert ont été digérés par ces deux enzymes, puis l'insert a été introduit dans le vecteur digéré. La construction ainsi obtenue code donc la TgPP2C-HA-FLAG. Elle a été appelée pMAH14-TgPP2C (Figure 30).

La TgPP2C a été également introduite dans le vecteur pMAH14 portant, en plus des tags HA et FLAG, un tag GFP en aval. Le vecteur ainsi obtenu a été appelé pMAH14-TgPP2C-GFP, le vecteur vide étant nommé pMAH14-GFP.

2-Construction des formes mutées « inactives » de pMAH14-TgPP2C

Les deux formes mutées de la TgPP2C (D273A et D67A) ont été obtenues par mutagenèse dirigée à l'aide du kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagène) sur le vecteur pMAH14-TgPP2C.

Pour la mutation D273A, l'amorce sens utilisée était 5'-GATTCTCGCGACTG<u>C</u>TGGCTTGTGGGACGTCG-3', et l'amorce antisens était 5'-CGACGTCCCACAAGCCA<u>G</u>CAGTCGCGAGAATC-3' (mutation soulignée).

Pour la mutation D67A, l'amorce sens utilisée était 5'-CCTTCTTCGGTGTCTTCG<u>C</u>TGGCACTGTTGGAGATTC-3' et l'amorce antisens était 5'-GAAATCTCCAACAGTGCCA<u>G</u>CGAAGACACCGGAAGAAGG-3' (mutation soulignée).

3-Construction de pMAH14-TgPP2CANter et de chimères portant le domaine Nter

La construction pMAH14-TgPP2C Δ Nter a été obtenue comme suit. Un site BamH1 a été introduit, par mutagenèse dirigée, dans le vecteur pMAH14-TgPP2C, juste après le 18^{ème} acide aminé. L'amorce sens utilisée était 5'-



<u>Figure 31</u> : Représentation des différentes protéines chimères construites pour étudier le rôle du domaine N-terminal de la TgPP2C

GTCCCTCCTACCATTCATGGATCCCTCCCAACGTCGTATC-3' BamH1 (site 5'introduit souligné) et l'amorce antisens utilisée était GATACGACGTTGGAGGGAGGGATCCATGAATGGTAGGAGGAC-3' (site BamH1 introduit souligné). Le vecteur ainsi obtenu, appelé pMAH14-Nter-Bam-TgPP2C, a été digéré avec l'enzyme BamH1. Le fragment correspondant à la partie N-terminale de la TgPP2C a été éliminé, puis le vecteur religué.

La construction pMAH14-Nter a été obtenue en suivant une stratégie de clonage similaire. Un site EcoR1 a été introduit, par mutagenèse dirigée, dans le vecteur pMAH14-TgPP2C, juste après le 18^{ème} acide aminé. L'amorce sens utilisée était 5'-GTCCCTCCTACCATTCATGAATTCCTCCCTCCAACGTCGTATC-3' (site EcoR1 introduit souligné) et l'amorce antisens était 5'-GATACGACGTTGGAGGGAGGAAGGAATTCATGAATGGTAGGAGGGAC-3' (site EcoR1 introduit souligné). Le vecteur ainsi obtenu, appelé pMAH14-Nter-Eco-TgPP2C, a été digéré avec l'enzyme EcoR1. Le fragment correspondant à la partie C-terminale de la TgPP2C a été éliminé, puis le vecteur a été religué.

La construction pMAH14-Nter-GST a été obtenue à partir du plasmide pMAH14-Nter-Eco-TgPP2C. Ce vecteur a été digéré avec l'enzyme EcoR1 et le fragment correspondant à la partie C-terminale de la TgPP2C a été éliminé. Le vecteur linéarisé a été déphosphorylé avec la phosphatase intestinale de veau (CIP, Biolabs). La séquence codant pour la GST a été amplifiée par PCR en utilisant l'amorce amont 5'-G<u>GAATTC</u>ATGTCCCCTATACTAGG-3' et l'amorce aval 5'-C<u>GAATTC</u>TTTTGGAGGATGGTCGCCACC-3' (sites EcoR1 soulignés). Après digestion par EcoR1, l'insert a ensuite été introduit, par ligation, dans le vecteur linéarisé et déphosphorylé.

La construction pMAH14-GST a été obtenue en suivant le protocole suivant. La séquence codant pour GST a été amplifiée par PCR avec l'amorce amont 5'-G<u>GGATCC</u>ATGTCCCCTATACTAGG-3' (site BamH1 souligné) et l'amorce aval 5'-C<u>GAATTC</u>TTTTGGAGGATGGTCGCCACC-3' (site EcoR1 souligné). L'insert a ensuite été digéré par les enzymes BamH1 et EcoR1. En parallèle, le vecteur pMAH14 a été également digéré avec BamH1 et EcoR1 et l'insert y a été introduit par ligation.

La construction pMAH14-Nter-GFP a été obtenue par la même stratégie de clonage que le vecteur pMAH14-Nter. Un site BamH1 a été introduit, par mutagenèse dirigée, dans le vecteur pMAH14-TgPP2C-GFP, juste après le 18^{ème} acide aminé. L'amorce sens utilisée était 5'-GTCCCTCCTACCATTCAT<u>GGATCC</u>CTCCCTCCAACGTCGTATC-3' (site BamH1 introduit souligné) et l'amorce antisens était 5'- GATACGACGTTGGAGGGAG<u>GGATCC</u>ATGAATGGTAGGAGGAC-3' (site BamH1 introduit souligné). Le vecteur ainsi obtenu, appelé pMAH14-Nter-Bam-TgPP2C-GFP, a été digéré avec l'enzyme BamH1. Le fragment correspondant à la partie C-terminale de la TgPP2C a été éliminé, puis le vecteur a été religué (Figure 31).

C. <u>Transfection des parasites</u>

Pour chaque transfection, 2.10^7 tachyzoïtes issus de cultures de HFF « fraîchement » et complètement lysées ont été utilisés. Après récolte, les parasites ont été lavés deux fois en tampon Cytomix (150 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,6, 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂) et repris dans 800 µl de tampon Cytomix complet (tampon Cytomix complémenté en 2 mM Na₂ATP, 5 mM Glutathion).

150 μ g d'ADN ont été utilisés pour chaque transfection. L'ADN a été précipité en 0,3 M acétate de sodium et 2,5 volumes d'éthanol à -80°C. Il a été lavé deux fois en éthanol 70% (v/v), séché et repris dans 100 μ l de tampon Cytomix complet. L'ADN a ensuite été ajouté aux parasites.

Le tout a été transféré dans des cuvettes d'électroporation de 4 mm d'épaisseur (Eurogentec) et électroporé (2000 V, 50 μ F, 25 Ω). Les tachyzoïtes ont été laissés à température ambiante pendant 10 min puis ajoutés à 1,1 mL de DMEM 10% SVF. Ils sont ensuite incubés ou non pendant 5 h à 37°C 5% CO₂ et déposés sur cellules HeLa, adhérant sur lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine. Le lendemain, les cellules ont été lavées en PBS et fixées en PBS 4% paraformaldéhyde (PFA) à différents temps après l'invasion.

D. Marquage des tachyzoïtes par immunofluorescence

Les cellules parasitées et fixées ont été perméabilisées 5 min en PBS 0,5% (v/v) Triton X-100. Après plusieurs lavages en PBS, elles ont été saturées en PBS 2% (m/v) BSA pendant 15 min. Afin de détecter les différentes formes de TgPP2C, elles ont ensuite été incubées pendant 1 h soit avec un anticorps anti-HA (1/750) soit avec un anticorps anti-TgPP2C (1/300), suivi d'un second anticorps anti-souris (pour l'anti-HA) ou anti-lapin (pour l'anti-TgPP2C) couplé à un Alexa Fluor 488 ou 594 selon les cas (1/1500) pendant 1 h. Le noyau des parasites et des cellules a ensuite été marqué soit à l'aide d'anticorps anti-histone acétylée (H4, 1/500, 1 h) suivis d'anticorps secondaires anti-lapin couplés à un Alexa Fluor 594 (1/1500, 1 h), soit au DAPI (20 μ g/ml, 15 min). Les lamelles ont ensuite été montées au Mowiol et observées en microscopie à fluorescence (Axiovert, Zeiss). Les images ont été

acquises avec une caméra Cool SNAP HQ (Photometrics) et leur analyse réalisée avec le logiciel Metaview (Universal Imaging Incorporation).



<u>Figure 32</u> : Les tachyzoïtes surexprimant la TgPP2C possédant un domaine catalytique actif ne se multiplient pas normalement dans la vacuole parasitophore

Les tachyzoïtes ont été transfectés avec les vecteurs (A) pMAH14-TgPP2C-HA-FLAG, (B) pMAH14-TgPP2C D273A-HA-FLAG, (C) pMAH14-TgPP2C D67A-HA-FLAG ou (D) pMAH14-TgPP2C\DeltaNter-HA-FLAG avant d'être mis au contact de cellules HeLa. Les cellules ont été fixées 30 h après l'invasion et marquées avec un anticorps anti-HA (vert) puis avec un anticorps anti-H4 ou au DAPI (rouge).

III-<u>Résultats</u>

A. La surexpression de la TgPP2C dans les tachyzoïtes bloque leur division

Pour étudier le rôle de la TgPP2C dans le développement des tachyzoïtes, nous avons construit des parasites surexprimant l'enzyme sous différentes formes. Ces parasites transfectés ont ensuite été utilisés pour des tests d'invasion sur cellules de mammifère et leur développement dans la cellule hôte a été examiné.

1-La surexpression de la TgPP2C active provoque un défaut de développement des parasites

Les tachyzoïtes ont été électroporés avec trois constructions, codant pour trois formes différentes de la TgPP2C : pMAH14-TgPP2C, qui code pour la forme active de la TgPP2C, pMAH14-TgPP2C D273A, qui code pour une forme mutée sur un acide aspartique décrit comme essentiel pour l'activité catalytique des PP2C (Kusuda *et al.*, 1998), et pMAH14-TgPP2C D67A, qui correspond également à une forme inactive de la TgPP2C. Ils ont ensuite été mis en contact avec des cellules HeLa et leur phénotype a été observé par immunofluorescence 30 h après l'invasion.

Le même phénotype que celui obtenu avec la TgPP2C-GFP a été observé : lorsque les tachyzoïtes surexpriment la TgPP2C-HA-FLAG sauvage, ils ne se développent pas normalement. Ainsi, 30 h après l'invasion, alors que les tachyzoïtes non transfectés se sont déjà répliqués trois à quatre fois, et apparaissent sous la forme de rosettes caractéristiques, la majorité (77%) des parasites surexprimant la TgPP2C sauvage sont seuls ou à deux dans la vacuole parasitophore (Figures 32A et 33). De plus, ils présentent dans la plupart des cas une forme anormale. Lorsque les cellules sont fixées à des temps encore plus tardifs, 35 ou 40 h après l'invasion, cette dégénérescence est encore plus visible.

Au contraire, les tachyzoïtes surexprimant la TgPP2C mutée au niveau de l'acide aspartique 273 et inactive forment des rosettes caractéristiques (Figure 32B). Cependant, un nombre faible de tachyzoïtes surexprimant cette forme inactive de TgPP2C présente un retard de développement similaire à celui observé avec la TgPP2C sauvage (24%, 30 h après transfection). A des temps plus tardifs, cette sous-population de parasites finit eux aussi par dégénérer. Le nombre de parasites présentant un tel retard de développement est cependant



<u>Figure 33</u> : Graphique indiquant le pourcentage de tachyzoïtes présentant un défaut de réplication pour chaque type de transfection

Les tachyzoïtes ont été transfectés avec les constructions pMAH14-TgPP2C-HA-FLAG (TgPP2C WT), pMAH14-TgPP2C D273A-HA-FLAG (TgPP2C-D273A) ou pMAH14-TgPP2C\DeltaNter-HA-FLAG (TgPP2C-dNter) avant d'être mis au contact de cellules HeLa. 30 h après l'invasion, les cellules ont été fixées et les parasites marqués avec des anticorps anti-HA. Le pourcentage du nombre de vacuoles parasitophores ne possédant qu'un parasite transfecté sur le nombre total de vacuoles parasitophores contenant des parasites transfectés est représenté pour chaque type de transfection comme une moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. * : La différence de pourcentage par rapport à la transfection sauvage est statistiquement significative.



Figure 34 : Les parasites surexprimant la TgPP2C possèdent un noyau aberrant

Les tachyzoïtes ont été transfectés avec la construction pMAH14-TgPP2C-GFP avant d'être mis au contact de cellules HeLa. Les cellules ont été fixées 35 h après l'invasion. Elles ont été marquées avec des anticorps anti-IMC (rouge) et au DAPI (bleu). La TgPP2C-GFP a été observée directement *via* la fluorescence de la GFP (vert).

Les flèches indiquent les parasites transfectés surexprimant la TgPP2C-GFP.

significativement plus faible que celui obtenu avec la TgPP2C sauvage (Figure 33).

Un phénotype similaire est observé avec l'autre forme mutée de TgPP2C, contenant une alanine à la place de l'acide aspartique 67 : les parasites se développent normalement et 30 h après invasion, des rosettes normales sont visibles dans les cellules (Figure 32C).

Ces résultats confirment donc qu'un excès de TgPP2C active dans les tachyzoïtes perturbe leur multiplication, et conduit à leur mort. L'activité accrue de la phosphatase et non pas la présence en excès de la molécule est responsable du défaut de développement observé puisque les tachyzoïtes exprimant les formes inactives ne présentent pas de défauts similaires.

2-Les parasites surexprimant la TgPP2C possèdent un noyau aberrant

Afin de préciser ces défauts de développement, nous avons analysé le phénotype des parasites à l'aide de différents marqueurs.

En premier lieu, les parasites ont été marqués avec un anti-IMC, ce qui permet d'observer le stade de l'endodyogénie auquel ils se trouvent. Un co-marquage au DAPI permet de détecter le noyau. Selon les cas, les parasites sont visualisés soit directement par la GFP, lorsqu'ils surexpriment la TgPP2C-GFP, soit indirectement avec un anti-HA. Ces marquages montrent que les parasites surexprimant la TgPP2C active possèdent un noyau géant et aberrant et positif pour la phosphatase (Figure 34). Il semble parfois être en deux parties reliées par un pont, contenant de l'ADN. De plus, ces parasites possèdent souvent un IMC anormal voire inexistant, par rapport aux parasites non transfectés.

Ces résultats confirment donc que la TgPP2C a un impact sur l'endodyogénie du parasite, en particulier sur l'étape de division nucléaire. La forte intensité des noyaux observée au DAPI indique que l'ADN a été répliqué, mais il est probable que la séparation du noyau en deux ait été bloquée, empêchant le parasite de terminer sa division.

3-La TgPP2C endogène est localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme du parasite

Afin d'analyser les relations entre la TgPP2C et la division nucléaire, nous avons d'abord étudié la localisation subcellulaire de la TgPP2C endogène. Pour ce faire, nous avons utilisé une lignée de tachyzoïtes exprimant de façon stable une histone déacétylase (HDAC4) tagguée HA (rouge) et localisée spécifiquement dans le cytoplasme (collaboration M. A Hakimi, Grenoble, France). Cette localisation exclusivement cytoplasmique a été confirmée en marquant ces parasites avec un anti-H4 acétylé (vert) qui permet de détecter le noyau.



<u>Figure 35</u> : La TgPP2C endogène est localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme des tachyzoïtes

Des tachyzoïtes exprimant stablement l'histone déacétylase HDAC4 en fusion avec le tag HA ont été mis en contact de cellules HeLa et fixés plusieurs heures après l'invasion.

- A) Les tachyzoïtes ont été marqués avec des anticorps anti-HA (rouge) qui reconnaissent HDAC4-HA puis avec des anticorps anti-H4 (vert) spécifiques des histones H4.
- **B)** Les tachyzoïtes ont été marqués avec des anticorps anti-HA (rouge) qui reconnaissent HDAC4-HA puis avec des anticorps anti-TgPP2C (vert) spécifiques de la TgPP2C endogène.

La localisation endogène de la TgPP2C a été mise en évidence dans cette lignée *via* un anti-TgPP2C (vert) qui détecte la TgPP2C de *T. gondii*. La TgPP2C colocalise avec l'anti-HA (rouge + vert = jaune), ce qui indique qu'elle est située dans le cytoplasme du parasite (Figure 35). Cependant, elle est aussi détectée dans le noyau, d'où le marquage anti-HA est totalement exclu (marquage uniquement vert).

La TgPP2C endogène du tachyzoïte est donc à la fois nucléaire et cytoplasmique lorsque le parasite est en position intracellulaire, dans sa vacuole parasitophore.

B. <u>La TgPP2C surexprimée est sécrétée dans la cellule hôte via son</u> <u>domaine N-terminal</u>

La surexpression de la TgPP2C dans le tachyzoïte a permis de mettre en évidence une autre propriété inattendue de la TgPP2C.

1-La TgPP2C est sécrétée dans la cellule hôte

Des tachyzoïtes ont été électroporés avec les constructions pMAH14-TgPP2C et pMAH14-TgPP2C D273A de la même manière que dans les expériences précédentes avant d'être déposés sur cellules HeLa. La culture infectée a été fixée et la TgPP2C détectée avec un anti-HA.

Nous avons détecté la présence d'un marquage HA dans la cellule hôte (Figure 36). Ce marquage n'est visible que dans les cellules possédant au moins un parasite transfecté surexprimant la TgPP2C : 57% des cellules contenant un parasite transfecté présentent ce marquage (Figure 37). Dans certains cas, la TgPP2C apparaît diffuse dans le cytoplasme de la cellule hôte, tandis que dans d'autres elle apparaît en amas, voire filamentaire. Etant donné qu'à des temps tardifs (35 h après invasion), les tachyzoïtes surexprimant la TgPP2C active sont souvent anormaux, vacuolés, nous nous sommes demandés si cette détection dans la cellule hôte était un artéfact de cette dégénérescence. Pour contourner ce problème, les mêmes marquages ont été réalisés mais à des temps beaucoup plus précoces après l'invasion.

Dès 12 h après l'invasion, nous avons détecté un marquage HA dans le cytoplasme des cellules hôtes (Figure 38). Ce marquage est systématiquement diffus et homogène. Il est aussi localisé parfois dans le noyau de la cellule hôte, même si le cas le plus courant est une localisation exclusivement cytoplasmique.


<u>Figure 36</u> : La TgPP2C est sécrétée par les tachyzoïtes dans la cellule hôte *via* son domaine N-terminal

Les tachyzoïtes ont été transfectés avec différentes constructions et mis au contact de cellules HeLa. A différents temps après l'invasion, les cellules ont été fixées et marquées avec des anticorps anti-HA.

- A) Transfection avec pMAH14-TgPP2C-HA-FLAG (1-2) 27 h après l'invasion, (3) 35 h après l'invasion
- B) Transfection avec pMAH14-TgPP2C D273A-HA-FLAG (1-2) 35 h après l'invasion
- C) Transfection avec pMAH14-TgPP2CANter-HA-FLAG (1-2) 35 h après l'invasion



<u>Figure 37</u> : Graphique indiquant le pourcentage de cellules infectées dans lesquelles la TgPP2C-HA est détectée

Les tachyzoïtes ont été transfectés avec les constructions pMAH14-TgPP2C-HA-FLAG (TgPP2C WT), pMAH14-TgPP2C D273A-HA-FLAG (TgPP2C-D273A) ou pMAH14-TgPP2C Δ Nter-HA-FLAG (TgPP2C-dNter) avant d'être mis au contact de cellules HeLa. 35 h après l'invasion, les cellules ont été fixées et les parasites transfectés marqués avec des anticorps anti-HA. Le pourcentage du nombre de cellules, envahies par un ou plusieurs tachyzoïtes transfectés, dans lesquelles de la TgPP2C est détectée sur le nombre total de cellules envahies par un ou plusieurs tachyzoïtes transfectés est représenté pour chaque type de transfection comme une moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. * : La différence de pourcentage par rapport à la transfection sauvage est statistiquement significative à 5%. ** : La différence de pourcentage par rapport à la transfection sauvage est statistiquement significative à 1%.



Figure 38 : La TgPP2C est sécrétée par les tachyzoïtes dans la cellule hôte dès 12 h après l'invasion

Les tachyzoïtes ont été transfectés avec pMAH14-TgPP2C-HA-FLAG et mis au contact de cellules HeLa. A différents temps après l'invasion, les cellules ont été fixées et marquées avec des anticorps anti-HA.

- A) Observation de la sécrétion 12 h après l'invasion
- B) (1-2) Observation de la sécrétion 14 h après l'invasion
- C) Observation de la sécrétion 17 h après l'invasion
- D) (1-2) Observation de la sécrétion 20 h après l'invasion

La TgPP2C D273A inactive est détectée dans la cellule hôte mais seulement pour 28% des cellules contenant des parasites transfectés (Figures 36B-37).

En conclusion, ces résultats suggèrent que la TgPP2C parasitaire est sécrétée dans la cellule hôte lorsque qu'elle est surexprimée dans le tachyzoïte.

2-La TgPP2C n'est pas sécrétée si le domaine N-terminal est tronqué

La TgPP2C parasitaire n'étant pas localisée dans un des organites de sécrétion et ne possédant pas de peptide signal, nous nous sommes demandés par quelle voie elle était sécrétée dans la cellule hôte. Etant donné qu'elle a la particularité, par rapport aux autres PP2C eucaryotes, de posséder un domaine N-terminal atypique de 18 acides aminés, nous avons étudié un rôle éventuel de ce domaine dans la sécrétion.

Pour ce faire, les tachyzoïtes ont été transfectés avec une construction codant pour la TgPP2C sans son domaine N-terminal (TgPP2C Δ Nter), puis ils ont été mis au contact de cellules HeLa. Après un essai d'invasion (35 h après invasion), les cellules ont été fixées avant d'être marqués comme précédemment en vue d'une analyse en immunofluorescence.

Nous avons tout d'abord observé que les parasites surexprimant la TgPP2C Δ Nter présentent un défaut de développement, comme ceux surexprimant la TgPP2C sauvage (Figure 32C). Ce phénotype est même plus marqué que dans le cas du sauvage puisque 92% des tachyzoïtes transfectés ne se développent pas contre 77% pour les sauvages (Figure 33). Cette différence n'est cependant pas significative.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la présence d'un marquage HA dans les cellules hôtes. De manière reproductible, la TgPP2C Δ Nter n'est pas détectée dans les cellules hôtes, suggérant un rôle du domaine N-terminal dans la propriété de sécrétion associée à TgPP2C (Figure 36C). En effet, 1% des cellules contenant un parasite surexprimant la TgPP2C Δ Nter présentent un marquage HA dans leur cytoplasme (Figure 37). Les seuls cas observés correspondent d'ailleurs à des marquages très faibles.

3-Le domaine N-terminal suffit à faire sécréter une protéine exogène

Suite à ces résultats, nous nous sommes demandés si le domaine N-terminal de la TgPP2C était suffisant pour induire la sécrétion de n'importe quelle protéine.



<u>Figure 39</u> : Le domaine N-terminal de la TgPP2C induit la sécrétion de la protéine avec laquelle il est en fusion

Les tachyzoïtes ont été transfectés avec différentes constructions et mis au contact de cellules. 35 h après l'invasion, les cellules ont été fixées et marquées avec des anticorps anti-HA ou la GFP a été visualisée directement.

- A) Transfection avec pMAH14-GFP-HA-FLAG
- B) Transfection avec pMAH14-Nter-GFP-HA-FLAG
- C) Transfection avec pMAH14-GST-HA-FLAG
- D) (1-2) Transfection avec pMAH14-Nter-GST-HA-FLAG

Pour répondre à cette question, nous avons construit des protéines chimères contenant le domaine N-terminal de la TgPP2C en amont de leur propre séquence. Ces chimères ont été réalisées sur plusieurs types de protéines : GFP-HA-FLAG, GST-HA-FLAG et le tag HA-FLAG seul. Les tachyzoïtes ont ensuite été transfectés avec ces différentes constructions, mis au contact des cellules comme dans le cas des essais précédents, fixés et marqués avec un anti-HA. Nous avons ensuite recherché un marquage dans les cellules envahies par des parasites exprimant soit les protéines parentales sans le domaine N-terminal de la TgPP2C, soit les protéines chimères.

Pour toutes les chimères construites, un marquage a été détecté dans la cellule hôte, mais d'intensité variable (Figure 39). Pour la protéine Nter-HA-FLAG, bien que nous ayons pu mettre en évidence un marquage dans la cellule hôte, nous n'avons pas pu tirer de conclusion, dans la mesure où le tag HA-FLAG seul, contrôle, n'a jamais été détecté dans les parasites transfectés.

Les résultats obtenus indiquent donc que le domaine N-terminal de la TgPP2C est suffisant pour entraîner la sécrétion d'une protéine. Ils restent cependant à confirmer, en particulier en évaluant plus précisément le nombre d'événements de sécrétion.

IV-Discussion

La surexpression de la TgPP2C dans les tachyzoïtes a permis de mettre en évidence deux particularités fonctionnelles de cette phosphatase : elle semble être impliquée dans la multiplication et la survie du parasite mais une partie pourrait être sécrétée dans la cellule hôte.

A. La TgPP2C semble impliquée dans la multiplication du parasite

Nos expériences ont montré que lorsqu'un parasite surexprime la TgPP2C active, il présente un défaut de développement et finit par dégénérer. Ce défaut de développement semble être lié à un défaut de division nucléaire. En effet, les parasites transfectés possèdent un noyau géant, aberrant, souvent en deux parties reliées l'une à l'autre. De plus, les IMC de ces parasites sont eux aussi anormaux voire inexistants. Il est dès lors possible que la TgPP2C ait un rôle fondamental lors de l'endodyogénie. Etant donné que le marquage DAPI de ces noyaux est très prononcé, il est probable que l'ADN des parasites ait été correctement dupliqué. Il semblerait que le problème de division se situe lors de l'allongement et de la séparation en deux du noyau. Cette division nucléaire est très différente de celle observée dans les cellules de mammifère. En effet, la membrane nucléaire du tachyzoïte ne se désorganise pas au moment de la mitose. Deux explications peuvent être envisagées pour le phénotype observé : 1) l'excès de TgPP2C entraîne un démarrage trop précoce de la division nucléaire, alors que la réplication de l'ADN n'est pas complètement achevée et que les deux chromatides et donc la division du noyau.

Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier précisément le contenu en ADN des parasites transfectés, afin d'identifier la phase du cycle cellulaire à laquelle ils sont restés bloqués. Nous avons tenté de déterminer cette quantité d'ADN par cytofluorométrie en mesurant l'intensité de fluorescence en iodure de propidium incorporé dans ces parasites. Cependant, nous nous sommes heurtés à plusieurs difficultés. Tout d'abord, les parasites ne se multipliant qu'à l'intérieur de leur cellule hôte, il est nécessaire de les extraire des cellules tout en les gardant intact mais en s'abrogeant de tout débris cellulaire. D'autre part, bien que facilement manipulables, les tachyzoïtes se transfectent avec un taux relativement faible. De plus, la TgPP2C bloquant leur division, la proportion de parasites transfectés a tendance à diminuer avec le temps, biaisant les résultats obtenus en cytométrie de flux. De nombreuses

mises au point sont donc encore à réaliser au laboratoire afin de déterminer précisément le stade auquel les parasites sont bloqués au cours de leur développement.

Les résultats que nous avons obtenus en immunofluorescence laissent cependant penser que les parasites seraient bloqués pendant leur phase G₂/M. Un tel phénotype pourrait être mis en relation avec les études réalisés sur une cycline-dépendante kinase (Cdk) de T. gondii (TPK2). Les Cdk font partie de la famille des sérine-thréonine kinases et contrôlent les transitions majeures du cycle cellulaire eucaryote. Leur activité est régulée par association avec des cyclines, des inhibiteurs de Cdk et des événements de déphosphorylation. Khan et al. ont examiné les conséquences phénotypiques d'une inactivation de TPK2 dans la réplication du parasite. Une analyse en cytofluorométrie du contenu nucléaire de parasites surexprimant la forme mutante dominant négatif a montré une accumulation des cellules en phase S, par rapport à des parasites surexprimant la forme sauvage de l'enzyme (Khan et al., 2002). Il semble cependant que cette forme mutée agisse en différents points du cycle dans la mesure où il n'a pas été observé de blocage synchronisé dans le cycle cellulaire des parasites transfectés. L'activité de TPK2 étant régulée en partie par des phosphorylations, il est possible que les arrêts de réplication du parasite observés à la fois dans nos expériences et par Khan et al. soient provoqués par un même mécanisme faisant intervenir à la fois TgPP2C et TPK2. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente que d'autres PP2C ont été impliquées dans la régulation de Cdks, que ce soit chez le Xénope (De Smedt et al., 2002) ou chez S. cerevisiae (Cheng et al., 1999).

Une autre hypothèse sur le rôle de la TgPP2C dans le cycle du parasite peut être émise si on se réfère à ce qui est connu de la PP2C de *P. falciparum*. En effet, il a été démontré que PfPP2C déphosphorylait *in vitro* le facteur d'élongation PfEF-1β, diminuant ainsi son activité d'échange de nucléotide exercée par l'intermédiaire de la PKC (Mamoun et Goldberg, 2001). Or les composants du complexe EF-1 participent à des processus autres que le contrôle de la synthèse protéique. En particulier, ils ont été impliqués dans la réplication de l'ADN chez le protozoaire cilié *Tetrahymena* (Numata, 1996). Il est donc possible qu'un des orthologues de PfPP2C dans *T. gondii* régule aussi un facteur d'élongation.

Parmi les autres cibles de PfPP2C identifiées en Far Western se trouve la sous-unité β de l'ARN polymérase II (Mamoun et Goldberg, 2001). Cette cible potentielle est d'autant plus intéressante qu'elle est directement liée à la réplication du parasite. Or, des travaux réalisés en collaboration avec M. A. Hakimi ont montré que la TgPP2C pouvait être purifiée en complexe avec une ARN polymérase de *T. gondii*. Des interactions comparables ont déjà été

montrées dans d'autres systèmes. En effet, les PP2C ont été impliquées dans la déphosphorylation des CTD des ARN polymérases.

B. <u>La TgPP2C est sécrétée dans la cellule hôte</u>

Un des aspects les plus singuliers de la TgPP2C est sa sécrétion dans la cellule hôte. Cette sécrétion est d'autant plus surprenante que la TgPP2C ne possède pas de peptide signal connu et n'est pas localisée spécifiquement dans des organites de sécrétion. Cette sécrétion semble uniquement due à la présence du domaine N-terminal de 18 acides aminés de la TgPP2C. Ce domaine contient deux sites de phosphorylation potentiels : un site de phosphorylation par une PKA et un site de phosphorylation par une CK2. Des expériences futures permettront d'évaluer l'importance de la phosphorylation potentielle de ces sites. Il faudra évaluer s'ils confèrent à l'enzyme une activité particulière ou son inactivité, voire une propriété d'attachement à des partenaires, ces derniers pouvant intervenir dans le processus de sécrétion.

En effet, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer le rôle du domaine N-terminal dans la sécrétion de la TgPP2C. Il pourrait par exemple se lier à une protéine chaperonne portant un peptide signal et qui serait donc sécrétée dans la cellule hôte, emmenant avec elle la TgPP2C. Cette hypothèse pourra être vérifiée en incubant des extraits parasitaires sur une colonne portant le domaine N-terminal immobilisé et en identifiant les protéines interagissant spécifiquement avec ce domaine N-terminal.

La TgPP2C est une des premières enzymes parasitaires à avoir été identifiée comme étant sécrétée dans la cellule hôte. Récemment, il a été démontré qu'une autre PP2C de *T. gondii*, PP2C-hn, était sécrétée dans le noyau de la cellule hôte (Gilbert *et al.*, 2007). PP2C-hn est localisée dans les rhoptries du parasite et possède un peptide signal, ce qui explique sa sécrétion. En revanche, son activité phosphatase, au moins *in vitro*, est faible et une caractérisation de son activité *in vivo*, comme l'identification de substrats, reste à mener.

D'autres enzymes parasitaires sont sécrétées dans la cellule hôte. En particulier, la kinase ROP16 est sécrétée, *via* les rhoptries, dans la cellule hôte où elle affecte l'activation des voies de signalisation de transduction du signal et d'activateur de transcription STAT (Saeij *et al.*, 2007). Il est clair que *T. gondii* sécrète des protéines capables de modifier l'expression des gènes hôtes. Il est donc probable que d'autres protéines soient sécrétées par le parasite afin de détourner des protéines hôtes de leur fonction. C'est pourquoi, il est

particulièrement intéressant de rechercher le rôle de la TgPP2C dans la cellule hôte et d'y identifier d'éventuels partenaires et/ou substrats. Il est probable que la TgPP2C endogène ne soit que sécrétée qu'à des niveaux faibles dans la cellule hôte et que son intervention soit particulièrement régulée dans le temps et dans l'espace. Nous n'avons d'ailleurs jamais détecté de TgPP2C endogène dans la cellule, en partie en raison d'une réaction croisée de notre anticorps anti-TgPP2C avec les PP2C de mammifère mais les données n'indiquent pas une surabondance du signal dans les cellules infectées.

Enfin, des études très récentes ont montré que ROP18, comme ROP16, une autre kinase localisée dans les rhoptries et sécrétée, sont des facteurs clés de virulence, dans la mesure où il s'agit de protéines hypervariables, dont l'activité est spécifique de certaines souches de *T. gondii* (Saeij *et al.*, 2006). La souche *T. gondii* que nous utilisons au laboratoire est la souche RH, particulièrement virulente. Il serait dès lors intéressant d'étudier d'autres lignées parasitaires, de comparer d'éventuelles différences de séquence dans le gène codant pour la TgPP2C et d'analyser les différences de sécrétion de cette phosphatase.

CHAPITRE 3

CHAPITRE III

ETUDE DU ROLE DE LA TGPP2C DANS LA CELLULE INFECTEE Recherche de substrats/partenaires hotes

I-Introduction

Nous avons mis en évidence que les tachyzoïtes expriment une sérine-thréonine phosphatase de type 2C, localisée à la fois dans leur noyau et leur cytoplasme, et probablement impliquée dans leur multiplication. Bien qu'elle ne soit pas localisée dans un des organites de sécrétion, et qu'elle ne possède pas de peptide signal connu, une sous-population est sécrétée dans la cellule hôte.

Du fait de cette sécrétion, il devient pertinent de poser l'hypothèse que cette phosphatase agisse sur certaines protéines phosphorylées de la cellule hôte, et qu'elle permette ainsi au parasite de détourner à son avantage certaines régulations par phosphorylation.

A. <u>T. gondii agit directement sur certaines voies de signalisation de sa</u> <u>cellule hôte</u>

Ayant sélectionné un mode de vie intracellulaire, *T. gondii* détourne à son profit un certain nombre de caractéristiques de sa cellule hôte. Ainsi, la présence de tachyzoïtes dans une cellule entraîne une redistribution des mitochondries et du réticulum endoplasmique hôte autour de la vacuole parasitophore (de Melo *et al.*, 1992). D'autre part, les cellules infectées par des tachyzoïtes de *T. gondii* produisent en conséquence des cytokines pro-inflammatoires (Brenier-Pinchart *et al.*, 2001) et sont protégées contre des stimuli induisant l'apoptose (Carmen *et al.*, 2006).

Afin de préciser la manière dont le tachyzoïte agit sur ces voies de signalisation, des études de profil comparé d'expression génique ont été effectuées sur des cellules infectées ou non. Il a ainsi été montré que très rapidement après l'infection, environ 1% des gènes présentent un changement significatif dans l'abondance de leurs transcrits (Blader *et al.*, 2001). Plus précisément, 63 gènes connus sont activés dont 43% sont liés à la réponse immunitaire. Ainsi les gènes codant les chimiokines GRO1, GRO2, LIF et MOP1, ou les

cytokines IL-1 β et IL-6 sont stimulés. D'autre part, des gènes hôtes nécessaires à la croissance du parasite sont également activés. Ainsi deux voies métaboliques, la glycolyse et la biosynthèse du cholestérol, sont transcriptionnellement et spécifiquement stimulées dans les cellules infectées. Enfin, les voies de signalisation qui seraient activées par le tachyzoïte pour la régulation génique de l'hôte ont été recherchées. Une voie candidate implique la famille des facteurs de transcription NF- κ B qui sont en effet précocément activés dans les cellules infectées. Cette activation mène à la stimulation de la transcription dépendante de NF- κ B de nombreux gènes hôtes identifiés dans cette étude (Blader *et al.*, 2001).

Des études plus récentes viennent de plus de démontrer un rôle essentiel des sérinethréonine kinases et phosphatases sécrétées par le parasite dans la manipulation de certaines propriétés fonctionnelles de la cellule hôte.

B. <u>Des sérine-thréonine kinases et phosphatases parasitaires sécrétées</u> agissent sur la cellule hôte

Deux sérine-thréonine kinases parasitaires ont été récemment impliquées dans la virulence de *T. gondii* par leurs activités sur la cellule hôte. Ce sont toutes les deux des protéines de rhoptries. Elles sont sécrétées pendant le processus d'invasion.

L'une, ROP16, est détectée très rapidement après l'invasion dans le noyau de la cellule hôte (Saeij *et al.*, 2006). Il a été démontré par l'utilisation des différents allèles de ROP16 existant dans les lignées de *T. gondii* que cette sérine-thréonine kinase régule l'activation des facteurs de transcription STAT3 et STAT6 observée dans les cellules infectées. Il est cependant peu probable que ROP16 phosphoryle directement STAT3 et STAT6. Elle agit sans doute plutôt dans la voie de signalisation pour mener ou maintenir cette activation (Saeij *et al.*, 2006).

L'autre, ROP18, est sécrétée dans la vacuole parasitophore et associée à la PVM. ROP18 phosphoryle une protéine parasitaire de 70 kDa non identifée, mais sa surexpression dans les tachyzoïtes stimule leur multiplication (El Hajj *et al.*, 2007).

Enfin, une sérine-thréonine phosphatase de type 2C a été identifiée dans les rhoptries et localisée dans le noyau de la cellule hôte après infection (Gilbert *et al.*, 2007), mais sans démonstration convaincante. Cette détection dans le noyau est très précoce après l'infection (15 à 30 min) et le signal diminue au cours du temps. Cette PP2C appelée PP2C-hn est une protéine de 47 kDa qui possède un peptide signal, en accord avec sa localisation dans les rhoptries, ainsi qu'un NLS compatible avec son adressage au noyau de la cellule hôte.

Cependant, PP2C-hn présente une activité phosphatase spécifique très faible et des acides aminés critiques manquants, et il sera nécessaire d'évaluer son activité dans la cellule hôte, en particulier en caractérisant ses substrats.

Ces trois études récentes mettent donc en lumière un rôle potentiel pour les sérinethréonine kinases et phosphatases sur les cellules infectées, bien qu'aucune cible ou partenaire direct hôte n'ait été identifié jusqu'à présent.

C. Objectifs et démarche expérimentale

Nous nous sommes donc intéressé au rôle de la TgPP2C dans la cellule hôte. Pour ce faire, nous avons utilisé deux stratégies principales complémentaires.

Du fait de la faible sécrétion observée après surexpression dans les tachyzoïtes, la première approche choisie a été d'exprimer la TgPP2C de manière ectopique dans des cellules de mammifère afin d'y étudier son effet. Bien que sans doute biaisé par la grande quantité de protéine exprimée de cette manière, le phénotype observé pourrait suggérer des molécules ou des processus cibles de la phosphatase.

La deuxième stratégie adoptée a été la recherche de partenaires par un crible double hybride sur de l'ADN complémentaire de cellules de mammifère. En effet, identifier des substrats serait une étape clé dans la compréhension du rôle de la sécrétion de cette enzyme.

II-Matériel et méthodes

A. Expression hétérologue de la TgPP2C

1-Clonage des vecteurs d'expression de la TgPP2C sauvage et mutée dans les cellules de mammifère

Trois constructions principales ont été produites afin d'exprimer la TgPP2C, sauvage ou mutée, en système hétérologue.

Le plasmide TgPP2C-GFP a été construit à partir de la construction TgPP2C-RFP déjà existante au laboratoire, dans le vecteur pEGFP-N1 (Clontech). L'insert TgPP2C a été purifié à partir de TgPP2C-RFP par digestion enzymatique par Xho1 et EcoR1 et introduit par ligation dans le multi-site de clonage de pEGFP-N1 digéré par ces mêmes enzymes.

Le vecteur TgPP2C-stop-GFP a été obtenu en insérant le fragment TgPP2C provenant du vecteur GFP-TgPP2C-stop, cloné au laboratoire, dans le multi-site de clonage du plasmide pEGFP-N1 entre les sites Xho1 et EcoR1.

La construction TgPP2C D273A-stop-GFP a été obtenue par mutagenèse dirigée à partir du vecteur TgPP2C-stop-GFP. L'amorce sens était 5'-GATTCTCGCGACTG<u>C</u>TGGCTTGTGGGACGTCG-3' et l'amorce antisens était 5'-CGACGTCCCACAAGCCA<u>G</u>CAGTCGCGAGAATC-3' (mutation soulignée).

Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage avant utilisation en transfection.

2-Transfection de cellules de mammifère

Les cellules HeLa à confluence ont été cultivées en DMEM 0,2% SVF pendant 24 h afin de les synchroniser. Elles ont ensuite été récoltées après traitement à la trypsine et remises en culture dans des boites de 6 cm de diamètre à une concentration de 2.10^5 cellules par boîte, ce qui amène à une confluence de 60-70% le lendemain (37°C, 6% CO₂).

Les cellules ont été transfectées soit par la méthode de précipitation au calciumphosphate, soit avec du FuGene (Roche).

Pour la méthode de précipitation au calcium-phosphate, 6 µg d'ADN (ou rien en contrôle) ont été mis en présence de 250 mM CaCl₂ pendant 30 min à température ambiante. Le mélange a ensuite été ajouté à un volume de tampon HBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES pH 7) et incubé 30 min. Il a été déposé

goutte à goutte sur les cellules et laissé 6 à 8 h avant que les cellules n'aient été rincées et mises en présence de DMEM 10% SVF.

Pour la méthode FuGene, les cellules ont été transfectées avec 3 à 5 μ g d'ADN en suivant les protocoles du fabricant. 8 à 15 h après la transfection, elles ont été rincées et incubées en DMEM 10% SVF.

En contrôle, les cellules ont également été transfectées avec un plasmide codant pour la protéine de fusion GFP-FEM-2. FEM-2 est une PP2C de *C. elegans* pour laquelle il a été montré que l'expression ectopique dans les cellules de mammifère induisait la mort par apoptose (Tan *et al.*, 2001).

B. Analyse par cytométrie en flux des cellules transfectées

1-Calibrage du cycle cellulaire des cellules de mammifère

Des cellules HeLa $(2.10^5$ cellules par boite de 6 cm de diamètre) ont été incubées pendant 24 h en présence de 50 μ M fluorodésoxyuridine (FDU) ou 0,33 μ M nocodazole, ou pendant 24 h en absence de SVF. Elles ont ensuite été traitées comme décrit ci-dessous pour l'analyse du cycle cellulaire.

2-Marquage de l'ADN à l'iodure propidium pour l'analyse du cycle cellulaire

Les cellules transfectées ont été récupérées 24 h après transfection afin d'étudier leur contenu en ADN. Elles ont été récoltés après traitement à la trypsine et lavées en DMEM 10% SVF, centrifugées (620 g, 10 min) et reprises dans 500 μ l PBS pour 5.10⁵ cellules. Elles ont ensuite été ajoutées goutte à goutte dans 2 ml d'éthanol absolu froid maintenu en agitation. Le mélange a été incubé pendant au moins 2 h à -20°C afin de fixer les cellules et de les perméabiliser.

Après centrifugation (620 g, 5 min), elles ont été réhydratées pendant 15 min à température ambiante en PBS. Après une nouvelle centrifugation, elles ont été reprises en tampon de marquage à l'iodure de propidium (100 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,1% NP-40) et marquées avec 1 µg d'iodure de propidium pendant 5 min à température ambiante.

Les cellules ont ensuite été immédiatement analysées en cytométrie en flux sur la base de leur fluorescence en iodure de propidium. Les résultats ont été acquis sur un cytomètre FACS EPIC Coulter puis analysés à l'aide du logiciel WinMDI.

3-Marquage des cellules à l'annexine V pour l'analyse de l'apoptose

Les cellules transfectées ont été analysées pour leur expression de marqueurs apoptotiques 24 h et 38 h après transfection. Le milieu de culture et le tampon de lavage des cellules ont été récupérés afin de récolter les cellules mortes non adhérentes. Les cellules adhérentes ont été récupérées après traitement à la trypsine et les deux populations ont été regroupées puis centrifugées (620 g, 10 min).

Le culot a été repris dans 100 µl de tampon de liaison à l'annexine (10 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) et incubé avec 5 µl d'annexine V pendant 15 min à température ambiante à l'obscurité. 400 µl de tampon de liaison à l'annexine ont ensuite été ajoutés et les cellules ont été conservées dans la glace jusqu'au passage en cytométrie en flux afin que les processus d'apoptose induits par les traitements soient ralentis. Elles ont alors été analysées sur la base de la fluorescence associée à l'annexine V- FITC. Les résultats ont été acquis sur un cytomètre FACS EPIC Coulter puis analysés à l'aide du logiciel WinMDI.

Les cellules transfectées ont également été marquées à l'iodure de propidium afin de déterminer le pourcentage de cellules nécrotiques. Elles ont été récoltées et culottées puis reprises dans 100 μ l de tampon de liaison à l'annexine. Elles ont ensuite été incubées avec 0,5 μ l d'iodure de propidium pendant 5 min à température ambiante à l'obscurité. 400 μ l de tampon de liaison à l'annexine ont été ajoutés et les cellules ont été conservées dans la glace jusqu'au passage en cytométrie en flux. Elles ont alors été analysées sur la base de leur fluorescence en iodure de propidium.

C. <u>Analyse par immunofluorescence des cellules transfectées</u>

1-Marquage anti-tubuline des cellules transfectées

Les cellules HeLa ont été ensemencées sur lamelles de verre recouvertes de poly-Llysine afin d'être à 60% de confluence le lendemain. Elles ont ensuite été transfectées comme décrit plus haut. Les cellules ont été fixées à différents temps après la transfection en PBS 4% PFA pendant 10 min à température ambiante et lavées en PBS.

Les cellules ont été perméabilisées pendant 3 min en PBS 0,1% TX-100 et saturées pendant 15 min en PBS 2% BSA. Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps antitubuline α (1/250, 1 h) puis avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un Alexa Fluor 594 (1/1500, 1 h).

2-Marquage du noyau des cellules transfectées

Les cellules HeLa ont été ensemencées sur lamelles de verre recouvertes de poly-Llysine afin d'être à 60% de confluence le lendemain. Elles ont ensuite été transfectées comme décrit plus haut. Les cellules ont été fixées à différents temps après la transfection en PBS 4% PFA pendant 10 min à température ambiante et lavées en PBS.

Lorsque les cellules ont été transfectées avec une construction sans tag, elles ont été perméabilisées pendant 3 min en PBS 0,1% TX-100 et saturées pendant 15 min en PBS 2% BSA. Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps anti-TgPP2C (1/200, 1 h) puis avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à un Alexa Fluor 594 (1/1500, 1 h).

Pour détecter une condensation nucléaire, les cellules ont été incubées pendant 20 min avec du DAPI (20 µg/ml).

Les lamelles ont été montées au Mowiol et les cellules observées en microscopie à fluorescence (Axiovert, Zeiss). Les images ont été acquises avec une caméra Cool SNAP HQ (Photometrics) et analysées avec le logiciel Metaview (Universal Imaging Incorporation).

3-Marquage TUNEL des cellules transfectées

Le marquage TUNEL (terminal-transférase-mediated ddUTP-digoxigenin nick-end labelling) permet de mettre en évidence une fragmentation de l'ADN, signe indicateur d'une apoptose. Il est réalisé grâce au kit ApopTag (Serologicals Corporation).

La terminal-désoxynucléotidyle transférase (TdT) catalyse l'addition de nucléotides triphosphates aux extrémités 3'-OH de l'ADN fragmenté. Les nucléotides incorporés forment alors un oligomère composé de nucléotides marqués avec la digoxygénine, apportés dans le tampon de réaction, et de nucléotides non marqués, le tout selon une séquence aléatoire. Ces fragments d'ADN marqués avec les nucléotides-digoxygénine, sont ensuite reconnus par un anticorps secondaire anti-digoxygénine.

Des contrôles positifs ont été réalisés en traitant les cellules pendant 10 min à la DNase1 (0,1 µg/ml final, Sigma) diluée en tampon DNase (30 mM Tris HCl pH7,4, 4 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT).

Les lamelles ont été montées au Mowiol et les cellules observées en microscopie à fluorescence (Axiovert, Zeiss). Les images ont été acquises avec une caméra Cool SNAP HQ (Photometrics) et analysées avec le logiciel Metaview (Universal Imaging Incorporation).

D. <u>Crible double hybride</u>

Un crible double hybride en levure a été réalisé par la société Hybrigenics afin d'identifier des partenaires de la TgPP2C.

Le double hybride détecte, dans *S. cerevisiae,* l'interaction physique entre deux protéines A et P par l'activation d'un gène rapporteur. L'appât A est cloné en fusion avec un domaine de liaison reconnaissant une séquence spécifique de l'ADN promotrice du gène rapporteur. La proie P est clonée en fusion avec un domaine d'activation de la transcription. Les deux constructions hybrides appât-domaine de liaison et proie-domaine d'activation sont introduites dans deux levures haploïdes dont la conjugaison permet d'obtenir une levure diploïde exprimant les deux constructions. La transcription du gène rapporteur n'a lieu que si l'appât et la proie interagissent.

Dans le crible double hybride qui a été réalisé ici, le gène codant pour la TgPP2C a été utilisé comme appât. Une librairie d'ADN complémentaire de placenta a servi de proie. 80 millions d'interactions ont été testées par un double crible de sélection.

E. Purification des protéines recombinantes Spire

1-<u>Clonage des différentes formes de Spire en vue d'une expression</u> <u>bactérienne</u>

Les domaines WH2 de Spire1 et Spire2 ont été clonés dans le vecteur pGex6-p3 (GE Healthcare) afin de produire les protéines recombinantes en fusion avec la GST.

Le plasmide GST-Spire1WH2 a été construit à partir de la construction pcDNA3-myc-KIAAII35new h-Spir1 fourni par E. Kerkhoff (Wurzburg, Allemagne). Le domaine WH2 a été amplifié par PCR en utilisant l'amorce amont 5'-CGC<u>GGATCC</u>GACTGGGCACGATTCTGGGTAC-3' (site BamH1 souligné) et l'amorce aval 5'-CCG<u>CTCGAG</u>GCTGCTGCTGCTGGTCGAC-3' (site Xho1 souligné).

Le plasmide GST-Spire2WH2 a été construit à partir de la construction pGAD3S2XNS1 fourni par la société Hybrigenics, et correspondant au domaine interagissant avec la TgPP2C en double hybride. Le domaine WH2 a été amplifié par PCR en utilisant l'amorce amont 5'-CGC<u>GGATCC</u>ACAGACTGGGCCCGACTGTGG-3' (site BamH1 souligné) et l'amorce aval 5'-CCG<u>CTCGAG</u>TTATGGCCGACTGCAGGCCAGAG-3' (site Xho1 souligné).

Les deux produits de PCR, ainsi que le vecteur pGex6-p3, ont été digérés successivement par BamHI et Xho1 (Biolabs). Puis les séquences d'intérêt ont été insérées

dans le vecteur digéré par l'action de la ligase T4 (Biolabs) (30 min, température ambiante). Des bactéries *E. coli* XL1 Blue ont ensuite été transformées avec les produits de ligation. Les clones obtenus ont été vérifiés pour la présence et l'intégrité de l'insert par PCR sur colonie puis par séquençage de l'ADN plasmidique. Les constructions validées ont ensuite été transférées dans des bactéries *E. coli* BL21 en vue de l'expression des protéines recombinantes.

2-production et purification de la protéine recombinante GST-Spire1WH2

L'expression de la protéine recombinante GST-Spire1WH2 a été induite avec 0,1 mM IPTG pendant 2 h à 37°C. La protéine recombinante a ensuite été purifiée à partir de bactéries lysées dans du tampon de lyse (50 mM Tris pH 7,5, 100 mM KCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT) supplémenté en 0,5% (v/v) TX-100 et 0,5% (v/v) SB3-14. Après centrifugation à 20 000 g pendant 20 min à 4°C, le surnageant a été incubé avec de la Glutathion-Sépharose (GE Healthcare) pendant 2 h à température ambiante. Après lavages de la résine en tampon de lyse supplémenté en 0,5% (v/v) puis 0,05% (v/v) TX-100, la protéine de fusion recombinante a été éluée dans 50 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM KCl, 20 mM Glutathion réduite.

La protéine purifiée a été dialysée contre le tampon nécessaire pour le test de liaison à suivre. Elle a été dosée et supplémentée en inhibiteurs de protéases et gardée sur glace jusqu'à utilisation.

F. <u>Tests de liaison Spire-TgPP2C</u>

 $6 \ \mu g \ de \ GST-Spire1WH2$ ou de GST ont été incubés pendant la nuit à 4°C avec 20 μ l de résine à 50% (v/v) de Glutathion-Sépharose prélavée en tampon E (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% (v/v) TX-100) supplémenté en 1 mM DTT. La fraction non immobilisée a été éliminée par centrifugation. Après lavages en tampon E, les protéines immobilisées sur la résine ont été incubées avec 1 μ g de rPP2C dans 30 μ l de tampon E pendant 4 h à température ambiante. La fraction non liée a été récupérée par centrifugation tandis que la résine a été lavée en tampon E.

Les échantillons correspondants aux fractions non liées et aux éluats SDS ont ensuite été analysés par SDS-PAGE puis Western Blot réalisé avec des anticorps polyclonaux anti-TgPP2C dilués au 1:4000.

G. Extraction d'ARN et RT-PCR spécifique de Spire1 et Spire2

10⁷ cellules HeLa, CaCo2 et U373 ont été récoltées et culottées pour chaque extraction. L'ARN de ces cellules a été extrait à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (QIAGen) selon le protocole du fournisseur. Le kit RNeasy repose sur les propriétés de liaison spécifique d'une membrane de silice. Les cellules ont été lysées et homogénéisées en présence d'un tampon contenant de l'isothianate de guanidine hautement dénaturant, qui inactive immédiatement les RNases. De l'éthanol a été ajouté pour obtenir les conditions de liaison appropriées et les échantillons ont été appliqués sur des colonnes Rneasy sur lesquelles les ARN totaux se sont liés. Les contaminants ont ensuite été éliminés par lavage et les ARN ont été aliquotés et conservés à -80°C avant utilisation.

2,5 μg d'ARN ont été utilisés pour chaque transcription inverse. Brièvement, les ARN ont été hybridés pendant 10 min à 65°C avec une amorce oligodT (Invitrogen) puis la transcription inverse a été réalisée en présence de transcriptase inverse SuperScript II (Invitrogen) et d'inhibiteurs de RNase (RNase OUT, Invitrogen) dans le tampon recommandé par le fournisseur (42°C 50 min, 70°C 15 min). En contrôle, la moitié de l'ARN a été traitée dans les mêmes conditions mais sans transcriptase inverse. Les échantillons composés d'ADN complémentaire ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

1/10 des ADN complémentaires produits a été utilisé pour chaque PCR. Pour mettre en évidence la présence d'ADNc codant Spire1, l'amorce amont utilisée était 5'-CTGGTGAAGGCAGAGCTGGAAAA-3' aval était 5'et l'amorce GGCCTGGCGAGGACATGTAGAAAG-3'. Pour Spire2, l'amorce amont était 5'-GTTCTCGTGGCCGCCCAGCTG-3' et l'amorce aval était 5'-GGGAACGCCTCCTCCACGCTC-3'. En contrôle, la présence d'ADNc codant Arp3, membre du complexe nucléateur d'actine Arp2/3, a été étudiée en utilisant l'amorce amont 5'-GAGAGACCGAGAAGTAGGAATCCC-3' et l'amorce aval 5'-CTCAGGCGTGGAAGCCAGC-3'.



Figure 40 : Calibrage du cycle cellulaire de cellules HeLa

Des cellules HeLa ont été traitées pendant 24 h en présence de 50 μ M FDU, 0,33 μ M nocodazole ou en absence de SVF. Après marquage à l'iodure de propidium, elles ont été analysées en cytométrie en flux. Le graphique représente le nombre d'événements recensés par rapport à l'intensité de propidium mesurée, pour chaque population de cellule. Les traitements réalisés sont indiqués par les flèches.

III-<u>Résultats</u>

A. <u>L'expression ectopique de la TgPP2C dans les cellules de mammifère</u> bloque leur cycle et induit leur apoptose

Pour comprendre le rôle de la TgPP2C parasitaire sécrétée dans la cellule hôte, nous avons d'abord choisi de l'exprimer de manière ectopique dans les cellules de mammifère, et d'étudier le phénotype de ces cellules.

Etant donné que, dans le tachyzoïte, la TgPP2C intervient au niveau de la multiplication du parasite, nous avons commencé par étudier l'effet de l'expression de la phosphatase sur le cycle des cellules de mammifère.

1-La TgPP2C bloque les cellules en phase G2/M

Nous avons analysé des cellules HeLa exprimant la TgPP2C en cytométrie en flux après marquage de leur ADN à l'iodure de propidium.

L'iodure de propidium est un intercalant fluorescent de l'ADN. Il pénètre dans toutes les cellules préalablement perméabilisées et s'intercale dans la molécule d'ADN. Plus il y a d'ADN, plus il y a d'iodure de propidium intercalé. De ce fait, la fluorescence observée est proportionnelle à la quantité d'ADN dans le noyau de la cellule. Un tel marquage conduit à distinguer trois phases du cycle cellulaire qui se caractérisent par des quantités différentes d'ADN. Tout d'abord l'interphase ou phase G_1 qui correspond à 1N ADN, puis la phase intermédiaire, de synthèse ou phase S qui correspond à 1N<2N ADN et enfin la phase de mitose ou phase G_2/M correspondant à 2N ADN. Ainsi, le marquage à l'iodure de propidium des cellules transfectées permet de mettre en évidence d'éventuelles différences de profil dans la distribution des cellules entre ces trois phases.

La première étape consiste à calibrer le cycle afin de délimiter précisément au cytomètre les différentes phases du cycle. Pour ce faire, les cellules HeLa ont été traitées avec différents inhibiteurs du cycle cellulaire (Figure 40).

Tout d'abord, une privation des cellules en sérum permet d'arrêter leur croissance et de les bloquer en phase G_0/G_1 . Ensuite, la FDU bloque la réplication cellulaire au niveau de la phase S précoce. Son métabolite actif, la 2'-déoxy-5-fluorouridine 5'-monophosphate inhibe la thymidine synthétase, ce qui cause une déplétion en dTTP et donc un déséquilibre dans les pools de désoxynucléotides triphosphates. Enfin, le nocodazole bloque les cellules en phase G_2/M en dépolymérisant les microtubules ce qui empêche la séparation des deux chromatides



<u>Figure 41</u> : Les cellules exprimant la TgPP2C sont bloquées en phase G_2/M du cycle cellulaire

Les cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur codant pour la TgPP2C ou mises en présence du réactif de transfection seul. 24 h après, elles ont été récoltées et marquées à l'iodure de propidium pour être analysées en cytométrie en flux. Les résultats présentés sont la moyenne de 6 expériences indépendantes.

- A) Profils d'intensité de fluorescence en iodure de propidium obtenus pour les populations contrôles et exprimant la TgPP2C. Les plages d'intensité correspondant aux différentes phases du cycle sont indiquées.
- **B)** Pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire pour les deux populations étudiées. La population avec plus de 2N ADN correspond aux cellules polyploïdes et est comptée séparément.
 - * : La différence entre les deux populations est significative à 5%.

des chromosomes pendant la mitose. En analysant en cytométrie en flux ces cellules traitées puis marquées à l'iodure de propidium, nous avons ainsi déterminé les différentes phases du cycle et délimité précisément les différentes plages d'intensité de fluorescence correspondant aux différentes phases.

Les cellules contrôles ou transfectées avec les constructions TgPP2C-stop-GFP ou TgPP2C D273A-stop-GFP ont été analysées en cytométrie en flux 24 h après transfection. Les événements ont été acquis de telle sorte que seules les cellules vivantes ont été analysées. Le profil des cellules contrôles montre un pic majeur au niveau de la phase G_0/G_1 : en moyenne, sur six expériences indépendantes, 42% des cellules présentent une fluorescence correspondant à 1N ADN, 28% ont entre 1N et 2N ADN et sont donc en phase S, tandis que 26% des cellules sont en phase G_2/M (2N et plus ADN).

Les cellules transfectées, que ce soit avec la TgPP2C sauvage ou mutée, présentent un profil décalé vers la droite : la majorité des cellules se trouvent en phase G_2/M (Figure 41A). En effet, parmi les cellules exprimant la TgPP2C, en moyenne, 25% sont en phase G_0/G_1 , 24% sont en phase S et 46% sont en phase G_2/M . De même, parmi les cellules exprimant la TgPP2C D273A, 16% sont en phase G_0/G_1 , 26% en phase S et 58% en phase G_2/M (Figure 41B). La différence de pourcentage entre les phases G_2/M des cellules contrôles et des cellules transfectées est significative à 5%.

Contrairement à ce qui est observé chez les tachyzoïtes, la mutation D273A de la TgPP2C ne supprime pas l'effet de la TgPP2C dans les cellules de mammifère. Nous avons donc vérifié les activités catalytiques des deux formes de la phosphatase dans les cellules transfectées, par des tests de déphosphorylation. De manière surprenante, l'activité PP2C détectée dans les deux types d'extraits est comparable, ce qui semble indiquer que dans les cellules de mammifère la mutation D273A ne suffit pas pour inactiver la phosphatase. Ceci explique cependant l'identité des phénotypes de blocage cellulaire observé dans les deux populations.

Cette accumulation des cellules transfectées en phase G₂/M nous permet de poser l'hypothèse de l'induction d'un blocage dans cette phase par l'expression de la TgPP2C dans les cellules de mammifère.

2-Les cellules exprimant la TgPP2C présentent un phénotype nucléaire atypique

Afin de caractériser plus précisément ce blocage en phase G₂/M, nous avons étudié les cellules transfectées en immunofluorescence. Les cellules HeLa ont été transfectées soit avec



<u>Figure 42</u> : Les cellules exprimant la TgPP2C restent reliées par un pont cytoplasmique contenant de l'ADN

Les cellules HeLa ont été transfectées avec des constructions codant pour la TgPP2C ou la GFP-TgPP2C. 24 h après transfection, les cellules ont été fixées et marquées.

- A) Les cellules ont été transfectées avec une construction codant pour la GFP-TgPP2C (vert) et leur noyau marqué au DAPI (bleu).
- **B)** Les cellules ont été transfectées avec une construction codant pour la TgPP2C visualisée avec un anti-TgPP2C (rouge) et leur noyau marqué au DAPI (bleu).
- C) Les cellules ont été transfectées avec une construction codant pour la TgPP2C visualisée avec un anti-TgPP2C (rouge), leurs réseaux de microtubules marqués avec un anti-tubuline (vert) et leur noyau marqué au DAPI (bleu).

une construction codant la TgPP2C sans tag, soit avec une construction codant la GFP-TgPP2C. Les cellules ont été ensuite marquées 24 h après transfection et observées en microscopie à fluorescence.

Un nombre significatif de cellules présentent un phénotype tout à fait anormal de division (Figure 42). En effet, on observe fréquemment des cellules en fin de division, qui restent reliées par un pont cytoplasmique long et fin. Ce pont est soutenu par un réseau mitotique persistant et allongé comme en témoigne le marquage des microtubules. Le marquage anti-TgPP2C révèle que la protéine est présente au niveau de ce pont cytoplasmique, et plus précisément au niveau du « midbody » où le marquage est particulièrement intense. Ce type de pont cytoplasmique est souvent observé dans les cellules en division, mais dans le cas de ces cellules qui expriment la TgPP2C parasitaire, nous avons détecté un pont cytoplasmique particulièrement long contenant du matériel ADN non réparti dans les cellules filles, ce qui n'est jamais le cas dans les cellules non transfectées. Il est de plus particulièrement intéressant de noter un marquage parfois très intense d'ADN, en un ou deux spots, au niveau du « midbody », là où on observe une rupture du marquage de la TgPP2C.

En parallèle de ces cellules atypiques, nous avons déterminé qu'un nombre significatif de cellules transfectées possédaient plusieurs noyaux, suggérant que le défaut de division décrit plus haut aboutit à une « fusion » des deux cellules qui n'arrivent pas à se séparer complètement, devenant ainsi polyploïde. Cette polyploïdie est fréquemment décrite dans le cas de défaut de cytocinèse. Elle a été confirmée par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium : 23% des cellules transfectées avec la construction codant pour la TgPP2C ont plus de 2N ADN et sont donc polyploïdes contre 10% pour les cellules non transfectées (Figure 41B).

Etant donné que 46% des cellules transfectées étaient accumulées en phase G_2/M , et « seulement » 23% étaient polyploïdes, nous nous sommes demandé si la perturbation du cycle ne conduisait pas à la mort cellulaire.

3-La TgPP2C induit l'apoptose des cellules transfectées

Plusieurs analyses ont été réalisées afin de déterminer si les défauts de division observés chez les cellules exprimant de manière ectopique la TgPP2C conduisaient à leur mort.



Figure 43 : L'expression ectopique de la TgPP2C induit l'apoptose des cellules

Des cellules HeLa ont été transfectées avec une construction codant pour la TgPP2C ou mises en présence du réactif de transfection seul. 24 h et 38 h après transfection, elles ont été récoltées, marquées à l'annexine V et analysées en cytomètrie en flux.

Le pourcentage de cellules positives à l'annexine V est représenté pour chaque population comme la moyenne de 4 expériences indépendantes.

** : La différence avec le contrôle est significative à 1%.

L'annexine V, une protéine dépendant du calcium et se liant aux phospholipides, a la particularité de se lier préférentiellement à la phosphatidylsérine, un phospholipide de la membrane plasmique. Dans les cellules vivantes, cette phosphatidylsérine reste confinée au niveau du feuillet interne de la membrane. De ce fait, si les cellules ne sont pas perméabilisées, l'annexine V ne peut pas venir s'y lier. En revanche, pendant les premières étapes de l'apoptose, même si l'intégrité de la membrane cellulaire est maintenue, les cellules perdent l'asymétrie de leurs phospholipides, si bien que la phosphatidylsérine se retrouve externalisée et peut être liée à l'annexine V. En utilisant une annexine V couplée à un marqueur fluorescent tel que FITC, il est possible de visualiser cette liaison et de distinguer ainsi les cellules apoptotiques ces cellules vivantes. En contrôle positif, des cellules ont été traitées à la staurosporine afin d'induire leur apoptose. Elles ont été marquées à l'annexine V –FITC et analysées en cytométrie en flux afin de calibrer les réglages.

D'autre part, pour distinguer plus finement les cellules nécrotiques des cellules apoptotiques, les cellules transfectées ont été en parallèle marquées à l'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN qui ne peut pénétrer dans la cellule que si elle a été perméabilisée. C'est le cas pour les cellules nécrotiques ou en fin d'apoptose.

Les cellules ont été analysées 24 h et 38 h après transfection. Les cellules contrôles, mises en présence du mélange d'incubation sans ADN, présentent un taux de cellules mortes basal que ce soit à 24 h ou 38 h : à 24 h, 22% des cellules sont marquées à l'annexine V, 26% le sont à 38h. Parmi les cellules mortes, 8% sont positives à l'iodure de propidium à 24 h, 11% à 38 h. On peut donc considérer que parmi les cellules contrôles, 14% sont apoptotiques à 24 h contre 15% à 38 h.

Parmi les cellules transfectées avec la TgPP2C-stop-GFP, entre 60 et 80% des cellules expriment la TgPP2C. Sur la population totale, 56% des cellules sont positives au marquage annexine V à 24 h, 82% à 38 h après la transfection (Figure 43). Parmi ces cellules, 26% à 24 h et 55% à 38 h sont également positives au marquage à l'iodure de propidium. Cette proportion importante comprend sans doute des cellules qui ont avancé dans l'apoptose et dont la membrane plasmique n'est plus intacte.

Les cellules surexprimant la TgPP2C mutée présentent elles aussi un fort taux d'apoptose : 64% des cellules sont positives au marquage annexine V à 24h, 83% le sont à 38 h. Là encore, le taux de cellules positives au marquage à l'iodure de propidium est relativement important : 38% à 24 h puis 66% à 38 h.

Que ce soit pour la TgPP2C sauvage ou la forme mutée, la différence de pourcentage de cellules apoptotiques par rapport aux cellules contrôles est significative à 1%. Ceci indique



Figure 44 : L'ADN des cellules exprimant la TgPP2C est fragmenté et condensé

Les cellules HeLa ont été transfectées avec des constructions codant pour la TgPP2C ou la GFP-TgPP2C. 39 h après transfection, les cellules ont été fixées et marquées.

- **D)** Marquage TUNEL. La GFP-TgPP2C est visualisée directement par fluorescence (vert). Le marquage positif TUNEL est détecté avec des anticorps anti-digoxygénine couplés à la rhodamine (rouge). La flèche indique une cellule transfectée dont le noyau est fragmenté.
- E) Marquage DAPI. La GFP-TgPP2C est visualisée directement par fluorescence (vert) tandis que la TgPP2C est détectée avec des anticorps anti-TgPP2C (rouge). Les cellules sont marquées au DAPI (bleu). Les flèches indiquent des cellules transfectées dont le noyau est condensé.

donc que l'expression ectopique de la TgPP2C dans les cellules de mammifère conduit à la mort par apoptose.

Ce processus a été confirmé par deux analyses en immunofluorescence : l'étude de la fragmentation d'une part, et la condensation d'autre part du noyau des cellules transfectées.

La fragmentation et la condensation de l'ADN dont deux étapes plus tardives de l'apoptose cellulaire. Nous avons étudié la fragmentation de l'ADN à l'aide de la technique TUNEL, qui met en évidence l'incorporation de nucléotides marqués dans des interruptions générées par la fragmentation. Les cellules surexprimant la GFP-TgPP2C ou la GFP seule ont été étudiées 39 h après la transfection. Parmi les cellules surexprimant la GFP-TgPP2C, nous avons mis en évidence un marquage TUNEL positif au niveau du noyau, tandis que les cellules surexprimant la GFP ne présentent jamais un tel marquage (Figure 44A).

La condensation de l'ADN a été étudiée par marquage au DAPI des cellules transfectées. Parmi les cellules surexprimant la TgPP2C ou la GFP-TgPP2C, on observe un marquage intense des noyaux, qui apparaissent condensés, en petits amas, indicateurs typiques de noyaux apoptotiques (Figure 44B).

En conclusion, trois techniques complémentaires ont donc mis en évidence que les cellules exprimant de manière ectopique la TgPP2C parasitaire deviennent apoptotiques, ceci sans doute en raison d'un défaut dans leur cycle cellulaire dont témoignent à la fois un blocage en phase G_2/M et un échec de cytocinèse.

Si l'on extrapole les résultats obtenus après expression ectopique, on peut se poser la question de savoir si les doses de phosphatase sécrétées lors d'une infection pourraient modifier le cycle cellulaire à l'avantage du parasite. Pour comprendre plus spécifiquement le rôle de cette phosphatase, nous avons cherché d'éventuels partenaires et/ou substrats dans la cellule hôte.

B. La protéine Spire comme partenaire de la TgPP2C dans la cellule hôte

1-La TgPP2C interagit avec plusieurs protéines en crible double hybride

La stratégie choisie pour identifier des partenaires de la TgPP2C dans la cellule hôte a été le crible double hybride en levure. Ce crible a été réalisé en partenariat avec la société Hybrigenics. La TgPP2C a été utilisée comme appât tandis que le crible a porté sur une banque d'ADN complémentaire placentaire. Plusieurs protéines candidates partenaires ont été



Figure 45 : Domaines structuraux des protéines Spire

(Kerkhoff, 2006)

Les protéines Spire des différentes espèces partagent un certain nombre de domaines structuraux communs. Elles possèdent un domaine de liaison membranaire FYVE en C-terminal. La région « Spirbox » adjacente est un domaine d'interaction potentielle avec les GTPases Rab. Dans la région centrale se trouve un groupe de 4 domaines WH2 de liaison à l'actine. En N-terminal est localisé un domaine KIND, qui correspond à un module d'interaction protéique potentiel.

identifiées grâce à ce test : hRIP, une granuline, une tétranectine-like protéine, un activateur putatif de MAPK, la protéine SSRP1 et la protéine Spire2.

Nous avons choisi de nous focaliser plus particulièrement ici sur la protéine Spire. Spire a été récemment identifiée dans la drosophile, chez laquelle elle a été appelée p150-Spire. Les mutants *spire* présentent des défauts dans la mise en place des axes dorso-ventral et antéropostérieur de l'œuf et de l'embryon (Wellington *et al.*, 1999). Il a été montré que ces défauts étaient dus à des faisceaux de microtubules formés trop précocement pendant l'oogenèse. De plus, le phénotype observé est similaire à celui obtenu après un traitement à la cytochalasine D qui détruit le cytosquelette d'actine. Deux homologues de p150-Spire ont été identifiés dans les génomes de vertébrés dont les protéines correspondantes sont les protéines Spire1 (Kerkhoff *et al.*, 2001) et Spire2 (Ciccarelli *et al.*, 2003). Ces protéines présentent une forte similarité (37% d'identité et 50% de similarité chez la souris) (Kerkhoff, 2006) et partagent des domaines communs avec toutes les protéines Spire connues (Figure 45).

Ces domaines ont originellement été identifiés dans la séquence de p150-Spire. Tout d'abord, des études d'interaction par crible double hybride en levure ont montré que plusieurs GTPases de la famille Rho, dont RhoA, Rac1 et Cdc42 se liaient au niveau des 100 premiers acides aminés de la protéine (Wellington et al., 1999). D'autre part, p150-Spire contient un domaine C-terminal portant un motif 'DEJL', correspondant à un site d'amarrage des Junkinases (JNK). Cette liaison à JNK a été confirmée par crible double hybride. Il a de plus été montré que JNK phosphorylait spécifiquement p150-Spire (Otto et al., 2000). p150-Spire possède également un motif proche du motif en doigt de zinc (m'FYVE') généralement responsable d'interactions avec les phosphatidylinositols. Ce motif m'FYVE', en association avec un domaine situé en amont, appelé « Spir-box », est responsable de l'interaction de p150-Spire et de Spire1 avec la protéine Rab11, interaction à mettre en lien avec un rôle démontré de Spire dans les processus de transport vésiculaire (Kerkhoff et al., 2001). Enfin, Spire présente une répétition de quatre domaines WH2, qui sont chacun capables de lier un monomère d'actine. Ces domaines sont responsables de l'activité nucléatrice induite par Spire (Quinlan et al., 2005) et le crible double hybride indique que les domaines WH2 lient également la TgPP2C.



Figure 46 : Spire1 et TgPP2C interagissent in vitro

Des tests de liaison entre les domaines WH2 de Spire1 et la protéine TgPP2C recombinante ont été réalisés en utilisant de la GST immobilisée (colonnes c-d) ou GST-Spire1WH2 immobilisé (colonnes a-b). Les échantillons ont été analysés par Western Blot en utilisant des anticorps anti-TgPP2C. La flèche à gauche indique la position de la TgPP2C recombinante.L indique la fraction totale liée et N indique la fraction totale non liée.



Figure 47 : Spire est transcrit dans les cellules HeLa, CaCo2 et U373

L'ARN de cellules HeLa, CaCo2 et U373 a été extrait et soumis à une transcription inverse afin d'obtenir une banque d'ADNc. Des amplifications par PCR, spécifiques de Spire1 (A), Arp3 (B) et Spire2 (C) ont ensuite été réalisées.

+ : PCR réalisée sur la banque d'ADNc obtenue après transcription inverse.

- : contrôle de contamination par l'ADN génomique (mêmes réactions que pour la transcrption inverse mais en absence de RT-polymérase).

2-Les protéines TgPP2C et Spire1 interagissent in vitro

Nous avons cherché à confirmer l'interaction entre TgPP2C et Spire. Le crible double hybride n'a identifié que Spire2 comme partenaire de TgPP2C, mais nous avons choisi de nous intéresser en parallèle aux deux isoformes Spire1 et Spire2.

Du fait de la difficulté de production et de purification des protéines recombinantes totales, qui font chacune plus de 100 kDa, lorsqu'elles sont produites en fusion avec la GST, nous avons commencé par réaliser des tests de liaison avec la région contenant les quatre domaines WH2. Ces protéines ont été appelées Spire1WH2 et Spire2WH2 respectivement. Les premières expériences ont été réalisées avec GST-Spire1WH2. Lorsque de la TgPP2C recombinante est incubée avec de la GST-Spire1WH2 immobilisée sur résine de Glutathion-Sépharose, elle est retrouvée dans la fraction liée, alors qu'elle ne l'est pas lorsqu'elle est incubée avec de la GST seule (Figure 46).

La TgPP2C interagit donc *in vitro*, dans nos conditions, avec la région WH2 de la protéine Spire1, confirmant l'association obtenue en double hybride.

3-<u>Spire1 et Spire2 sont transcrits dans les lignées de cellules de</u> <u>mammifère utilisées</u>

A ce jour, les transcrits de Spire1 ont été détectés par Northern Blot à la fois dans le cerveau et la rate (Schumacher *et al.*, 2004) mais rien n'a été publié concernant l'expression de Spire2, excepté une présence possible dans les cellules hématopoïétiques. Dans la mesure où les profils d'expression de Spire1 et Spire2 sont relativement peu connus, nous avons commencé par vérifier si les transcrits de Spire1et Spire2 étaient présents dans les lignées cellulaires utilisées. Trois lignées ont été étudiées : des cellules HeLa, U373 et CaCo2. L'ARN de ces cellules a été extrait, puis soumis à une transcription inverse. La présence d'ADN complémentaire spécifique de Spire1 et Spire2 a été recherchée par amplification spécifique par PCR de fragments contenus dans la séquence codante de chacun des gènes. Des amplifications spécifiques, correspondant à la taille attendue pour le fragment de Spire1, sont obtenues avec les ADN complémentaires des trois lignées étudiées (Figure 47). En ce qui concerne Spire2, les amplifications sont détectées avec un signal plus faible. Une bande supplémentaire est détectée pour les cellules HeLa. Les amorces utilisées semblent pourtant spécifiques de Spire2. Nous ne pouvons cependant pas exclure que d'autres isoformes, ou d'autres formes différemment épissées, de Spire2 existent dans ces cellules. En contrôle de la

transcription inverse, une amplification correspondant à Arp3 est bien obtenue dans les trois lignées étudiées.

Ces résultats indiquent la présence de transcrits Spire1 dans les trois lignées que nous utilisons au laboratoire. Le transcrit Spire2 est lui clairement présent dans les cellules HeLa et U373. En revanche, sa détection est plus faible dans les cellules CaCo2.
IV-Discussion

L'une des approches visant à caractériser le rôle de la TgPP2C dans la cellule infectée a consisté à étudier le phénotype après expression ectopique dans les cellules hôtes. Nos résultats indiquent que des cellules HeLa exprimant la TgPP2C sont bloquées en phase G₂/M du cycle cellulaire. Elles présentent un phénotype tout à fait particulier qui traduit un défaut dans la réalisation de la dernière phase de la mitose. Les deux cellules en division restent en effet reliées par un pont cytoplasmique long et fin soutenu par un faisceau mitotique qui ne se désorganise pas mais persiste en s'allongeant. Au niveau du « midbody » se trouvent à la fois de l'ADN et une sous-population de la TgPP2C. Ce blocage de la cytocinèse pourrait entraîner la polyploïdie mais aussi l'apoptose de ces cellules, deux caractéristiques que nous avons documentées.

Des phénotypes similaires ont été mis en évidence avec d'autres PP2C dans les cellules de mammifère. Ainsi lorsque des cellules 293 surexpriment la PP2Ca humaine active, elles sont bloquées en phase G₂/M et meurent par apoptose (Ofek et al., 2003). Cet arrêt est directement lié à l'excès d'activité phosphatase de type 2C dans la mesure où l'expression de la forme mutante inactive n'a pas d'effet sur les cellules. De même, lorsqu'une PP2C de C. elegans, codée par le gène FEM-2 qui détermine le sexe, est surexprimée dans les cellules HeLa, elle induit l'apoptose via la voie des caspases (Tan et al., 2001). Cet effet est également dépendant de l'activité phosphatase de FEM-2. Ces résultats sont finalement semblables à ceux que nous avons obtenus quand la TgPP2C active a été surexprimée dans les tachyzoïtes (voir Chapitre 2). Le défaut de développement et la mort observés sont en effet dépendants de l'activité phosphatase de la protéine surexprimée. Nous avons précisé d'autre part que les cellules exprimant GFP-FEM-2 sont aussi bloquées en phase G₂/M et présentent un phénotype [pont cytoplasmique/ADN] semblable à ce que nous avons observé lorsque la TgPP2C est exprimée de manière ectopique dans les cellules de mammifère. Ces résultats appuient donc un rôle conservé des PP2C dans le cycle cellulaire. Cependant, dans ces cas précis, aucun substrat de ces phosphatases n'a été caractérisé.

Nos observations indiquent que la TgPP2C pourrait intervenir en particulier au cours de l'anaphase ou de la télophase, au moment de la cytocinèse. Les deux cellules restent liées par un long pont cytoplasmique anormalement allongé mais au centre duquel on distingue le « midbody ». Le « midbody » correspond à une matrice dense et compacte de protéines empaquetées dans la région chevauchante des extrémités positives des microtubules présents

dans le canal intercellulaire reliant les deux cellules filles à la fin de la cytocinèse. Des phénotypes assez semblables de longs ponts intercellulaires en fin de division ont été mis en évidence récemment lors de traitement de cellules de mammifères avec des inhibiteurs chimiques de la famille des kinases Src (Kasahara et al., 2007). En parallèle, l'activité catalytique de Src est nécessaire pour que les cellules progressent lors de la mitose, en particulier pour qu'elles entrent en mitose, en revanche, rien n'avait encore été démontré pour la fin de la mitose ou la cytocinèse. Il a de plus été prouvé que le trafic membranaire reprenait à la fin de la mitose de telle sorte que des vésicules étaient transportées au niveau du sillon de clivage puis au « midbody » aux dernières étapes de la cytocinèse. Cette étude montre qu'une signalisation par tyrosine phosphorylation est transmise spatialement et temporellement au « midbody » (Kasahara et al., 2007) : l'activation des kinases Src au début de la mitose entraîne l'activation des kinases ERK par tyrosine phosphorylation. Ces kinases ERK sont ensuite transportées au « midbody » par transport vésiculaire dirigé par Rab11, ce qui mène à la réalisation de l'abscission. Cependant le rôle des kinases ERK au « midbody » n'a pas encore été élucidé. Une fraction de la population de la TgPP2C étant retrouvée au « midbody » dans les phénotypes que nous observons, il serait intéressant d'étudier une éventuelle régulation entre ces deux protéines.

Cependant, le défaut d'abscission observé par Kasahara et al. n'est pas associé à la présence d'ADN dans le pont intercellulaire, contrairement aux phénotypes induits par la TgPP2C. Ceci pourrait indiquer que la TgPP2C aurait d'autres protéines partenaires ou substrats pendant la mitose, qui seraient impliquées plus particulièrement dans la réplication de l'ADN ou la séparation des chromatides. De rares études ont permis l'observation de noyaux semblables, en forme de goutte et interconnectés. Dans tous les cas, ces observations étaient associées à un défaut d'activité de la topoïsomérase IIa. La topoïsomérase IIa joue un rôle majeur dans la ségrégation des chromosomes pendant la mitose. En effet, elle agit au moment de l'étape finale de réplication de l'ADN et permet la décaténation des chromatides filles en se liant de façon covalente aux deux chaînes de l'hélice d'ADN, provoquant ainsi une coupure bicaténaire (Cortes et al., 2003). Il a été démontré que des embryons de souris mutants pour la topoïsomérase IIa ne dépassaient pas le stade 4 à 8 cellules. Ces cellules présentent, avant de rentrer en apoptose, des noyaux en forme de goutte, interconnectés par leurs extrémités. Cette observation suggère que la cytocinèse a eu lieu sans que la division nucléaire ne soit terminée (Akimitsu et al., 2003a). Un phénotype similaire a été obtenu en traitant des cellules embryonnaires sauvages avec des inhibiteurs de topoïsomérase IIa ou avec des siRNA spécifiques de la topoïsomérase IIa (Akimitsu et al., 2003b). Il serait donc

particulièrement intéressant d'étudier une éventuelle régulation de l'activité de la topoïsomérase II α , soit directement par déphosphorylation par une PP2C, soit indirectement par l'action d'une PP2C sur son niveau d'expression, qui doit normalement augmenter pendant la phase G₂/M. L'augmentation d'activité PP2C consécutive à l'expression ectopique de la TgPP2C pourrait, en ciblant la topoisométase II, altérer le processus de séparation des chromatides filles préalable à la cytocinèse.

La recherche de partenaires hôtes de la TgPP2C effectuée via un crible double hybride a abouti à l'identification de plusieurs protéines candidates parmi lesquelles on ne retrouve pas la topoisomérase IIa. Cependant, cette technique puissante peut ne pas permettre la détection d'une interaction labile ou à turn-over rapide. Parmi les protéines candidates obtenues, je me suis focalisée dans ce travail de thèse, sur la protéine Spire. Nous avons confirmé par des expériences de « pull down » que la région contenant les quatre domaines WH2 de la protéine Spire1 se liait à la TgPP2C. Des expériences seront rapidement réalisées avec la régionWH2 de Spire2. L'étape suivante consistera à étudier une éventuelle déphosphorylation de Spire1 et Spire2 par la TgPP2C (en cours, collaboration avec X. Cayla, Tours, France). Pour ce faire, nous commencerons par contrôler que Spire peut être phosphorylé. En effet, toutes les observations faites jusqu'à présent ont été obtenues par expression ectopique de la protéine p150, l'homologue de Spire chez la drosophile, dans des cellules murines. Les formes phosphorylées observées n'ont donc été obtenues qu'avec p150. Or, il a été particulièrement montré que la phosphorylation due à JNK se faisait au niveau de la région C-terminale de p150, région qui est la moins conservée parmi les homologues de Spire (Otto et al., 2000). Il sera donc déterminant de vérifier que Spire1 et Spire2 peuvent elles aussi être phosphorylées, que ce soit par JNK ou par une autre kinase. Nous pourrons ensuite réaliser des tests phosphatases et tester les activités spécifiques des différentes familles de sérine-thréonine phosphatases sur Spire. La question suivante sera alors de comprendre l'effet de cette régulation par phosphorylation sur Spire : a-t-elle un impact sur sa capacité à nucléer l'actine, intervient-elle au niveau du processus de transport vésiculaire dans lequel par Spire est impliquée ? Peut-il y avoir un lien entre une régulation de Spire par une PP2C et le phénotype observé lors de l'expression ectopique de la TgPP2C dans les cellules de mammifère ? En effet, Spire jouant un rôle dans le trafic vésiculaire via son interaction avec les protéines Rab, on pourrait émettre l'hypothèse qu'il intervient lors de la cytocinèse en particulier lors du transport de vésicules vers le sillon de clivage et le « midbody » nécessaire à la réalisation de l'abscission.

Enfin, la question la plus importante sera de vérifier si Spire a un rôle dans le devenir des tachyzoïtes intracellulaires. Pour ce faire, de l'ARN interférence sera réalisé sur les cellules de mammifère qui expriment Spire et l'impact de ce « knock-down » sur l'entrée et le développement des parasites sera étudié. Comme préliminaire à cette étude, nous avons vérifié par RT-PCR, que les transcrits Spire1 et Spire2 étaient présents dans nos cellules. Nous réaliserons dans les cellules HeLa et U373 les expériences d'ARN interférence nécessaires à l'étude du rôle de Spire sur la survie des tachyzoïtes. Cependant, cette étude nécessite au préalable l'obtention d'anticorps spécifiques de Spire1 et Spire2 a bien été inhibée. La production et la purification des protéines qui serviront d'antigènes pour la fabrication de ces anticorps est actuellement en cours.

Parmi les autres protéines candidates interagissant avec la TgPP2C, le crible double hybride en levure a identifié un activateur putatif de MAPK. Cette protéine a été caractérisée comme telle lors d'un crible à grande échelle visant à rechercher les protéines induisant une activation de la voie MAPK (Matsuda *et al.*, 2003). Elle n'a pas été étudiée plus en détail jusqu'à présent, et la manière dont elle active cette voie de signalisation est pour l'instant inconnue. Son interaction potentielle avec la TgPP2C est d'autant plus intéressante que plusieurs études ont montré que les différentes kinases de la voie MAPK étaient activées puis désactivées lors de l'invasion par *T. gondii*. Il a ainsi été démontré dans des cellules monocytaires que les trois MAPK ERK, p38 et JNK étaient phosphorylées très rapidement suite à l'entrée de *T. gondii* (Valère *et al.*, 2003). Elles sont ensuite déphosphorylées en 60 à 120 min (Kim *et al.*, 2004) Nous allons donc vérifier *in vitro* que la TgPP2C se lie à cet activateur de MAP kinase.

Une autre voie de signalisation, intimement liée à la voie MAPK, et manipulée par le tachyzoïte intracellulaire est la voie NF- κ B. La famille NF- κ B est une famille de régulateurs transcriptionnels dont l'activation induit en particulier la transcription de gènes impliqués dans la fonction immunitaire, la prolifération et la survie cellulaire ainsi que l'inhibition de l'apoptose. Dans les fibroblastes, *T. gondii* induit l'activation rapide de NF- κ B qui se traduit par sa translocation au noyau (Molestina *et al.*, 2003). Cette activation se fait par phosphorylation des inhibiteurs I- κ B par des kinases à la fois parasitaires et hôtes (Molestina et Sinai, 2005). I- κ B est alors localisé à la PVM et libère NF- κ B. Du fait de cette régulation par phosphorylation, une interaction entre une phosphatase et un des acteurs de la voie NF- κ B est fortement envisageable. C'est pourquoi nous sommes en train d'étudier l'effet de la TgPP2C sur l'activation de NF- κ B.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Le tachyzoïte correspond au stade biologique de *T. gondii* responsable de la phase aigue de la toxoplasmose. Deux étapes essentielles de son développement sont, d'une part, l'invasion, processus par lequel le tachyzoïte pénètre dans une cellule hôte, et, d'autre part, l'endodyogénie par laquelle il se multiplie très rapidement, avant de disséminer vers d'autres cellules.

La thématique de recherche principale de l'équipe d'I. Tardieux porte sur le déplacement du tachyzoïte et son entrée dans la cellule hôte. Il a été démontré que ces deux processus dépendent du cytosquelette d'actine du parasite. C'est pourquoi l'équipe a cherché à identifier des protéines parasitaires régulant la dynamique de ce cytosquelette. C'est ainsi que la toxofiline a été caractérisée. Il s'agit d'une protéine sans homologue connu dans d'autres organismes, qui est capable de lier et séquestrer l'actine monomérique. La liaison de la toxofiline à l'actine G est régulée par phosphorylation de sa sérine 53. Cette phosphorylation est catalysée par une CKII tandis que la déphosphorylation est réalisée par une sérine-thréonine phosphatase de type 2C.

Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai cherché à caractériser plus spécifiquement les fonctions de cette PP2C parasitaire.

I-<u>Une nouvelle voie de sécrétion de protéines parasitaires ?</u>

La stratégie principale adoptée pour comprendre le rôle de la TgPP2C dans le tachyzoïte a consisté en une stratégie de surexpression dans le tachyzoïte. Bien qu'éloignant des conditions physiologiques et responsable de certains artéfacts, cette approche permet d'amplifier un phénomène dans lequel la protéine étudiée est impliquée, suggérant certaines de ces propriétés fonctionnelles.

Lors de ces études, nous avons utilisé deux systèmes d'expression parasitaire différents, dont l'un dépend d'un promoteur parasitaire plus faible, ce qui permet de diminuer les risques d'artéfacts. De plus, la TgPP2C a été construite en fusion avec un petit tag (HA) dans ce vecteur, ce qui limite également les effets pouvant provenir d'un changement conformationnel de la protéine ou du masquage de sites d'interaction dû à un tag trop

important. Nous avons mis en évidence dans ces conditions que la TgPP2C était sécrétée dans la cellule hôte.

A. La TgPP2C n'est pas localisée dans les organites de sécrétion apicaux

Cette observation est un résultat inattendu dans la mesure où la TgPP2C ne possède aucune des caractéristiques connues des protéines de *T. gondii* sécrétées. En effet, des études de localisation de la TgPP2C endogène ont montré qu'elle était localisée à la fois dans le noyau, le cytoplasme du parasite et associée à la membrane, mais pas spécifiquement dans des organites de sécrétion, comme les micronèmes, les rhoptries, ou les granules denses. De plus, elle ne possède pas de peptide signal alors que toutes les protéines connues, présentes dans ces trois organites de sécrétion, sont synthétisées avec une séquence signal à leur extrémité N-terminale, séquence responsable de leur entrée dans les voies de sécrétion (Ngo *et al.*, 2000).

Cependant, la TgPP2C fait partie des protéines excrétées/sécrétées identifiées par l'équipe de V. Carruthers après stimulation à l'éthanol (Zhou *et al.*, 2005). Il a été démontré que ce traitement stimulait spécifiquement la sécrétion des micronèmes par augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Carruthers *et al.*, 1999b). Aucune séquence connue d'adressage aux voies de sécrétion n'ayant été identifiée chez la TgPP2C, la détection de TgPP2C (ainsi que d'autres protéines cytoplasmiques) parmi les protéines sécrétées a été attribuée à une lyse partielle des parasites suite au traitement. Nos résultats indiquent que cette observation n'était probablement pas un artéfact dans le cas de la TgPP2C. De plus, comme le souligne P. Bradley suite à l'identification de la toxofiline dans le protéome des rhoptries (Bradley *et al.*, 2005), il serait étonnant que la toxofiline soit déphosphorylée par la TgPP2C seraient sécrétées dans la cellule hôte où elles interagiraient entre elles.

Le fait que la TgPP2C soit sécrétée malgré son absence des organites de sécrétion suggère donc que des voies de sécrétion/excrétion, différentes de celles des organites apicaux, existent chez *T. gondii*.

B. Le domaine N-terminal est nécessaire et suffisant à la sécrétion

Par rapport aux autres PP2C connues, que ce soit chez *T. gondii* ou chez les autres eucaryotes, la TgPP2C possède un domaine N-terminal unique de 18 acides aminés. Nous avons cherché à savoir si ce domaine N-terminal pouvait être impliqué dans la sécrétion de la TgPP2C observée chez les tachyzoïtes. C'est pourquoi nous avons transfecté des tachyzoïtes

avec une construction codant pour la TgPP2C sans ses 18 premiers acides aminés. Nous avons alors mis en évidence que dans ce cas, le domaine catalytique restant de la TgPP2C n'était plus observé dans le cytoplasme de la cellule hôte. En revanche, les parasites présentaient le même défaut de développement que les parasites transfectés avec la construction sauvage. Ceci indique donc que le domaine N-terminal de la TgPP2C est impliqué dans sa sécrétion dans la cellule hôte. Cette séquence est particulièrement caractéristique de la TgPP2C de T. gondii dans la mesure où on ne la retrouve dans aucune autre protéine, excepté dans une protéine hypothétique de Dictyostelium, mais en position beaucoup plus proche de l'extrémité C-terminale. Elle ne ressemble pas à un peptide signal et ne possède pas de motifs semblables à ceux impliqués dans l'adressage aux voies de sécrétion, basés sur la présence de tyrosines. Un rôle possible serait que ce domaine interagirait avec une protéine possédant les caractéristiques de protéines sécrétées, et qui servirait de chaperonne à la TgPP2C pour sa sécrétion. Pour valider cette hypothèse, des tests de coprécipitation seront réalisés en incubant des extraits parasitaires avec une colonne sur laquelle la région N-terminale recombinante sera immobilisée. Il est également envisageable que ces 18 acides aminés contiennent une séquence adressant la phosphatase vers une voie de sécrétion, différente des organites apicaux, encore inconnue à ce jour.

L'étude de protéines chimères possèdant le domaine N-terminal de la TgPP2C a montré que ce domaine était suffisant pour induire la sécrétion d'une protéine exogène. En effet, alors que la GST ou la GFP, exprimées de manière ectopique dans le tachyzoïte sont cytoplasmiques et ne se retrouvent ni dans la vacuole parasitophore ni dans le cytoplasme de la cellule hôte, les protéines Nter-GST et Nter-GFP sont exportées à l'extérieur du parasite, dans la cellule hôte. Ceci confirme donc que la région N-terminale de la TgPP2C est à elle seule responsable de la sécrétion de la phosphatase.

Afin de caractériser plus spécifiquement les acides aminés du domaine N-terminal critiques pour la sécrétion, nous avons produit des vecteurs portant une mutation sur certains résidus qui pouvaient se révéler important dans la séquence, et étudié l'effet de ces mutations sur la sécrétion. Le domaine N-terminal étant unique, il était difficile de distinguer *a priori* les acides aminés potentiellement critiques. Etant donné que deux d'entre eux, la sérine 3 et la thréonine 10 sont prédits comme pouvant être phosphorylés, nous avons émis l'hypothèse qu'ils pouvaient jouer un rôle dans le mécanisme de sécrétion. Les mutations obtenues rendent les protéines non phosphorylables sur ces résidus ou les mettent dans une configuration phosphorylée sur ces mêmes résidus. D'après nos premières données, ces phosphatases mutantes ne sont pas sécrétées différemment par le tachyzoïte. Aucun autre site

potentiel de phosphorylation n'étant situé dans cette région, il est donc probable que ce mécanisme de régulation ne soit pas impliqué dans la sécrétion de la TgPP2C. Il sera nécessaire d'introduire des mutations de manière systématique dans le domaine N-terminal, ou de tronquer peu à peu ce domaine depuis l'extrémité N-terminale afin d'identifier les acides aminés critiques à la sécrétion. Ceci permettra alors peut-être de caractériser une séquence minimale nécessaire à la sécrétion, qui sera ensuite recherchée dans d'autres protéines sécrétées.

II-Des cibles similaires dans le tachyzoïte et la cellule hôte

Les différentes stratégies utilisées afin de comprendre plus spécifiquement le rôle de la TgPP2C à la fois dans le parasite et dans la cellule infectée ont mis en lumière des caractères communs dans les cibles potentielles de cette phosphatase. Elle semble en effet être impliquée dans la division cellulaire et dans la dynamique de l'actine, que ce soit chez le tachyzoïte ou la cellule hôte.

A. La TgPP2C affecte la division cellulaire

La surexpression de la TgPP2C dans le tachyzoïte entraîne un défaut de multiplication, quelque soit le tag utilisé et sa position par rapport à la phosphatase. Les parasites se divisent de manière aberrante et finissent par dégénérer dans leur vacuole parasitophore. Nous avons mis en évidence que le défaut de multiplication semblait dû à un problème de division du noyau. En effet, ces parasites transfectés présentent deux noyaux géants connectés par un pont d'ADN. Ils ont de plus fréquemment un profil d'IMC anormal.

Lorsque la TgPP2C est exprimée de manière ectopique dans les cellules de mammifère, on observe aussi un défaut de multiplication des cellules transfectées. Les cellules sont bloquées en phase G₂/M et meurent par apoptose. Nous avons également mis en évidence que ces cellules présentent souvent un défaut de cytocinèse caractéristique. Les deux cellules filles restent liées par un long pont cytoplasmique contenant de l'ADN reliant les deux noyaux fils. Les phénotypes observés en système hétérologue et chez le tachyzoïte sont donc très similaires et pourraient indiquer que des cibles homologues existent chez le parasite et la cellule de mammifère. En particulier, il est probable que la TgPP2C interagisse avec une protéine impliquée dans la division nucléaire dans les deux cas. Cependant, les mécanismes de division sont très différents chez le tachyzoïte et chez la cellule de mammifère. En effet, chez le tachyzoïte, l'endodyogénie commence avant même que la phase S ne soit terminée : les centrioles sont dupliqués et séparés, et l'appareil de Golgi est divisé. Puis deux nouveaux IMC fils sont formés. Une fois que les chromosomes sont répliqués, on observe une incurvation du côté apical du noyau qui annonce le début de la division nucléaire qui a lieu tandis que la membrane nucléaire reste intacte (Hu *et al.*, 2002). Ainsi il n'existe pas de pause significative avant le début de la mitose chez *T. gondii*.

Le crible double hybride effectué avec la TgPP2C sur de l'ADNc placentaire n'a fourni que deux protéines pouvant intervenir pendant le cycle cellulaire. Il s'agit d'un activateur putatif de MAP kinase et de la protéine SSRP1 du complexe FACT.

Les MAPK sont impliquées dans la progression de la mitose, que ce soit dans les cellules de mammifère, les oocytes de Xénope ou les plantes. Une MAPK a également été identifiée chez *Plasmodium*, comme contrôlant la cytocinèse (Tewari *et al.*, 2005). Il s'agit de protéines ubiquitaires qui pourraient expliquer les similarités de phénotypes observés dans les divers systèmes étudiés, s'il s'agit bien d'un substrat de PP2C.

SSRP1 est une des sous-unités du facteur d'élongation FACT, impliqué dans la transcription. Or, chez *Plasmodium*, plusieurs composants de la machinerie de la transcription ont été identifiés comme substrat de la PfPP2C (Mamoun et Goldberg, 2001). De plus, une collaboration avec M.A Hakimi (Grenoble) a abouti à la purification de la TgPP2C en complexe avec une ARN polymérase, ce qui confirmerait un rôle de ces phosphatases dans la transcription, quelles que soient les cellules étudiées.

Cependant, aucune de ces cibles potentielles ne semble directement liée au phénotype observé après surexpression de la TgPP2C. Il est donc probable que d'autres substrats conservés existent, impliqués plus particulièrement dans l'abscission et dans la séparation des chromatides pendant la mitose. Des études plus précises en particulier d'immunoprécipitation ou de différences de profil de phosphorylation pourraient permettre d'identifier ces cibles. Cependant, cette analyse peut être biaisée du fait du caractère très rapide de la division parasitaire. La division et la cytocinèse durent en effet moins d'une heure chez le tachyzoïte. Il sera sans doute nécessaire de bloquer le cycle du parasite à différentes phases afin d'enrichir la population en parasites en division et augmenter ainsi la probabilité d'identifier une différence de phosphorylation provenant de l'action de la TgPP2C.

B. <u>La TgPP2C agit indirectement sur le cytosquelette d'actine</u>

La recherche de cibles de la TgPP2C dans la cellule hôte *via* un crible double hybride a mis en évidence qu'elle interagit avec une protéine régulant la dynamique de l'actine, la protéine Spire. Spire est une protéine qui n'a été identifiée jusqu'à présent que chez les métazoaires. Elle a la particularité d'induire la formation de filaments d'actine *de novo*. Mais peu de choses sont réellement connues quand à son rôle précis dans les cellules de mammifère. En particulier, aucune protéine régulatrice n'a été identifiée et ses capacités de nucléation n'ont été mises en relation avec aucun processus cellulaire à ce jour. Il sera donc intéressant de préciser le rôle de la TgPP2C sur Spire en confirmant en particulier *in vivo*, qu'elles sont partenaires. Un effet de la phosphorylation/déphosphorylation sur les propriétés de nucléation de Spire sera recherché.

Cette interaction de la TgPP2C avec une protéine hôte régulant la dynamique de l'actine paraît d'autant plus intéressante que la TgPP2C a été identifiée dans le tachyzoïte en complexe avec la toxofiline. Elle régule l'affinité de la toxofiline pour l'actine. Les fonctions de Spire et de la toxofiline semblent cependant très différentes dans la mesure où la toxofiline a été caractérisée comme séquestrant l'actine monomérique (Poupel et al., 2000), tandis que Spire nuclée de nouveaux filaments d'actine. Autrement dit, la toxofiline inhibe la polymérisation de l'actine tandis que Spire la promeut. Mais lorsque nous avons étudié les différents domaines de la toxofiline en vue d'identifier les régions impliquées dans sa liaison à l'actine, nous avons mis en évidence que le domaine NoCC se liait à l'actine sans la séquestrer. De plus, lorsque les deux protéines ont été incubées avant d'être déposées sur gel natif, nous avons montré que l'actine ne pouvait plus pénétrer dans le gel, phénomène semblable à ce qui est observé avec l'actine F. Il serait donc très intéressant d'étudier plus précisément le rôle de NoCC sur l'actine et surtout d'analyser l'effet de la TgPP2C sur l'interaction entre NoCC et l'actine, étant donné que l'acide aminé substrat de la TgPP2C se trouve dans le domaine NoCC. Il est en effet plausible que ce domaine joue un rôle dans la polymérisation de l'actine, ce qui rapprocherait donc les fonctions de la toxofiline et de Spire.

Dans tous les cas, il est important de noter qu'une phosphatase, qui ne correspond pas au type de phosphatase majoritaire dans les cellules eucaryotes en général, agisse sur deux protéines bien différentes mais impliquées toutes les deux dans la dynamique de l'actine. Ceci pourrait laisser supposer que les PP2C auraient un rôle régulateur général sur les protéines liant l'actine. En effet, d'autres PP2C ont été identifiées comme régulant les voies de signalisation de protéines impliquées dans la dynamique de l'actine. Ainsi, les protéines POPX1 et POPX2 sont deux PP2C qui inactivent PAK, une kinase activée par Cdc42/Rac et qui régule de nombreux effets biologiques en aval de ces GTPases (Koh *et al.*, 2002). De même, il a été démontré chez *A. thaliana* qu'une PP2C était impliquée dans la régulation, induite par l'acide abscissique, des filaments d'actine corticaux dans les cellules de garde (Eun *et al.*, 2001). Une PP2C a également identifiée comme déphosphorylant spécifiquement la fragmine, une protéine coiffante et cassant les filaments d'actine, de *P. polycephalum* (Waelkens *et al.*, 2000). Enfin, une PP2C inactive la liaison de la moesine à l'actine F dans les plaquettes et influence ainsi les interactions dynamiques entre le cytosquelette d'actine et les constituants membranaires liés à la moesine (Hishiya *et al.*, 1999). L'activité PP2C majoritaire caractérisée dans les tachyzoïtes de *T.* gondii serait alors à mettre en relation avec le caractère primordial du cytosquelette d'actine chez cet organisme, pour sa mobilité et son invasion.

III-A la recherche d'inhibiteurs de la TgPP2C

La compréhension de la dynamique du cytosquelette d'actine est d'un intérêt majeur dans l'optique de la mise au point de nouveaux traitements parasitaires dans la mesure où cette propriété est essentielle à la mobilité et à la capacité invasive du tachyzoïte. Bloquer cette mobilité et l'invasion apparaît donc comme une stratégie pertinente pour limiter les infections dues à *T. gondii*. Dans ce cadre, agir sur la TgPP2C pourrait être particulièrement efficace.

L'activité associée à la TgPP2C joue un rôle primordial pour la survie du parasite. En effet, nous avons démontré que sa surexpression dans le tachyzoïte perturbe la multiplication et entraîne la mort de ce dernier. Il semble donc que la régulation de son activité soit déterminante pour un développement normal du parasite. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la classe 2C constitue l'activité la plus abondante pour les sérine-thréonine phosphatases parasitaires. Il est donc pertinent de poser l'hypothèse que la TgPP2C soit régulée et plusieurs possibilités peuvent être évoquées : une modification post-traductionnelle altérant la structure et la liaison à des partenaires et/ou l'adressage à des compartiments subcellulaires regroupant des substrats éventuels. On ne peut également exclure que certains partenaires soient des régulateurs directs de l'activité phosphatase, jouant ainsi un rôle de « sous-unité ».

Ayant défini deux sites de liaison de la région N-terminale de la toxofiline pour la TgPP2C, nous avons développé un test pour cribler des molécules parasitaires, ou des molécules exogènes voire synthétiques, inhibitrices de l'interaction. Le site substrat étant compris dans cette séquence (sérine 53), nous pourrons également évaluer l'impact des molécules sur la phosphorylation. De même, il serait possible de considérer l'utilisation de cette séquence pour caractériser des activités spécifiquement de type sérine-thréonine phosphatase de type 2C. Reste à démontrer que les activités PP1, PP2A et PP2B ne déphosphorylent pas la sérine 53 dans ce peptide.

Plusieurs études ont été réalisées pour mettre au point ces inhibiteurs spécifiques. Ainsi des phosphopeptides inhibiteurs de la phosphatase 2C Wip1 ont été dessinés sur la base de la séquence substrat optimale (Yamaguchi *et al.*, 2006). Il a été démontré que des phosphopeptides cycliques contenant le motif 'pSIpY' avaient l'activité inhibitrice la plus importante parmi tous les phosphopeptides testés. Cependant ces phosphopeptides n'inhiberaient que Wip1 et ne pourraient donc pas servir pour bloquer l'activité de n'importe quel membre de la famille des PP2C. En parallèle, un criblage de ligands virtuels de la PP2Ca a été réalisé. Il a permis d'identifier de petites molécules inhibitrices de l'activité de la PP2Ca (Rogers *et al.*, 2006). Il s'agit de molécules sans phosphate, et actives à une concentration de l'ordre du micromolaire, et qui cibleraient trois sites de liaison près du site actif de la PP2Ca. Cependant, toutes ces molécules inhibiter également l'activité des PPP. De ce fait, leur intérêt comme inhibiteur caractéristique des PP2C est relativement restreint.

Enfin, l'identification des séquences responsables de la liaison de la TgPP2C à la toxofiline pourrait donc servir à mettre au point des inhibiteurs compétitifs de l'activité PP2C. En effet en se liant à la PP2C étudiée, ils bloqueraient la liaison du substrat et ainsi empêcheraient la phosphatase d'exercer son activité spécifique sur sa cible. Une des séquences que nous avons caractérisées paraît très spécifique de la liaison de la toxofiline à la TgPP2C. Elle ne permettrait donc pas telle quelle de servir d'inhibiteur général de PP2C. En revanche, dans la mesure où plusieurs sites dans la toxofiline se lient à la TgPP2C, il est possible que les autres séquences seront utilisées pour fabriquer des peptides, testés ensuite comme inhibiteurs dans des essais de déphosphorylation spécifique de substrats par des PP2C de différents organismes. Si ces peptides sont efficaces, ils seront alors les premiers inhibiteurs généraux spécifiques des PP2C.

En conclusion, la recherche d'inhibiteur de la TgPP2C a un intérêt plus large que la seule recherche d'agents thérapeutiques contre la toxoplasmose. En effet, elle pourrait aboutir à l'obtention de molécules régulant spécifiquement les phosphatases de type 2C, seule famille de phosphatases n'ayant pas d'inhibiteur connu à ce jour.

BIBLIOGRAPHIE

Ahlemeyer, B., Selke, D., Schaper, C., Klumpp, S. et Krieglstein, J. (2001). Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. *Eur J Pharmacol* **430**:1-7

Akimitsu, N., Adachi, N., Hirai, H., Hossain, M. S., Hamamoto, H., Kobayashi, M., Aratani, Y., Koyama, H. et Sekimizu, K. (2003a). Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic cells depleting the activity of DNA topoisomerase IIalpha. *Genes Cells* **8**:393-402

Akimitsu, N., Kamura, K., Tone, S., Sakaguchi, A., Kikuchi, A., Hamamoto, H. et Sekimizu, K. (2003b). Induction of apoptosis by depletion of DNA topoisomerase IIalpha in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **307**:301-7

Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P. et Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the moving junction complex of Toxoplasma gondii: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog* **1**:e17

Allen, M. L., Dobrowolski, J. M., Muller, H., Sibley, L. D. et Mansour, T. E. (1997). Cloning and characterization of actin depolymerizing factor from Toxoplasma gondii. *Mol Biochem Parasitol* **88**:43-52

Amann, K. J. et Pollard, T. D. (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:15009-13

Bamburg, J. R., McGough, A. et Ono, S. (1999). Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol* **9**:364-70

Barford, D. (1996). Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* **21**:407-12

Barragan, A. et Sibley, L. D. (2002). Transepithelial migration of Toxoplasma gondii is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med* **195**:1625-33

Barragan, A. et Sibley, L. D. (2003). Migration of Toxoplasma gondii across biological barriers. *Trends Microbiol* **11**:426-30

Bateman, A. et Bennett, H. P. (1998). Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *J Endocrinol* **158**:145-51

Beckers, C. J., Dubremetz, J. F., Mercereau-Puijalon, O. et Joiner, K. A. (1994). The Toxoplasma gondii rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* **127**:947-61

Bergman, L. W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T. M., Fox, S., Matuschewski, K., Nussenzweig, V. et 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

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T. J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou,

A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M. A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., Melville, S. E. et El-Sayed, N. M. (2005). The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. *Science* **309**:416-22

Bhattacharyya, M. K., Hong, Z., Kongkasuriyachai, D. et Kumar, N. (2002). Plasmodium falciparum protein phosphatase type 1 functionally complements a glc7 mutant in Saccharomyces cerevisiae. *Int J Parasitol* **32**:739-47

Black, M. W. et Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of Toxoplasma gondii. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:607-23

Blader, I. J., Manger, I. D. et Boothroyd, J. C. (2001). Microarray analysis reveals previously unknown changes in Toxoplasma gondii-infected human cells. *J Biol Chem* **276**:24223-31

Blisnick, T., Vincensini, L., Fall, G. et Braun-Breton, C. (2006). Protein phosphatase 1, a Plasmodium falciparum essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites. *Cell Microbiol* **8**:591-601

Bork, P., Brown, N. P., Hegyi, H. et Schultz, J. (1996). The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Sci* **5**:1421-5

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. et Boothroyd, J. C. (2005). Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in Toxoplasma gondii. *J Biol Chem* **280**:34245-58

Brecht, S., Carruthers, V. B., Ferguson, D. J., Giddings, O. K., Wang, G., Jakle, U., Harper, J. M., Sibley, L. D. et Soldati, D. (2001). The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J Biol Chem* **276**:4119-27

Brenier-Pinchart, M. P., Pelloux, H., Derouich-Guergour, D. et Ambroise-Thomas, P. (2001). Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol* **17**:292-6

Brossier, F., Jewett, T. J., Lovett, J. L. et Sibley, L. D. (2003). C-terminal processing of the toxoplasma protein MIC2 is essential for invasion into host cells. *J Biol Chem* **278**:6229-34

Brossier, F., Jewett, T. J., Sibley, L. D. et 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**:4146-51

Bumstead, J. et Tomley, F. (2000). Induction of secretion and surface capping of microneme proteins in Eimeria tenella. *Mol Biochem Parasitol* **110**:311-21

Carlier, M. F. et Pantaloni, D. (1997). Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* **269**:459-67

Carmen, J. C., Hardi, L. et Sinai, A. P. (2006). Toxoplasma gondii inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell Microbiol* **8**:301-15

Carruthers, V. B. et Boothroyd, J. C. (2007). Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. *Curr Opin Microbiol* **10**:83-9

Carruthers, V. B., Giddings, O. K. et Sibley, L. D. (1999a). Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol* 1:225-35

Carruthers, V. B., Hakansson, S., Giddings, O. K. et Sibley, L. D. (2000a). Toxoplasma gondii uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infect Immun* **68**:4005-11

Carruthers, V. B., Moreno, S. N. et Sibley, L. D. (1999b). Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca2+] and stimulate microneme discharge in Toxoplasma gondii. *Biochem J* **342** (**Pt 2**):379-86

Carruthers, V. B., Sherman, G. D. et Sibley, L. D. (2000b). The Toxoplasma adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *J Biol Chem* **275**:14346-53

Carruthers, V. B. et Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* **73**:114-23

Carruthers, V. B. et Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in Toxoplasma gondii. *Mol Microbiol* **31**:421-8

Cayla, X., Garcia, A., Baumgartner, M., Ozon, R. et Langsley, G. (2000). A Theileria parva type 1 protein phosphatase activity. *Mol Biochem Parasitol* **110**:161-6

Cerede, O., Dubremetz, J. F., Soete, M., Deslee, D., Vial, H., Bout, D. et Lebrun, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in Toxoplasma gondii virulence. *J Exp Med* **201**:453-63

Cheng, A., Ross, K. E., Kaldis, P. et Solomon, M. J. (1999). Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev* **13**:2946-57

Ciccarelli, F. D., Bork, P. et Kerkhoff, E. (2003). The KIND module: a putative signalling domain evolved from the C lobe of the protein kinase fold. *Trends Biochem Sci* **28**:349-52

Cockwell, K. Y. et Giles, I. G. (1989). Software tools for motif and pattern scanning: program descriptions including a universal sequence reading algorithm. *Comput Appl Biosci* **5**:227-32

Cohen, P. T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**:245-51

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. et Deleage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* **25**:147-50

Cortes, F., Pastor, N., Mateos, S. et Dominguez, I. (2003). Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis. *Mutat Res* **543**:59-66

Courret, N., Darche, S., Sonigo, P., Milon, G., Buzoni-Gatel, D. et Tardieux, I. (2006). CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single Toxoplasma gondii tachyzoites to the brain. *Blood* **107**:309-16

Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T. et Barford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 A resolution. *Embo J* **15**:6798-809

de Melo, E. J., de Carvalho, T. U. et de Souza, W. (1992). Penetration of Toxoplasma gondii into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct* **17**:311-7

De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaiskou, A., Jessus, C. et Ozon, R. (2002). Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* **277**:28592-600

Delorme, V., Cayla, X., Faure, G., Garcia, A. et Tardieux, I. (2003). Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on Toxoplasma gondii Toxofilin. *Mol Biol Cell* **14**:1900-12

Delorme, V., Garcia, A., Cayla, X. et Tardieux, I. (2002). A role for Toxoplasma gondii type 1 ser/thr protein phosphatase in host cell invasion. *Microbes Infect* **4**:271-8

Dobrowolski, J. M., Carruthers, V. B. et Sibley, L. D. (1997a). Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by Toxoplasma gondii. *Mol Microbiol* **26**:163-73

Dobrowolski, J. M., Niesman, I. R. et 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**:253-62

Dobrowolski, J. M. et Sibley, L. D. (1996). Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* **84**:933-9

Dobson, S., Bracchi, V., Chakrabarti, D. et Barik, S. (2001). Characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase (PfPPJ) from the malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **115**:29-39

Dobson, S., May, T., Berriman, M., Del Vecchio, C., Fairlamb, A. H., Chakrabarti, D. et Barik, S. (1999). Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, Plasmodium falciparum: inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin-cyclosporin complex. *Mol Biochem Parasitol* **99**:167-81

Dubey, J. P. (1990). Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States. J Am Vet Med Assoc 196:259-62

Dubey, J. P., Lindsay, D. S. et Speer, C. A. (1998). Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* **11**:267-99

Dubremetz, J. F., Achbarou, A., Bermudes, D. et Joiner, K. A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during Toxoplasma gondii/host-cell interaction. *Parasitol Res* **79**:402-8

Dzierszinski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M. F. et 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**:574-82

El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S. T., Vial, H., Labesse, G. et Dubremetz, J. F. (2007). ROP18 Is a Rhoptry Kinase Controlling the Intracellular Proliferation of Toxoplasma gondii. *PLoS Pathog* **3**:e14

Eun, S. O., Bae, S. H. et Lee, Y. (2001). Cortical actin filaments in guard cells respond differently to abscisic acid in wild-type and abi1-1 mutant Arabidopsis. *Planta* **212**:466-9

Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mercer, W. E., Vande Woude, G. F., O'Connor, P. M. et Appella, E. (1997). Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6048-53

Frenkel, J. K. (1990). Toxoplasmosis in human beings. JAVMA 196:240-248

Fritz, C. C., Zapp, M. L. et Green, M. R. (1995). A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature* **376**:530-3

Garcia-Reguet, N., Lebrun, M., Fourmaux, M. N., Mercereau-Puijalon, O., Mann, T., Beckers, C. J., Samyn, B., Van Beeumen, J., Bout, D. et Dubremetz, J. F. (2000). The microneme protein MIC3 of Toxoplasma gondii is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell Microbiol* **2**:353-64

Gilbert, L. A., Ravindran, S., Turetzky, J. M., Boothroyd, J. C. et Bradley, P. J. (2007). Toxoplasma gondii targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells. *Eukaryot Cell* **6**:73-83

Gordon, J. L. et Sibley, L. D. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics* **6**:179

Guthridge, M. A., Bellosta, P., Tavoloni, N. et Basilico, C. (1997). FIN13, a novel growth factor-inducible serine-threonine phosphatase which can inhibit cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **17**:5485-98

Hakansson, S., Charron, A. J. et Sibley, L. D. (2001). Toxoplasma evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *Embo J* **20**:3132-44

Hakansson, S., Morisaki, H., Heuser, J. et 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**:3539-47

Hanada, M., Ninomiya-Tsuji, J., Komaki, K., Ohnishi, M., Katsura, K., Kanamaru, R., Matsumoto, K. et Tamura, S. (2001). Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* **276**:5753-9

Hartwig, J. H., Bokoch, G. M., Carpenter, C. L., Janmey, P. A., Taylor, L. A., Toker, A. et Stossel, T. P. (1995). Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* **82**:643-53

Heintzelman, M. B. et Schwartzman, J. D. (1997). A novel class of unconventional myosins from Toxoplasma gondii. *J Mol Biol* **271**:139-46

Herm-Gotz, A., Weiss, S., Stratmann, R., Fujita-Becker, S., Ruff, C., Meyhofer, E., Soldati, T., Manstein, D. J., Geeves, M. A. et Soldati, D. (2002). Toxoplasma gondii myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *Embo J* **21**:2149-58

Hettmann, C., Herm, A., Geiter, A., Frank, B., Schwarz, E., Soldati, T. et 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**:1385-400

Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Oceguera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S. et Watanabe, N. (2004). Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science* **303**:2007-10

Highsmith, S., Polosukhina, K. et Eden, D. (2000). Myosin motor domain lever arm rotation is coupled to ATP hydrolysis. *Biochemistry* **39**:12330-5

Hishiya, A., Ohnishi, M., Tamura, S. et Nakamura, F. (1999). Protein phosphatase 2C inactivates F-actin binding of human platelet moesin. *J Biol Chem* **274**:26705-12

Howe, D. K. et Sibley, L. D. (1995). Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* **172**:1561-6

Ho-Yen, D. O. et Joss, A. W. L. (1992). HumanToxoplasmosis.

Hu, K., Mann, T., Striepen, B., Beckers, C. J., Roos, D. S. et Murray, J. M. (2002). Daughter cell assembly in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. *Mol Biol Cell* **13**:593-606

Huynh, M. H., Rabenau, K. E., Harper, J. M., Beatty, W. L., Sibley, L. D. et Carruthers, V. B. (2003). Rapid invasion of host cells by Toxoplasma requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *Embo J* **22**:2082-90

Ingebritsen, T. S. et Cohen, P. (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* **221**:331-8

Jewett, T. J. et Sibley, L. D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol Cell* **11**:885-94

Jewett, T. J. et Sibley, L. D. (2004). The toxoplasma proteins MIC2 and M2AP form a hexameric complex necessary for intracellular survival. *J Biol Chem* **279**:9362-9

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. et Holmes, K. C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**:37-44

Karasov, A. O., Boothroyd, J. C. et Arrizabalaga, G. (2005). Identification and disruption of a rhoptry-localized homologue of sodium hydrogen exchangers in Toxoplasma gondii. *Int J Parasitol* **35**:285-91

Kasahara, K., Nakayama, Y., Nakazato, Y., Ikeda, K., Kuga, T. et Yamaguchi, N. (2007). Src Signaling Regulates Completion of Abscission in Cytokinesis through ERK/MAPK Activation at the Midbody. *J Biol Chem* **282**:5327-39

Kerkhoff, E. (2006). Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol* **16**:477-83

Kerkhoff, E., Simpson, J. C., Leberfinger, C. B., Otto, I. M., Doerks, T., Bork, P., Rapp, U. R., Raabe, T. et Pepperkok, R. (2001). The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr Biol* **11**:1963-8

Khan, F., Tang, J., Qin, C. L. et Kim, K. (2002). Cyclin-dependent kinase TPK2 is a critical cell cycle regulator in Toxoplasma gondii. *Mol Microbiol* **45**:321-32

Kim, K. et Weiss, L. M. (2004). Toxoplasma gondii: the model apicomplexan. Int J Parasitol **34**:423-32

Kim, L., Butcher, B. A. et Denkers, E. Y. (2004). *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance. *J. Immunol.* **172**:3003-3010

Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E., Moomaw, E. W. et et al. (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* **378**:641-4

Klumpp, S., Selke, D., Ahlemeyer, B., Schaper, C. et Krieglstein, J. (2002). Relationship between protein phosphatase type-2C activity and induction of apoptosis in cultured neuronal cells. *Neurochem Int* **41**:251-9

Klumpp, S., Selke, D. et Hermesmeier, J. (1998). Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg2+: stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Lett* **437**:229-32

Klumpp, S., Selke, D. et Krieglstein, J. (2003). Protein phosphatase type 2C dephosphorylates BAD. *Neurochem Int* **42**:555-60

Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A. et Fuchs, E. (2003). ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* **115**:343-54

Koh, C. G., Tan, E. J., Manser, E. et Lim, L. (2002). The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr Biol* **12**:317-21

Kohler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D. et Roos, D. S. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* **275**:1485-9

Kovar, D. R. (2006). Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18**:11-7

Krendel, M. et Mooseker, M. S. (2005). Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* **20**:239-51

Kumar, R., Musiyenko, A. et Barik, S. (2005). Plasmodium falciparum calcineurin and its association with heat shock protein 90: mechanisms for the antimalarial activity of cyclosporin A and synergism with geldanamycin. *Mol Biochem Parasitol* **141**:29-37

Kusuda, K., Kobayashi, T., Ikeda, S., Ohnishi, M., Chida, N., Yanagawa, Y., Shineha, R., Nishihira, T., Satomi, S., Hiraga, A. et Tamura, S. (1998). Mutational analysis of the domain structure of mouse protein phosphatase 2Cbeta. *Biochem J* **332** (**Pt 1**):243-50

Laveran, M. (1900). Au sujet de l'hématozoaire endoglobulaire de Padda oryzivora. *Soc. Biol.* **52**:19-20

Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P. J., Vial, H. et Dubremetz, J. F. (2005). The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during Toxoplasma gondii invasion. *Cell Microbiol* **7**:1823-33

Lekutis, C., Ferguson, D. J., Grigg, M. E., Camps, M. et Boothroyd, J. C. (2001). Surface antigens of Toxoplasma gondii: variations on a theme. *Int J Parasitol* **31**:1285-92

Leriche, M. A. et Dubremetz, J. F. (1990). Exocytosis of Toxoplasma gondii dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol Res* **76**:559-62

Li, D., Wang, F., Lai, M., Chen, Y. et Zhang, J. F. (2005a). A protein phosphatase 2calpha-Ca2+ channel complex for dephosphorylation of neuronal Ca2+ channels phosphorylated by protein kinase C. *J Neurosci* **25**:1914-23

Li, J. L. et Baker, D. A. (1997). Protein phosphatase beta, a putative type-2A protein phosphatase from the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Eur J Biochem* **249**:98-106

Li, Y., Keller, D. M., Scott, J. D. et Lu, H. (2005b). CK2 phosphorylates SSRP1 and inhibits its DNA-binding activity. *J Biol Chem* **280**:11869-75

Lindenthal, C. et Klinkert, M. Q. (2002). Identification and biochemical characterisation of a protein phosphatase 5 homologue from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* **120**:257-68

Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. et Pollard, T. D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* **127**:107-15

Mamoun, C. B. et Goldberg, D. E. (2001). Plasmodium protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1beta and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity in vitro. *Mol Microbiol* **39**:973-81

Mamoun, C. B., Sullivan, D. J., Jr., Banerjee, R. et Goldberg, D. E. (1998). Identification and characterization of an unusual double serine/threonine protein phosphatase 2C in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **273**:11241-7

Mann, T. et Beckers, C. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite Toxoplasma gondii. *Mol Biochem Parasitol* **115**:257-68

Marchand, J. B., Kaiser, D. A., Pollard, T. D. et Higgs, H. N. (2001). Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* **3**:76-82

Marsolier, M. C., Roussel, P., Leroy, C. et Mann, C. (2000). Involvement of the PP2Clike phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **154**:1523-32

Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H. et Sugano, S. (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-κB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* **22**:3307-3318

McGough, A. (1998). F-actin-binding proteins. Curr Opin Struct Biol 8:166-76

McGough, A., Pope, B., Chiu, W. et Weeds, A. (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol* **138**:771-81

McGough, A. M., Staiger, C. J., Min, J. K. et Simonetti, K. D. (2003). The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett* **552**:75-81

Meissner, M., Reiss, M., Viebig, N., Carruthers, V. B., Toursel, C., Tomavo, S., Ajioka, J. W. et Soldati, D. (2002a). A family of transmembrane microneme proteins of Toxoplasma gondii contain EGF-like domains and function as escorters. *J Cell Sci* **115**:563-74

Meissner, M., Schluter, D. et Soldati, D. (2002b). Role of Toxoplasma gondii myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* **298**:837-40

Meskiene, I., Baudouin, E., Schweighofer, A., Liwosz, A., Jonak, C., Rodriguez, P. L., Jelinek, H. et Hirt, H. (2003). Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **278**:18945-52

Miller, S. A., Binder, E. M., Blackman, M. J., Carruthers, V. B. et Kim, K. (2001). A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of Toxoplasma gondii. *J Biol Chem* **276**:45341-8

Miller, S. A., Thathy, V., Ajioka, J. W., Blackman, M. J. et Kim, K. (2003). TgSUB2 is a Toxoplasma gondii rhoptry organelle processing proteinase. *Mol Microbiol* **49**:883-94

Mineo, J. R., McLeod, R., Mack, D., Smith, J., Khan, I. A., Ely, K. H. et Kasper, L. H. (1993). Antibodies to Toxoplasma gondii major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol* **150**:3951-64

Mital, J., Meissner, M., Soldati, D. et 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**:4341-9

Molestina, R. E., Payne, T. M., Coppens, I. et Sinai, A. P. (2003). Activation of NF- κ B by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I κ B to the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell Sci.* **116**:4359-4371.

Molestina, R. E. et Sinai, A. P. (2005) Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF- κ B activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection. *J. Cell Sci.* **118**:5785-5796.

Montoya, J. G. et Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. Lancet 363:1965-76

Mordue, D. G., Desai, N., Dustin, M. et 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**:1783-92

Morgan, T. E., Lockerbie, R. O., Minamide, L. S., Browning, M. D. et Bamburg, J. R. (1993). Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J Cell Biol* **122**:623-33

Morisaki, J. H., Heuser, J. E. et Sibley, L. D. (1995). Invasion of Toxoplasma gondii occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci* **108** (**Pt 6**):2457-64

Morrissette, N. S. et Sibley, L. D. (2002). Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in Toxoplasma gondii. *J Cell Sci* **115**:1017-25

Mullins, R. D., Heuser, J. A. et Pollard, T. D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6181-6

Ngo, H. M., Hoppe, H. C. et Joiner, K. A. (2000). Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends Cell Biol* **10**:67-72

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

Numata, O. (1996). Multifunctional proteins in Tetrahymena: 14-nm filament protein/citrate synthase and translation elongation factor-1 alpha. *Int Rev Cytol* **164**:1-35

Obuchowski, M., Madec, E., Delattre, D., Boel, G., Iwanicki, A., Foulger, D. et Seror, S. J. (2000). Characterization of PrpC from Bacillus subtilis, a member of the PPM phosphatase family. *J Bacteriol* **182**:5634-8

Ofek, P., Ben-Meir, D., Kariv-Inbal, Z., Oren, M. et Lavi, S. (2003). Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C alpha. *J Biol Chem* **278**:14299-305

Opitz, C., Di Cristina, M., Reiss, M., Ruppert, T., Crisanti, A. et Soldati, D. (2002). Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. *Embo J* **21**:1577-85

Ortega-Barria, E. et Boothroyd, J. C. (1999). A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J Biol Chem* **274**:1267-76

Ossorio, P. N., Schwartzman, J. D. et Boothroyd, J. C. (1992). A Toxoplasma gondii rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol Biochem Parasitol* **50**:1-15

Otto, I. M., Raabe, T., Rennefahrt, U. E., Bork, P., Rapp, U. R. et Kerkhoff, E. (2000). The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr Biol* **10**:345-8

Pardee, J. D. et Spudich, J. A. (1982). Purification of muscle actin. *Methods Cell Biol* 24:271-89

Patron, S. A., Mondragon, M., Gonzalez, S., Ambrosio, J. R., Guerrero, B. A. et Mondragon, R. (2005). Identification and purification of actin from the subpellicular network of Toxoplasma gondii tachyzoites. *Int J Parasitol* **35**:883-94

Pinna, L. A. et Donella-Deana, A. (1994). Phosphorylated synthetic peptides as tools for studying protein phosphatases. *Biochim Biophys Acta* **1222**:415-31

Poupel, O., Boleti, H., Axisa, S., Couture-Tosi, E. et Tardieux, I. (2000). Toxofilin, a novel actin-binding protein from Toxoplasma gondii, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Mol Biol Cell* **11**:355-68

Poupel, O. et Tardieux, I. (1999). Toxoplasma gondii motility and host cell invasiveness are drastically impaired by jasplakinolide, a cyclic peptide stabilizing F-actin. *Microbes Infect* 1:653-62

Que, X., Ngo, H., Lawton, J., Gray, M., Liu, Q., Engel, J., Brinen, L., Ghosh, P., Joiner, K. A. et 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**:25791-7

Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E. et Mullins, R. D. (2005). Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* **433**:382-8

Rabenau, K. E., Sohrabi, A., Tripathy, A., Reitter, C., Ajioka, J. W., Tomley, F. M. et 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**:537-47

Radke, J. R., Striepen, B., Guerini, M. N., Jerome, M. E., Roos, D. S. et White, M. W. (2001). Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of Toxoplasma gondii. *Mol Biochem Parasitol* **115**:165-75

Radke, J. R. et White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of Toxoplasma gondii using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Biochem Parasitol* **94**:237-47

Reichmann, G., Dlugonska, H. et Fischer, H. G. (2002). Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of Toxoplasma gondii tachyzoites identified by T cell clone. *Mol Biochem Parasitol* **119**:43-54

Reinberg, D. et Sims, R. J., 3rd (2006). de FACTo nucleosome dynamics. *J Biol Chem* **281**:23297-301

Reiss, M., Viebig, N., Brecht, S., Fourmaux, M. N., Soete, M., Di Cristina, M., Dubremetz, J. F. et Soldati, D. (2001). Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in Toxoplasma gondii. *J Cell Biol* **152**:563-78

Revenu, C., Athman, R., Robine, S. et Louvard, D. (2004). The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:635-46

Rogers, J. P., Beuscher, A. E. t., Flajolet, M., McAvoy, T., Nairn, A. C., Olson, A. J. et Greengard, P. (2006). Discovery of protein phosphatase 2C inhibitors by virtual screening. *J Med Chem* **49**:1658-67

Rozette, L., Dumètre, A., Couquet, C. Y. et Dardé, M. L. (2005). Séroprévalence de la toxoplasmose chez des ovins et des bovins en Haute-Vienne. *Epidémiol. et santé anim.* **48**:97-99

Russell, D. G. et Sinden, R. E. (1981). The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J Cell Sci* **50**:345-59

Saeij, J. P., Boyle, J. P. et Boothroyd, J. C. (2005). Differences among the three major strains of Toxoplasma gondii and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* **21**:476-81

Saeij, J. P., Boyle, J. P., Coller, S., Taylor, S., Sibley, L. D., Brooke-Powell, E. T., Ajioka, J. W. et Boothroyd, J. C. (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* **314**:1780-3

Saeij, J. P., Coller, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W. et Boothroyd, J. C. (2007). Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* **445**:324-7

Saffer, L. D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J. F. et Schwartzman, J. D. (1992). Localization of a Toxoplasma gondii rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J Protozool* **39**:526-30

Sanchez-Velar, N., Udofia, E. B., Yu, Z. et Zapp, M. L. (2004). hRIP, a cellular cofactor for Rev function, promotes release of HIV RNAs from the perinuclear region. *Genes Dev* **18**:23-34

Schatten, H., Sibley, L. D. et Ris, H. (2003). Structural evidence for actin-like filaments in Toxoplasma gondii using high-resolution low-voltage field emission scanning electron microscopy. *Microsc Microanal* **9**:330-5

Schuler, H. et Matuschewski, K. (2006). Regulation of apicomplexan microfilament dynamics by a minimal set of actin-binding proteins. *Traffic* **7**:1433-9

Schuler, H., Mueller, A. K. et Matuschewski, K. (2005a). A Plasmodium actindepolymerizing factor that binds exclusively to actin monomers. *Mol Biol Cell* **16**:4013-23

Schuler, H., Mueller, A. K. et Matuschewski, K. (2005b). Unusual properties of Plasmodium falciparum actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS Lett* **579**:655-60

Schumacher, N., Borawski, J. M., Leberfinger, C. B., Gessler, M. et Kerkhoff, E. (2004). Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain. *Gene Expr Patterns* **4**:249-55

Schwab, J. C., Beckers, C. J. et 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**:509-13

Schwarz, S., Hufnagel, B., Dworak, M., Klumpp, S. et Krieglstein, J. (2006). Protein phosphatase type 2Calpha and 2Cbeta are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial cells. *Apoptosis* **11**:1111-9

Schweighofer, A., Hirt, H. et Meskiene, I. (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* **9**:236-43

Shaw, M. K., Roos, D. S. et Tilney, L. G. (1998). Acidic compartments and rhoptry formation in Toxoplasma gondii. *Parasitology* **117** (**Pt 5**):435-43

Shaw, M. K. et Tilney, L. G. (1999). Induction of an acrosomal process in Toxoplasma gondii: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9095-9

Sibley, L. D., Hakansson, S. et Carruthers, V. B. (1998). Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration. *Curr Biol* **8**:R12-4

Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F. et Cesbron-Delauw, M. F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by Toxoplasma gondii. *J Cell Sci* **108** (**Pt 4**):1669-77

Sinai, A. P. et Joiner, K. A. (2001). The Toxoplasma gondii protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol* **154**:95-108

Sinai, A. P., Webster, P. et 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**):2117-28

Singer, R. A. et Johnston, G. C. (2004). The FACT chromatin modulator: genetic and structure/function relationships. *Biochem Cell Biol* **82**:419-27

Soldati, D., Dubremetz, J. F. et Lebrun, M. (2001). Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. *Int J Parasitol* **31**:1293-302

Stradal, T. E. et Scita, G. (2006). Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18**:4-10

Sun, D., Leung, C. L. et Liem, R. K. (2001). Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J Cell Sci* **114**:161-172

Takekawa, M., Maeda, T. et Saito, H. (1998). Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *Embo J* **17**:4744-52

Tan, K. M., Chan, S. L., Tan, K. O. et Yu, V. C. (2001). The Caenorhabditis elegans sex-determining protein FEM-2 and its human homologue, hFEM-2, are Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase phosphatases that promote apoptosis. *J Biol Chem* **276**:44193-202

Tardieux, I., Baines, I., Mossakowska, M. et Ward, G. E. (1998a). Actin-binding proteins of invasive malaria parasites and the regulation of actin polymerization by a complex of 32/34-kDa proteins associated with heat shock protein 70kDa. *Mol Biochem Parasitol* **93**:295-308

Tardieux, I., Liu, X., Poupel, O., Parzy, D., Dehoux, P. et Langsley, G. (1998b). A Plasmodium falciparum novel gene encoding a coronin-like protein which associates with actin filaments. *FEBS Lett* **441**:251-6

Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S. J., Tang, K., Beatty, W. L., Hajj, H. E., Jerome, M., Behnke, M. S., White, M., Wootton, J. C. et Sibley, L. D. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen Toxoplasma gondii. *Science* **314**:1776-80

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R. et Weiss, L. M. (2000). Toxoplasma gondii: from animals to humans. *Int J Parasitol* **30**:1217-58

Tewari, R., Dorin, D., Moon, R., Doerig, C. et Billker, O. (2005). An atypical mitogenactivated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol* **58**:1253-63

Theriot, J. A. et Mitchison, T. J. (1993). The three faces of profilin. Cell 75:835-8

Uruno, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y., Egile, C., Li, R., Mueller, S. C. et Zhan, X. (2001). Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* **3**:259-66

Valere, A., Garnotel, R., Villena, I., Guenounou, M., Pinon, J.M. et Aubert, D. (2003). Activation of the cellular mitogen-activated protein kinase pathways ERK, P38 and JNK during *Toxoplasma gondii* invasion. *Parasite* **10**:59-64.

Waelkens, E., de Corte, V., Merlevede, W., Vandekerckhove, J. et Gettemans, J. (2000). A novel endogenous PP2C-like phosphatase dephosphorylates casein kinase IIphosphorylated Physarum fragmin. *Biochem Biophys Res Commun* **279**:438-44

Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T. et Cooper, J. A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* **11**:370-4

Wegner, A. et Engel, J. (1975). Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophys Chem* **3**:215-25

Wellington, A., Emmons, S., James, B., Calley, J., Grover, M., Tolias, P. et Manseau, L. (1999). Spire contains actin binding domains and is related to ascidian posterior end mark-5. *Development* **126**:5267-74

Wemmer, K. A. et Marshall, W. F. (2004). Flagellar motility: all pull together. *Curr Biol* **14**:R992-3

Wera, S. et Hemmings, B. A. (1995). Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* **311 (Pt 1)**:17-29

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

Xu, Y., Moseley, J. B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B. L. et Eck, M. J. (2004). Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* **116**:711-23

Yamaguchi, H., Durell, S. R., Feng, H., Bai, Y., Anderson, C. W. et Appella, E. (2006). Development of a substrate-based cyclic phosphopeptide inhibitor of protein phosphatase 2Cdelta, Wip1. *Biochemistry* **45**:13193-202

Zhou, X. W., Blackman, M. J., Howell, S. A. et Carruthers, V. B. (2004). Proteomic analysis of cleavage events reveals a dynamic two-step mechanism for proteolysis of a key parasite adhesive complex. *Mol Cell Proteomics* **3**:565-76

Zhou, X. W., Kafsack, B. F., Cole, R. N., Beckett, P., Shen, R. F. et Carruthers, V. B. (2005). The opportunistic pathogen Toxoplasma gondii deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. *J Biol Chem* **280**:34233-44

PUBLICATION

BJ www.biochemj.org



The toxofilin-actin-PP2C complex of *Toxoplasma*: identification of interacting domains

Gaelle JAN*†‡§, Violaine DELORME*†‡§||, Violaine DAVID*†‡§, Celine REVENU¶, Angelita REBOLLO**, Xavier CAYLA†† and Isabelle TARDIEUX*†‡§1

*Institut Cochin, Département des Maladies Infectieuses, Paris, F-75014 France, †INSERM U567, Paris, F-75014 France, ‡CNRS, UMR 8104, Paris, F-75014 France, §Université Paris 5, Faculté de Médecine René Descartes, UM 3, Paris, F-75014 France, ¶The Scripps Research Institute, Immunology Department, La Jolla, CA 92122, U.S.A., ¶Institut Curie UMR 144, Laboratoire de Morphogenèse et Signalisation Cellulaires, Paris, F-75248 France, **INSERM U543, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, F-75013 France, and ††INRA-CNRS UMR 6175-Université de Tours-Haras Nationaux, IFR 135, Nouzilly, F-37380 France

Toxofilin is a 27 kDa protein isolated from the human protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, which causes toxoplasmosis. Toxofilin binds to G-actin, and *in vitro* studies have shown that it controls elongation of actin filaments by sequestering actin monomers. Toxofilin affinity for G-actin is controlled by the phosphorylation status of its Ser⁵³, which depends on the activities of a casein kinase II and a type 2C serine/threonine phosphatase (PP2C). To get insights into the functional properties of toxofilin, we undertook a structure–function analysis of the protein using a combination of biochemical techniques. We identified a domain that was sufficient to sequester G-actin and that contains three peptide sequences selectively binding to G-actin. Two of these

sequences are similar to sequences present in several G- and Factin-binding proteins, while the third appears to be specific to toxofilin. Additionally, we identified two toxofilin domains that interact with PP2C, one of which contains the Ser⁵³ substrate. In addition to characterizing the interacting domains of toxofilin with its partners, the present study also provides information on an *in vivo*-based approach to selectively and competitively disrupt the protein–protein interactions that are important to parasite motility.

Key words: actin, peptide-spot mapping assay, protein-protein interaction, pyrene actin assay, serine/threonine phosphatase, toxofilin.

INTRODUCTION

The human protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, together with other members of the Apicomplexa phylum, invade their host cell by an active process that markedly differs from the passive uptake induced by invasive bacteria [1]. Following host cell entry, the parasite resides within a sub-cellular compartment called the parasitophorous vacuole. The parasite-driven remodelling of this compartment allows molecular exchanges to take place between the host cell and the parasite, thereby promoting subsequent parasite development [2,3]. The massive multiplication of *T. gondii* tachyzoites within this vacuole ends by host cell lysis and active parasite egress, which leads to parasite dissemination [4,5]. These events are associated with potentially severe or lethal pathologies, especially when they occur in the brain of immunocompromised humans or during fetal development (for a review see [6,7]).

The tachyzoite actively enters its host cell by developing a force that relies on actin polymerization [8] and myosin activation [9,10]. This force is generated upon contact with the host cell, but the signalling underlying parasite actin polymerization remains unclear. A key role has been ascribed to a micronemal protein, MIC2, which is secreted on the parasite surface upon parasite–host cell contact, links the parasite motor to the extracellular cues and is translocated rearwards by the motor as the parasite moves forward [11,12]. The glycolytic enzyme aldolase has been found to selectively associate with the MIC2 tail and with actin, thereby forming a direct bridge between MIC2 and actin [13].

We previously identified a 27 kDa T. gondii protein called toxofilin, which can bind to both mammalian and parasite actin. *In vitro* assays performed with mammalian actin demonstrated that toxofilin sequesters actin monomers and thus controls filament elongation [14]. We also characterized a type 2C serine/ threonine phosphatase (PP2C) that co-purifies with the actin–toxofilin complex and selectively dephosphorylates toxofilin at Ser⁵³, thereby increasing toxofilin affinity to G-actin [15].

A central question remains as to whether toxofilin acts on mammalian actin, Toxoplasma actin or both. Several results argue in favour of toxofilin targeting host cell actin. We have described a major apical localization of toxofilin in tachyzoites, in particular in intracellular stages of the parasite, an observation consistent with the recent identification of toxofilin as a rhoptry protein following a proteomic analysis of rhoptry contents [16]. Indeed, toxofilin, which carries an N-terminal peptide signal sequence, is likely to be secreted during cell invasion and to act locally on the host cell cortical actin during parasite penetration of the cell. On the other hand, we cannot also exclude a role for toxofilin on parasite actin dynamics. Our immunolocalization studies showed that toxofilin is also located beneath the plasma membrane and at the posterior end of invading tachyzoites. Recent data obtained with tagged versions of toxofilin expressed via its own regulatory sequences confirmed these observations (results not shown and [16]).

In the present study, using a combination of biochemical techniques, we identified the interacting domains of toxofilin with both partners, i.e. PP2C and mammalian actin. Our findings show that besides controlling actin polymerization by sequestering actin monomers via its first coil–coiled region, toxofilin also binds to G-actin through its N-terminal domain.



Abbreviations used: PP2C, type 2C serine/threonine phosphatase; GST, glutathione S-transferase; IPTG, isopropyl β-p-thiogalactoside; HPTR, histidine patch thioredoxine; IAEDANS, *N*-iodoacetyl-*N*-(5-sulfo-1-naphthyl)ethylenediamine; TBS, Tris buffered saline; HRP, horseradish peroxidase. ¹ To whom correspondence should be addressed (email tardieux@cochin.inserm.fr).

EXPERIMENTAL

Preparation of recombinant proteins

We expressed recombinant full and truncated toxofilin in the BL21 strain of Escherichia coli using the GST (glutathione S-transferase) Gene Fusion System (GE Healthcare U.K.). The full-length toxofilin was cloned into pGex6-p3 as described in [14] while CC1, CC1A, CC1Aa, CC1Ab, CC1B, CC1BCC2, NoCC and CC2 domains of toxofilin were prepared as follows (Figure 1A). The CC1 nucleotidic sequence was amplified using the forward primer 5'-GGCCGGATCCCAACAGGAACTAGGGCTGCTC-3' containing a BamHI site (underlined) and the reverse primer 5'-GG-CCGTCGACCCTCTGCTCGTTGAGGATTTG-3' containing a SalI site (underlined). For CC1A, the forward primer was the same as for CC1 and the reverse primer was 5'-GGCCGTCGACCT-CAGTTGCGAAAGATCCCTC-3' (the SalI site is underlined). For CC1B, the forward primer was 5'-GGCCGGATCCCCGG-AAACGAAGGCTTTGC-3' (the BamHI site is underlined) and the reverse primer was the same as for CC1. For CC1Aa, the forward primer was the same as for CC1 and the reverse primer 5'-GGCCGTCGACCGTGGCTCTGAGAATTTCGTC-3' was (the SalI site is underlined). For CC1Ab, the forward primer was 5'-GGCC<u>GGATC</u>CCAAAATTTGGACCTCAGGAAGTAC-3' (the BamHI site is underlined) and the reverse primer was the same as for CC1A. For CC1BCC2, the forward primer was the same as for CC1B and the reverse primer was the same as for toxofilin. For NoCC, the forward primer was the same as for toxofilin and the reverse primer was 5'-GGCCGTCGACGCGTGCTGC-GACGGAGGG-3'(the Sall site is underlined). Finally, CC2 was amplified using the forward primer 5'-GGCCGGATCCGA-TGCGAGTGGAGCATTAC-3' (the BamHI site is underlined) and the same reverse primer as for toxofilin. The PCR products were then ligated into the BamHI and SalI sites of a pGex6-p3 polylinker. Protein expression was induced with either 0.2 mM (CC1, CC1A, CC1Aa, CC1Ab, CC1B and CC1BCC2) or 0.1 mM (NoCC, CC2 and toxofilin) IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside). Recombinant proteins were purified from bacteria lysed in PBS supplemented with 0.5% (v/v) Triton X-100 with or without 0.5 % (v/v) SB3-14 (myristyl sulfobetaine). After centrifugation at 20000 g for 20 min at 4°C, supernatants were incubated with Glutathione-Sepharose (GE Healthcare) for 3 h at 4 °C. The recombinant tagged-polypeptides were eluted in 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl and 10 mM reduced glutathione while in some cases, tags were cleaved off using PreScission Protease (GE Healthcare) for 4 h at 4°C. The HPTR (histidine patch thioredoxine)-PP2C (rPP2C) was prepared as described in [15] using Ni-NTA column chromatography (Qiagen). Following purification, polypeptides were dialysed against the buffer used for subsequent binding, titrated, supplemented with protease inhibitors and kept on ice until use.

Native gel assays

Native gel electrophoresis was carried out as described in [14] with a 7.5% acrylamide gel using G-actin prepared from F-actin labelled with 500 μ M IAEDANS [*N*-iodoacetyl-*N*⁻(5-sulfo-1-naphthyl)ethylenediamine; Molecular Probes]. IAEDANS-labelled G-actin (50 μ g) was incubated with or without equimolar amounts of recombinant GST–toxofilin, GST–CC1, GST–NoCC or GST–CC2 for 1 h at room temperature prior to electrophoresis. F-actin was used as a control.

G-actin binding assays

Rabbit muscle actin was purified from muscle acetone powder (Sigma) and prepared as described in [17]. It was diluted to $55 \,\mu M$

© 2007 Biochemical Society

in buffer A [2 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.2 mM Na2ATP, 0.1 mM CaCl2, 0.5 mM 2-mercaptoethanol and 0.005 % NaN3]. Purified rabbit muscle G-actin [4.2 µg (2 µM)] was incubated overnight at 4 °C with 4 µM of GST fusion proteins prepared in 50 µl of buffer B [10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl and 0.1 mM CaCl₂]. A 50% (v/v) slurry of Glutathione-Sepharose (30 µl) in buffer B was added to the mix which was supplemented with 1 mM dithiothreitol and 0.05% (v/v) Tween 20 (final concentrations) and incubated for 3 h at 4°C. The unbound fraction was collected by centrifugation and the beads were washed with buffer B supplemented with 0.05% (v/v) Tween 20. SDS eluate and fraction samples were analysed by SDS/PAGE [18] and Coomassie Blue staining. Western blotting using the anti-C4 actin monoclonal antibodies (Chemicon International) was performed as described in [14] except that the C4 antibodies were used at a 1:1000 dilution.

Competition assays for binding to G-actin

Purified rabbit muscle actin [$4.2 \ \mu g \ (2 \ \mu M)$] was incubated with or without 14.5 $\mu g \ (20 \ \mu M)$ of clarified CC1, 9 $\mu g \ (20 \ \mu M)$ of CC1A, 5.6 $\mu g \ (20 \ \mu M)$ of CC1Aa, 3.3 $\mu g \ (20 \ \mu M)$ of CC1Ab or a mix of CC1Aa and CC1Ab in 50 μ l of buffer B for 1 h at 4°C. CC1–actin and CC1A–actin mixes were added to 10.8 $\mu g \ (4 \ \mu M)$ GST–toxofilin while CC1A–actin, CC1Aa–actin and CC1Ab– actin mixes were also added to 8.2 $\mu g \ (4 \ \mu M)$ GST–CC1. All reactions were incubated overnight at 4°C. Samples were then treated as described for the G-actin binding assays. Eluate and unbound fractions were analysed by SDS/PAGE and Coomassie Blue staining. Controls were performed with CC1 and CC1A incubated with Glutathione–Sepharose under the experimental conditions.

Actin pyrene assays and polymerization assays

Three separate pyrene assays were performed as described in [14] using 2 µM of 20 % labelled G-actin. For additional polymerization assays, $12.6 \,\mu g \,(10 \,\mu M)$ of purified rabbit muscle G-actin was incubated with 12.3 μg (10 μ M) of clarified GST-CC1, 10.3 μ g (10 μ M) of GST-NoCC, 10.8 μ g (10 µM) of GST-CC1A, 9.8 µg (10 µM) GST-CC1Aa or 9.1 μ g (10 μ M) of GST-CC1Ab or the toxofilin domains without their GST tags in 30 µl of buffer A. Then, 100 mM KCl, 2 mM MgCl2 and 1 mM Na2ATP were added to induce polymerization of G-actin overnight at 4°C. Unpolymerized and polymerized actins were separated following ultracentrifugation at 70000 rev./min for 30 min at 4°C (rotor ILA 120.2, Beckman Coulter) and both fractions were analysed by SDS/PAGE and Coomassie Blue staining. In some experiments, 12.6 μ g (10 μ M) of G-actin was incubated with a mix of 4.4 μ g (10 μ M) of CC1 and 14.7 μ g $(10 \,\mu\text{M})$ of rPP2C prior to inducing actin polymerization. To examine the potential effect of NoCC on actin in G- conditions, similar assays were conducted without adding the polymerization conditions.

PP2C-binding assays

HPTR-tagged PP2C [$3.9 \ \mu g \ (2 \ \mu M)$] was immobilized on $10 \ \mu$ l of a 50% (v/v) slurry of Ni-NTA-agarose (Qiagen) washed in buffer C [$20 \ mM$ Tris/HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ and 0.01% (v/v) Triton X-100] for 2 h at 4 °C. Bound rPP2C was then incubated with the different domains of toxofilin for 1 h at 4 °C and the putative complexes were isolated by centrifugation (400 g, 4 min at 4 °C). The unbound fractions were recovered and the beads were washed with a 10 times volume of buffer D [$20 \ mM$ Tris/HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ and 0.01% (v/v)

713

Triton X-100]. SDS sample buffer eluates and fractions were then analysed by SDS/PAGE and Coomassie Blue staining.

PP2C-CC1-actin complex binding assays

rPP2C bound to Ni-NTA–agarose [3.9 μ g (2 μ M)] was incubated either first with the preformed CC1–actin complex in buffer A (1 h at 4°C) or sequentially with 2.3 μ g (4 μ M) of CC1 in buffer B (1 h at 4°C) followed by 3.4 μ g (2 μ M) of clarified G-actin in buffer B (1 h at 4°C). Following incubation, the resin was washed in buffer D and treated as described for the PP2C-binding assay.

Peptide-spot mapping

In order to identify the important amino acid residues of the CC1A polypeptide that could account for G-actin binding, we performed a peptide-spot assay using synthetic overlapping dodecapeptides spotted onto a cellulose membrane (Intavis AG). The entire sequence of CC1A was represented, and each peptide differed from the following by a shift of two amino acids. Before use, the membranes were wetted in distilled water then in TBS-T [Tris-buffered saline supplemented with 0.1 % (v/v) Tween 20] and saturated in TBS-T containing 3% (w/v) nonfat dried skimmed milk and 3% (w/v) BSA for 2h at room temperature (23°C). To detect toxofilin/CC1A-G-actin interacting sequences, membranes were then incubated with 1 µg/ml of biotinylated G-actin in buffer A supplemented with 1% (w/v) non-fat dried skimmed milk overnight at 4°C. After several washes in TBS-T, the membranes were incubated with streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) at a 1:2000 dilution (Upstate) for 2 h at room temperature. To detect toxofilin-PP2C interacting sequences, the toxofilin membranes were incubated overnight at 4 °C with 4 µg/ml of rPP2C in TBS-T supplemented with 1 % (w/v) non-fat dried skimmed milk. Membranes were washed in TBS-T, incubated first with an affinity purified polyclonal anti-T. gondii PP2C antibody at a 1:4000 dilution for 2 h at room temperature and secondly with anti rabbit-HRP secondary antibody (Jackson ImmunoResearch) at a 1:10000 dilution for 2 h at room temperature. Following extensive washes in TBS-T and TBS-T containing 0.2 % (v/v) Tween 20, positive spots were detected using the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Biotechnologies).

RESULTS

Toxofilin binds to G-actin via the CC1A domain and sequesters G-actin

To study the structure-function relationships of toxofilin, we performed a series of assays with purified mammalian actin. Sequence analysis of toxofilin predicts that the protein is globular with two coil-coiled regions (contained in the CC1 and CC2 domains respectively, see Figure 1A) and that it carries a signal peptide sequence at the N-terminal end. To map the toxofilin domains involved in actin binding, we first produced several polypeptides encompassing or not the coil-coiled regions (Figure 1A) and tested their binding properties to G-actin using pull-down assays and native gel electrophoresis. Since toxofilin was originally isolated using a native gel assay with IAEDANSlabelled actin [14], we used the same assay conditions to define the toxofilin regions that bind to actin. When fluorescently labelled G-actin (Figure 1B, lane a) was incubated with either full-length recombinant toxofilin or toxofilin truncated polypeptides CC1 (14.6 kDa), CC2 (5.5 kDa) or NoCC (7.5 kDa) prior to native gel electrophoresis, only toxofilin and CC1 induced a clear shift in actin migration (Figure 1B, lanes b and c). In contrast, NoCC and

CC2 did not similarly alter actin migration (Figure 1B, lanes d and e). Interestingly, NoCC addition to G-actin prevented part of the G-actin pool from entering the 7.5% acrylamide gel in a similar manner to when F-actin was loaded onto the gel (Figure 1B, lane f). This suggested that NoCC could also bind to G-actin and promote actin oligomerization or nucleation. Together these results indicated that the toxofilin binding site(s) for G-actin is located in the CC1 polypeptide and is sufficient to capture actin.

To narrow down the putative minimal G-actin-binding domain, the 14.5 kDa CC1 domain was cut into 8.9 kDa CC1A and 5.5 kDa CC1B polypeptides and we performed chromatography on Glutathione–Sepharose of GST fusion polypeptides preincubated with G-actin. As illustrated in Figure 1(C), only GST– toxofilin (lanes a–c), GST–CC1 (lanes d–f) and GST–CC1A (lanes g–i), but not GST–CC1B, GST–CC2 or GST (lanes j–r), were able to capture G-actin.

To confirm that the 8.9 kDa CC1A polypeptide could bind G-actin, we tested whether it could compete with either fulllength toxofilin or CC1 for binding to G-actin. Figure 1(D) shows a complete inhibition of actin binding to GST-toxofilin in the presence of a 5-fold molar excess of CC1 or CC1A (lanes b–d). Additionally, actin binding to GST-CC1 was fully prevented by a 5-fold molar excess of CC1A (lanes f and g). As controls, actin, CC1 and CC1A did not bind to the gluthatione matrix under our conditions (results not shown). Together, these data demonstrate that CC1A behaved as a competitor of toxofilin for the binding to G-actin suggesting that the toxofilin domain that binds G-actin is located in the CC1A domain.

We then tested whether the G-actin-binding property of CC1A was associated with a sequestering activity already described for the full-length toxofilin. To this end, we performed pyrene actin assays which demonstrated that both CC1 and CC1A polypeptides were sufficient to elicit a sequestering effect on G-actin (Figure 1E). The lower sequestering activity exhibited by CC1A in comparison with CC1 and assessed by the significant differences observed in steady-state values using the Student's *t* test (22.7 arbitrary units for CC1 and 62.8 arbitrary units for CC1A, representative of triplicates for three different experiments) is likely to result from a difference in CC1A and CC1 affinity to G-actin. In control, as expected from the pulldown assays, GST–CC2 did not modify the kinetics of actin polymerization (Figure 1F).

Three linear peptidic sequences within CC1A bind to G-actin

To identify the important amino acid residues of the CC1A polypeptide that could account for G-actin binding, we performed a peptide-spot assay using synthetic overlapping dodecapeptides spotted onto a cellulose membrane. The entire sequence of CC1A was represented, and each peptide differed from the following by a shift of two amino acids. When probed with biotinylated G-actin as described in the Experimental section, three series of spots were reproducibly detected (repeated 3 times) (Figure 2A). As seen in Figure 2(B), the spots numbered from 6 to 8 sharing the 'AGQAKAAA' sequence, bound to G-actin under the present experimental conditions. The spots 21-23 sharing the 'DEILRATQ' sequence and the spots 25-27 having in common the 'NLDLRKYE' sequence reacted the most strongly with Gactin (Figure 2A and 2B). Screening Uniprot/Swiss-Prot protein databases (216380 sequences May 2006) using the 'pattern' [19] and 'pattinprot' programs [20] identified a number of putative or well-characterized actin-interacting proteins that displayed high similarity (>70%) to the degenerated 'AGQA[K/R]AAA' (Table 1A) and 'DEIL[R/K]A[T/S]Q' motifs (Table 1B). For example, angiomotin, several mammalian myosins and



Figure 1 Toxofilin binds to G-actin via the CC1A domain

(A) Schematic representation of full-length toxofilin and toxofilin domains used throughout the present study. Amino acids are numbered on top of the schemes. Dashed lines represent the two coil-coiled domains. Tf, toxofilin. (B) A 7.5% acrylamide native gel assay was performed using 50 μ g of IAEDANS-labelled G-actin incubated without (lane a) or with equimolar amounts of recombinant GST-toxofilin (Garb.), GST-CC1 (lane d), GST-CC2 (lane d) or GST-CC2 (lane e), F-actin was loaded as a control (lane f). (C) G-actin binding assays were performed on immobilized GST-toxofilin (GST-Tf, lanes a-c), GST-CC1 (lanes d-f), GST-CC1A (lanes g-i), GST-CC1B (lanes j-I), GST-CC2 (lanes m-o) and GST alone (lanes p-r). Following overnight incubation, the resin was washed and bound proteins were eluted in SDS sample buffer prior to SDS/PAGE and Coomassie Blue staining. L indicates the total loboud fraction. The arrowhead indicates the position of G-actin. (D) Actin-binding competition assays were carried out on immobilized GST-toxofilin (GST-Tf) using G-actin preincubated without (lane b) or with CC1 (lane c) or CC1A (lane d) and on immobilized GST-CC1 using G-actin preincubated or not with CC1A (lanes g-g). Samples were treated as described for (C). L indicates the total lobound fraction. The presence of the competitive fragment is indicated above the gel photograph. (E) Pyrene actin polymerization kinetics in the presence or absence of 500 nM GST-CC1 (\Box) and GST-CC1A (\times) polypeptides using pyrene actin. Numbers on the right of the curves represent the actin steady-state values obtained 16 h after the assay. *The difference with the control values (O) are statistically significant at P = 0.05 (Student's *t* st), a.u., arbitrary units. (F) Pyrene actin polymerization kinetics in the presence or (O) are statistically significant at P = 0.05 (Student's *t* st), a.u., arbitrary units.

715



Figure 2 Toxofilin sequesters G-actin via the CC1A domain that contains three binding sites

(A) The entire CC1A amino acid sequence was represented on a cellulose membrane by successive spots of dodecapeptides shifted by two amino acids and then probed with biotinylated G-actin and HRP-conjugated streptavidin. (B) The sequences corresponding to positive spots using chemiluminescence (A) are presented and framed. The first amino acid of each lane is numbered on the left. (C) Actin-binding competition assays were performed on immobilized GST-CC1 using G-actin preincubated with CC1A (lanes a-c), with CC1Aa (lane d) or CC1Ab (lane e) or with a mix of CC1Aa and CC1Ab (lane f). Samples were treated as described for Figure 1. L indicates the total load and B indicates the total bound fraction. The presence of the competitive fragment is indicated above the gel photograph. Arrowheads on the left indicate the position of G-actin and GST-CC1 on the gel. (D) Actin polymerization assays were performed by adding 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ and 1 mM Na₂AIP to G-actin overnight at 4 °C and further centrifugation. Supernatants (S) and pellets (P) were subjected to SDS/PAGE followed by Coomassie Blue staining. Actin alone polymerized efficiently (lanes a-b) whereas G-actin incubated with GST-CC1 (lanes c-d) and GST-CC1A (lanes e-f) did not. In contrast, GST-CC1Aa (lanes g-h) and GST-CC1Ab (lanes i-j) failed to prevent actin polymerization.

Table 1 'Pattinprot'screening analysis of the UniProt/Swiss-Prot database with two toxofilin actin-binding motifs: (a) 'AGQA[K/R]AAA' and (b) 'DEIL[R/K]A[T/S]Q'

(a)

Primary accession number	Protein name	Sequence							
CAB72264 04VCS5 021624 090Y06 P05659 096064 P54939 P26039 09Y4G6 07ILX4 (b)	Toxofilin Angiomotin Coronin-like Myosin-9B Myosin-2 heavy Paramyosin Talin-1 chicken Talin-1 mouse Talin-1 mouse Talin-2 human Talin-2 mouse	A A A A A A A A A A A	GGG GG GG Skk	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	A I I A A A A A A A A	K/R K R R K K K a a	А А А А А А А	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
Primary accession number	Protein name	Sequence							
CAB72264 028046 060604 029297 028372 P06396 P13020 P20305 0965B3 06R891 035274 035274 08WXH0 P02588 P10246 09N0X4	Toxofilin Adseverin bovine Adseverin pig ADseverin pig ADF horse ADF human ADF mouse ADF pig Neurabin II human Neurabin II mouse Neurabin II nat Nesprin 2 Troponin chicken Troponin chicken Myosin 5C	D y y f y f y D D D g g v		rrrrfrhhhd		R/K R K K K K K K R R R R R R R R	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	T/S T S S T T T T T T T T T T S	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

talins were detected by the 'AGQAKAAA' motif. Several mammalian scinderins (also called adseverin) and mammalian actin-depolymerizing factors, which are all known to bind to G-actin, were identified by the 'DEILRATQ' motif. For this latter motif, myosin type II heavy chain, myosin Vc, skeletal muscle troponin C, neural spinophilin (neurabin-II) and the nuclear anchorage protein nesprin were also identified (Table 1B). In contrast, the third CC1A G-actin-binding motif identified only one known actin-binding protein in the database suggesting that the 'NLDL[R/K][R/K]YE' sequence is a more toxofilin-specific G-actin-binding motif. It is the microtubule–actin crosslinker MACF1 belonging to the spectraplakin family of cytoskeletal crosslinking proteins [21].

Based on these results, we performed competitive assays for binding to G-actin using two polypeptides from CC1A, named CC1Aa (Gln⁶⁹–Thr¹¹⁹) and CC1Ab (Gln¹²⁰–Ser¹⁴⁹) with GST– CC1A. As observed in Figure 2(C), addition of CC1A (lanes b and c) but not the addition of CC1Aa or CC1Ab (Figure 2C, lanes d–f) efficiently competed with GST–CC1 for binding to Gactin. Interestingly, a mixture of CC1Aa and CC1Ab could not restore the competitive property of CC1A, suggesting that the affinities of the two independent peptides for G-actin were lower than the affinity of the CC1A fragment and that the integrity of the sequence was required for binding to G-actin. Using an actin polymerization pull-down assay, we also tested whether CC1Aa and CC1Ab could prevent the polymerization of actin. As seen in Figure 2(D), the integrity of CC1A was required to fulfil the toxofilin-sequestering property.

NoCC binds to G-actin but does not sequester or nucleate G-actin

As presented above (Figure 1B), the 7.5% polyacrylamide native gel assay suggested that incubation of NoCC with G-actin partially transformed actin monomers into oligomers too large to enter the gel. Additionally, NoCC was found to bind to Gactin in a peptide-spot assay (results not shown). Therefore we



Figure 3 NoCC binds to G-actin and does not affect the rate and the amount of polymerization

(A) Actin binding assays were carried out using immobilized GST (lanes a and b) or immobilized GST–NoCC (lanes c and d) and samples were analysed by Western blotting using anti-actin antibodies (clone C4). (B) Actin polymerization kinetics in the presence or absence of 500 nM GST–NoCC (\diamond) or 500 nM GST–CC1 (\Box) polypeptides using pyrene actin. Numbers on the right of the curves represent the actin steady-state values obtained 16 h after the assay. "The differences with the control values (\bigcirc) are statistically significant at P = 0.05 (Student's *t* test). NS, not significant a.u., arbitrary units. (C) Actin polymerization assays were performed as described for Figure 2. Actin alone under polymerizing conditions (lanes a and b) and actin incubated with GST–NoCC in the same conditions (lanes c and d). Supernatants (S) and pellets (P) were subjected to SDS/PAGE and further Coomassie Blue staining. For each panel, the positions of actin and GST–NoCC are indicated with arrowheads on the left. (**D**) Actin nucleation assay in the presence or absence of 20 nM (\diamond) or 100 nM GST–NoCC (+) polypeptides using pyrene actin. As a positive control, villin was used at 20 nM (\triangle) a.u., arbitrary units.

investigated whether NoCC could capture G-actin in pull-down assays (n = 6). As assessed by Western blotting (Figure 3A), under the present experimental conditions, GST-NoCC captured a small but reproducible amount of G-actin (lanes c and d) whereas GST (lanes a and b) or GST-CC2 (results not shown) did not. Moreover, in agreement with the native gel data, we found that GST-NoCC did not significantly affect the kinetics of actin polymerization upon addition of salt, magnesium and ATP in a pyrene actin assay (Figure 3B). This result indicated that, at identical concentrations, GST-NoCC did not have the sequestering activity of CC1 (Figure 3B). As expected, steady-state values for the sequestering CC1 were statistically different from those obtained with both NoCC and control. However, we reproducibly noticed that the steady-state values of fluorescence intensity associated with the amount of F-actin were slightly lower upon addition of GST-NoCC. The samples were subjected to ultracentrifugation and gel electrophoresis. As shown in Figure 3(C), the amounts of F-actin were similar whether GST-NoCC was added or not.

Since GST–NoCC weakly captured G-actin, using the same pyrene actin assay, we investigated whether it could induce actin nucleation. Although the well-known actin-binding protein villin displayed a clear nucleating activity at 20 nM in the present experimental conditions, GST–NoCC was unable to do so at both 20 and 100 nM (Figure 3D). Finally, we further tested whether the Ser⁵³ carried by NoCC, and known to modulate toxofilin affinity to G-actin through phosphorylation/dephosphorylation, had any effect on actin nucleation or on the extent of actin polymerization and found no significant effect (results not shown).

© 2007 Biochemical Society

The CC1–G-actin complex binds to PP2C through CC1B but not through CC1A

We previously showed that PP2C binds the actin-toxofilin complex [15]. To define the interacting domains between the three partners, toxofilin, actin and PP2C, we performed a pull-down assay using purified recombinant parasite PP2C, rPP2C. rPP2C was pre-immobilized on Ni-NTA-agarose through its histidine tag and then incubated with or without toxofilin polypeptides and G-actin. We first tested whether the CC1 domain of toxofilin was sufficient to bind to both G-actin and to PP2C. As shown in Figure 4(A), the tripartite complex was formed in vitro using the CC1 domain. This occurred upon incubation of rPP2C with the preformed CC1-G-actin complex (CC1-G-actin) (Figure 4A, lane b) as well as upon sequential incubation of rPP2C with CC1 and then G-actin (CC1+G-actin) (Figure 4A, lane d) provided that magnesium was added to the mix in the latter situation. Since G-actin did not bind directly to PP2C under the present experimental conditions (Figure 4A, lane f), these data strongly suggested that toxofilin CC1 contains a PP2C-binding site distinct from the actin-binding sites. Of note, the presence of PP2C did not affect the sequestering effect of CC1 in our actin polymerization assay (results not shown).

To define better the interaction between toxofilin and PP2C, we incubated rPP2C with full-length or truncates of toxofilin. While full-length toxofilin and CC1 were trapped by rPP2C as expected (Figure 4B, lanes b and d), only polypeptides carrying the CC1B sequence (i.e. CC1B and CC1BCC2) interacted with

717



Figure 4 The CC1-G-actin complex binds to PP2C through CC1B but not through CC1A

(A) Immobilized rPP2C on Ni-NTA was incubated with either the preformed CC1–G-actin complex (lanes a and b) or sequentially with CC1 then G-actin (lanes c and d) or with G-actin alone (lanes e and f) for 1 h at 4°C. After extensive washings, Ni-NTA resin-bound proteins were eluted in SDS sample buffer and subjected to SDS/PAGE and Coornassie Blue staining. U indicates the total unbound fraction and B indicates the total bound fraction. Arrowheads on the left indicate the positions of G-actin, CC1 and rPP2C. (B) Immobilized rPP2C was incubated with toxofilin (Tf ; lanes a and b), CC1 (lanes c and d), CC1 (lanes c and d), CC1B (lanes g and h), CC1BCC2 (lanes i and j) or CC2 (lanes k and l). Samples were treated as described for Figure 4(A). The arrowhead on the left indicates the position of rPP2C.



Figure 5 Two toxofilin amino acid sequences bind to rPP2C using peptide-spot mapping

(A) The entire toxofilin amino acid sequence was represented on a cellulose membrane by spots of dodecapeptides shifted by two amino acids. The CC1B region is represented with dotted lines. The membrane was successively probed with rPP2C, polyclonal anti-PP2C antibodies and HRP-conjugated anti-rabbit antibodies. (B) The sequences corresponding to positive spots using chemiluminescence (A) are presented and framed and the first amino acid of each lane is numbered on the left. In the first series 28 amino acid positive sequence, the known PP2C substrate Ser⁵³ is shown in bold and underlined.

rPP2C (Figure 4B, lanes h and j). CC1A or CC2 polypeptides that lack the CC1B sequence did not bind to rPP2C (Figure 4B, lanes f and l). Similar results were obtained when we used the vertebrate purified recombinant *Xenopus* PP2C (results not shown).

Toxofilin displays two potential binding sites for PP2C within CC1B and NoCC respectively

To identify the important amino acid residues of toxofilin that could account for rPP2C binding, we performed a peptidespot assay on a nitrocellulose membrane spotted with synthetic overlapping dodecapeptides shifted by two amino acids that covered the entire toxofilin sequence. Membranes were probed with 4 μ g/ml of purified rPP2C as described in the Experimental section. Two series of spots were reproducibly detected. One containing the spots 83–87 localized within the CC1B domain (Figure 5A, dotted lines) consistent with the binding assay. Interestingly, the last three spots (85-87) displayed a stronger signal than the two previous ones (83-84) (Figure 5A) and corresponded to the 'KARKLFQRRHYHVTKQ' sequence (Figure 5B). Since no binding was observed for the CC1Acorresponding peptide spots, these data again agree with our binding assay (Figure 4B) that favours an interaction site for PP2C within the CC1B region of CC1. Besides CC1B, PP2C also bound strongly to a 28 amino acid long sequence comprised within the spots 14-22 'SVQLSEGMKRLSMRGRSPSPKRGRFESG' (Figure 5B). Interestingly, the signal intensity associated with spots 14-18 was stronger than the signal intensity observed for spots 19-22 (Figure 5A). Since spot 14 (SVQLSEGMKRLS) did not share any amino acid with the spots 21 and 22, it is likely that NoCC carries two independent but connected binding sites for PP2C. In addition, this second binding site within NoCC displays
at its C-terminal part the Ser⁵³ that we have previously shown to be phosphorylated by caseine kinase II and a substrate of PP2C.

DISCUSSION

The 27 kDa toxofilin has been characterized as a G- and Factin-binding protein in vitro using mammalian muscle actin and in heterologous systems such as mammalian cells. It was also found to tightly bind to parasite G-actin [14]. Phosphorylation of toxofilin on Ser53 by casein kinase II decreases its affinity for G-actin by 14-fold, and a type 2C phosphatase selectively dephosphorylates Ser53, thereby stabilizing the actin-toxofilin complex [15]. It is still unclear whether toxofilin targets parasite or mammalian actin or even both. Recent data from a rhoptry proteome analysis identified toxofilin as a rhoptry protein [16]. As such, toxofilin could be secreted from the secretory rhoptry organelle during host cell invasion, as has been shown for other rhoptry proteins which can remain in the vacuolar space or eventually be inserted into the parasitophorous membrane [22-24]. If toxofilin is released in the host cell cytoplasm, it is likely to act on the host cell actin to facilitate parasite progression through the host cell subcortical actin. In the present study, we used mammalian actin to undertake a structure-function analysis of toxofilin. We characterized toxofilin domains and amino acid sequences that account for the G-actin and PP2C binding properties.

Using native gel electrophoresis and pull-down assays, we demonstrated that toxofilin carries a domain that is sufficient for binding to G-actin and to elicit sequestration of actin monomers in an actin polymerization assay. We called this domain CC1A and it is located within a region of 9 kDa that encompasses the first coil-coiled domain. Using a peptide-spot mapping assay, we detected three series of overlapping peptides in CC1A that bind to G-actin. Screening of UniProt/Swiss-Prot protein data bases (216380 sequences May 2006) using 'pattinprot' with the common motif of these different overlapping peptides 'AGQA[K/R]AAA' provided more than 1000 hits (n=1054) when a 70% stringency threshold of similarity was applied, among which at least nine are well-known actin-binding proteins. This does not mean that such a sequence should be considered as a signature motif that accounts for the binding property to actin. It could however provide an indication for further and more accurate studies on proteins for which a putative binding property to actin has never been investigated so far or for proteins already reported to bind to actin. Peptide spot assays on peptides carrying systematic mutations were performed and the results prompted us to produce CC1 polypeptides into which we introduced single (Leu⁸¹, Lys⁸⁷ and Leu⁹¹), double and triple mutations in the 'ERLIAGQAKAAALQTVHQ' motif but none of these mutations prevented actin binding to CC1 in pull-down assays suggesting that other sites might be sufficient to capture G-actin (results not shown). By contrast, disrupting the 'DEILRATONLD-LRKYENL' in the middle of the sequence after Thr119 had a major effect on the actin-binding properties of CC1A, suggesting that this sequence represents a crucial site for actin binding. When this 'DEIL[R/K]A[T/S]Q' degenerated motif was analysed in silico, 487 sequences were identified among which were 14 well-characterized G- and/or F-actin-binding proteins such as members of the ADF/cofilin family, the gelsolin and adseverin families and the myosin superfamily. This analysis supports our experimental data with toxofilin. On the other hand, when the 'NLDL[R/K][K/R]YENL' motif was examined in silico, only one of the 400 proteins detected was indeed described as interacting with actin but also with microtubules [25] and possibly with intermediate filaments as well. It is the microtubule-actin

© 2007 Biochemical Society

crosslinker MACF1. It is tempting to speculate that toxofilin may act in regulating microtubule and actin cytoskeleton interactions to support the development of the vacuole throughout the intracellular life of *T. gondii*. The parasitophorous vacuole is known to rapidly relocate towards the nucleus after invasion in a microtubule-dependent process.

We also found additional regions of toxofilin with actin-binding properties, in particular the NoCC domain. In a native gel assay, NoCC addition did not induce a similar shift of G-actin as to CC1 but rather prevented actin from running into the gel probably as a result of larger complexes between NoCC and several actin molecules. However, NoCC did not display the sequestering effect elicited by CC1 or any detectable nucleating activity in the pyrene actin assay. These data strongly suggest that apart from CC1A, toxofilin exhibits additional actin-binding sites but with different binding features and properties. The complete resolution of the three-dimensional structure and a thermodynamic analysis would provide answers to these questions. Based on such threedimensional data, it would be informative to introduce mutations and to assay *in vivo* whether they have an impact on the parasite survival.

Since we previously reported that phosphorylation contributes to the toxofilin binding properties onto actin, and that PP2C co-purified in the actin-toxofilin complex, we also mapped the interactive regions of toxofilin with PP2C. In the present study, we show that the toxofilin region encoding the first coil-coiled domain, and closely linked to the C-terminal part of CC1A, bound to PP2C, as supported by both pull-down and peptide-spot mapping assays. An additional sequence in NoCC that bound to PP2C could represent two distinct but connected binding sites according to the peptide-spot assay. This sequence in NoCC also contains the amino acid Ser⁵³ previously shown to be a substrate of PP2C. When non-redundant protein databases corresponding to more than 3000000 sequences were screened with the 'LFQRRHYHVT' motif and imposing a 85 % stringency threshold in similarity, only toxofilin was pulled out whereas 17 hits were found when the stringency threshold for similarity was decreased to 70 %. Among these positive hits, none corresponded to a protein yet assigned as a PP2C partner. When the same screen was applied with a degenerated sequence for basic and alkyl phosphorylatable residues 'LFQ[R/K][R/K]HYHV[T/S]', we obtained only toxofilin at a 90% threshold and 34 hits at a 70% threshold of similarity. Unlike for many kinases or for the PP1 and PP2A serine/threonine phosphatases, there are no clear sequence 'signatures' for PP2C dephosphorylation targets although the presence of a basic N-terminal residue at position-3 and no proline residue adjacent to the C-terminal part of the phosphorylation have been shown to favour dephosphorylation by PP2C [26]. Toxofilin carries an arginine residue at position 50 and the absence of a proline residue after the Ser53 up to position 60 which is consistent with the theoretical favourable motif for being a PP2C substrate

Characterizing PP2C substrates is hampered by the lack of specific inhibitors or activators, although several major targets have already been identified. These are mainly related to the cell cycle [27,28] or to cell apoptosis with the Bcl-2 family pro-apoptotic member BAD [29]. Mammalian PP2Cs are also increasingly analysed for their role in the homoeostasis of the central nervous system as for example PP2C α interacts with calcium channels and contributes to synaptic transmission in neurons [30]. Therefore the dissection of a defining substrate such as toxofilin for the amino acid requirements that promote both PP2C binding and activity is among the first to be reported and should provide a useful reagent for both PP2C enzymatic characterization and broad modulatory molecule screening. In the

We thank Dr R. Ménard (Institut Pasteur, Paris, France) for helpful critical reading of the manuscript. We are grateful to Dr Fernando Rocal (Centro Nacional de Biotecnologia, Departamento de proteomica, UAM, Madrid, Spain) for providing us with the membrane spot material. This work was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (ATIP grant to I.T.) and by the Ministry of Research (ACI Microbiology grant to I.T. and X. C., number AMA03042KSA). G. J. was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique with a PhD fellowship (BDI, # NL/05/003).

REFERENCES

- Morisaki, J. H., Heuser, J. E. and Sibley, L. D. (1995) Invasion of *Toxoplasma gandii* occurs by active penetration of the host cell. J. Cell Sci. **108**, 2457–2464
- 2 Sinai, A. P., Webster, P. and Joiner, K. A. (1997) Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Taxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. J. Cell Sci. **110**, 2117–2128
- 3 Black, M. W. and Boothroyd, J. C. (2000) Lytic cycle of *Taxaplasma gondii*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 607–623
- 4 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
- 5 Hoff, E. F. and Carruthers, V. B. (2002) Is *Taxoplasma* egress the first step in invasion? Trends Parasitol. **18**, 251–255
- 6 Hill, D. and Dubey, J. P. (2002) Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. Clin. Microbiol. Infect. 8, 634–640
- 7 Montoya, J. G. and Liesenfeld, O. (2004) Toxoplasmosis. Lancet 363, 1965-1976
- 8 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
- 9 Dobrowolski, J. M., Carruthers, V. B. and Sibley, L. D. (1997) Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Taxaplasma gandii*. Mol. Microbiol. 26, 163–173
- 10 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
- 11 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
- 12 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
- 13 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

Received 30 August 2006/28 September 2006; accepted 3 October 2006 Published as BJ Immediate Publication 3 October 2006, doi:10.1042/BJ20061324

- 14 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
- 15 Deforme, V., Cayla, X., Faure, G., Garcia, A. and Tardieux, I. (2003) Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on *Toxoplasma gondii* toxofilin. Mol. Biol. Cell **14**, 1900–1912
- 16 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 17 Pardee, J. D. and Spudich, J. A. (1982) Purification of muscle actin. Methods Cell Biol.
 - 24, 271–289 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

18

- bacteriophage T4. Nature 227, 680–685 19 Cockwell, K. Y. and Giles, I. G. (1989) Software tools for motif and pattern scanning:
- program descriptions including a universal sequence reading algorithm. Comput. Appl. Biosci. 5, 227–232
- 20 Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. and Deleage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. Trends Biochem. Sci. 25, 147–150
- 21 Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A. and Fuchs, E. (2003) ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. Cell 115, 343–354
- 22 Beckers, C. J., Dubremetz, J. F., Mercereau-Puijalon, O. and Joiner, K. A. (1994) The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. J. Cell Biol. **127**, 947–961
- 23 Joiner, K. A., Bermudes, D., Sinai, A., Qi, H., Polotsky, V. and Beckers, C. J. (1996) Structure and function of the *Toxoplasma gondii* vacuole. Ann. N.Y. Acad. Sci. **797**, 1–7
- 24 Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P. and Boothroyd, J. C. (2005) Identification of the moving junction complex of *Taxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog. 1, e17
- 25 Sun, D., Leung, C. L. and Liem, R. K. (2001) Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. J. Cell Sci. **114**, 161–172
- 26 Pinna, L. A. and Donella-Deana, A. (1994) Phosphorylated synthetic peptides as tools for studying protein phosphatases. Biochim. Biophys. Acta 1222, 415–431
- 27 De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaiskou, A., Jessus, C. and Ozon, R. (2002) Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2: regulation by protein phosphatase 2C in Xenopus oocytes. J. Biol. Chem. 277, 28592–28600
- 28 Cheng, A., Ross, K. E., Kaldis, P. and Solomon, M. J. (1999) Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. Genes Dev. 13, 2946–2957
- 29 Klumpp, S., Selke, D. and Krieglstein, J. (2003) Protein phosphatase type 2C dephosphorylates BAD. Neurochem. Int. 42, 555–560
- 30 Li, D., Wang, F., Lai, M., Chen, Y. and Zhang, J. F. (2005) A protein phosphatase 2Cα-Ca²⁺ channel complex for dephosphorylation of neuronal Ca²⁺ channels phosphorylated by protein kinase C. J. Neurosci. **25**, 1914–1923

© 2007 Biochemical Society

SUMMARY

Toxoplasma gondii, the obligatory intracellular protozoan responsible of toxoplasmosis, belongs to the Apicomplexa phylum. Like the other members of this phylum, it has developed unique motile properties to locomote and to rapidly invade the cell in which it multiplies. Gliding and invasion are two mechanistically linked processes and depend on actin-myosin motor. In our laboratory, a protein, called toxofilin, which has only been identified in *T. gondii*, so far regulates the actin cytoskeleton dynamics by sequestering actin monomers, severing and capping actin filaments. The affinity of toxofilin for actin is regulated by phosphorylation/dephosphorylation mediated by a casein kinase 2 and a type 2C serine-threonine phosphatase (TgPP2C) respectively. In this thesis, I have focused on the study of the role of TgPP2C in the interaction between *T. gondii* and its host cell.

The first objective of my work was to dissect the molecular interactions between the three members of G actin – toxofilin – TgPP2C complex. Using different biochemical approaches, I have identified the toxofilin regions and residues critical for its binding to its partners. First, toxofilin possesses a domain sufficient to bind to and sequester G actin on polymerization assays. This domain, which was called CC1A, is 9 kDa region that contains coiled-coil domain. Three series of overlapping peptides, which are present in CC1A and are capable of binding to G actin, were detected. We also identified other regions in toxofilin that had different binding properties to actin, in particular in the NoCC domain. Secondly, we showed that the toxofilin region which carries the first coiled-coil domain and is located at the C-terminal part of CC1A, binds to TgPP2C. Another sequence, present in NoCC and carrying the serine 53 substrate of TgPP2C, also binds to the phosphatase.

The second objective of my thesis focused on the analysis of the TgPP2C functional properties in tachyzoites. Using an overexpression strategy, we first showed that TgPP2C acts during the process of parasite multiplication. Tachyzoites which overexpress the active, but not the inactive, TgPP2C do not normally develop and finally collapse within the parasitophorous vacuole. Moreover, they display an aberrant and giant nucleus, which suggest defaults in nuclear division or daughter cell budding. Interestingly, we also showed that TgPP2C was secreted by the parasite into the cytoplasm and the nucleus of the host cell. This secretion depends on the unique N-terminal domain of this phosphatase.

Finally, the third objective of my work was to study the role of TgPP2C in infected cells. We used ectopic expression of the phosphatase in mammalian cells to show that TgPP2C was involved in the cell cycle. Cells that express TgPP2C are indeed blocked in G₂/M phase. Dividing cells remain linked by a long cytoplasmic bridge which contains ADN and TgPP2C, and failed to separate suggesting cytokinesis impairment. Later, they display the characteristics of apoptosis. Moreover, we realized a yeast II hybrid screen to identify TgPP2C host partners. Several candidate proteins were obtained, among which Spire which possesses actin nucleation properties. We confirmed *in vitro* the interaction between TgPP2C and Spire. The next step of this study will be to characterize the TgPP2C effect on Spire and to understand the role of Spire in the tachyzoites development.

<u>Key words</u>: Toxoplasma gondii, type 2C serine-threonine phosphatase, protein-protein interaction, toxofilin, actin, cell cycle, secretion.

RESUME

Toxoplasma gondii, le protozoaire intracellulaire obligatoire responsable de la toxoplasmose, fait partie du phylum des Apicomplexa. Comme les autres membres de ce phylum, il a développé des propriétés mobiles particulières qui lui permettent de se déplacer et d'envahir très rapidement la cellule dans laquelle il se multiplie. Ces processus de locomotion et d'invasion sont dépendants du cytosquelette d'actine du parasite. Une protéine, la toxofiline, identifiée uniquement chez *T. gondii*, a été caractérisée au laboratoire comme étant capable de réguler la dynamique du cytosquelette d'actine. Plus précisément, la toxofiline séquestre l'actine monomérique, empêchant ainsi sa polymérisation. L'affinité de la toxofiline pour l'actine est modulée par phosphorylation/déphosphorylation par une caséine kinase 2 et une sérine-thréonine phosphatase de type 2C (TgPP2C). Mon projet de thèse a porté sur l'étude du rôle de la TgPP2C dans l'interaction entre *T. gondii* et sa cellule hôte.

Le premier objectif de mon travail a été de disséquer les interactions moléculaires entre les trois membres du complexe actine G – toxofiline – TgPP2C. J'ai ainsi identifié, par différentes approches biochimiques, les régions et les acides aminés de la toxofiline, critiques pour sa liaison avec ses deux partenaires. Tout d'abord, la toxofiline possède un domaine suffisant pour lier et séquestrer l'actine G dans des tests de polymérisation. Ce domaine, qui a été appelé CC1A, correspond à une région de 9 kDa comprenant un domaine en super hélice. Trois séries de peptides chevauchants, présents dans CC1A, capables de lier l'actine G, ont été plus précisément détectés. Nous avons également identifié d'autres régions de la toxofiline ayant des propriétés de liaison différentes à l'actine, en particulier dans le domaine N-terminal (NoCC). Le premier domaine en super hélice, et en position C-terminale de CC1A, lie la TgPP2C. Une autre séquence de plusieurs acides aminés, dans la région N-terminal et contenant la sérine 53, substrat de la TgPP2C, interagit avec la phosphatase.

Le deuxième objectif de mon projet de thèse a porté sur l'analyse des propriétés fonctionnelles de la TgPP2C dans le tachyzoïte. Par une stratégie de surexpression dans les parasites, nous avons tout d'abord montré que la TgPP2C jouait un rôle dans la multiplication du parasite. En effet, des tachyzoïtes qui surexpriment la forme active de la TgPP2C ne se divisent pas normalement dans la vacuole parasitophore et finissent par dégénérer. On observe des parasites anormaux avec un noyau géant, qui suggère un défaut dans la division nucléaire ou l'individualisation des cellules filles. Nous avons également mis en évidence que la TgPP2C est sécrétée par le parasite dans le cytoplasme et le noyau de sa cellule hôte. Cette sécrétion est dépendante du domaine N-terminal unique de 18 acides aminés de cette phosphatase.

Enfin, le troisième objectif de mon travail a consisté à étudier le rôle de la TgPP2C dans la cellule infectée. Par une approche d'expression ectopique de la phosphatase dans des cellules de mammifère, nous avons mis en évidence que la TgPP2C agissait au niveau du cycle de ces cellules. En effet, les cellules qui expriment la phosphatase parasitaire sont bloquées en phase G_2/M . Certaines cellules en division n'achèvent pas la cytocinèse et restent reliées par un long pont cytoplasmique contenant de l'ADN et la TgPP2C. A un temps plus tardif, elles présentent les signes caractéristiques d'une apoptose. D'autre part, nous avons réalisé un crible double hybride en levure afin d'identifier les partenaires hôtes de la TgPP2C. Plusieurs protéines candidates on ainsi été obtenues, dont la protéine Spire qui possède des propriétés de nucléation de l'actine *in vitro* et dont nous avons confirmé l'interaction avec la TgPP2C. La poursuite de cette étude permettra de caractériser l'effet de la TgPP2C sur Spire, et le rôle de cette dernière dans le développement des tachyzoïtes.

<u>Mots clés</u> : Toxoplasma gondii, sérine-thréonine phosphatase de type 2C, interaction protéineprotéine, toxofiline, actine, cycle cellulaire, sécrétion.