UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Virologie – Microbiologie - Immunologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Jean-Benjamin MURAT

Thèse dirigée par Mohamed-Ali HAKIMI et Hervé PELLOUX

préparée au sein du Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes (UMR 5163) dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Études biochimiques, structurales et fonctionnelles du complexe MARS de *Toxoplasma gondii*, une nouvelle cible thérapeutique

Thèse soutenue publiquement le **25 septembre 2014**, devant le jury composé de :

Mme Marie-Laure Dardé
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Limoges, Président
Mme Isabelle Tardieux
Directeur de Recherches, Paris, Rapporteur
M. Ermanno Candolfi
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Strasbourg, Rapporteur
M. Hassan Belrhali
Chercheur, Grenoble, Examinateur
M. Mohamed-Ali Hakimi
Directeur de Recherches, Grenoble, Co-directeur
M. Hervé Pelloux
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Grenoble, Directeur





Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le Professeur Hervé Pelloux et le Docteur Mohamed-Ali Hakimi qui m'ont accueilli dans leur équipe de recherche, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée et les moyens qui ont pu être mis au service de ce travail de thèse. J'espère pouvoir continuer à interagir avec votre équipe à l'avenir.

Je remercie Mme le Docteur Isabelle Tardieux et M. le Professeur Ermanno Candolfi d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, que votre expérience et votre expertise permettront de juger au mieux. Merci au Docteur Hassan Belrhali pour les conseils prodigués au cours des comités de suivi de thèse, et pour avoir accepté de juger l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Marie-Laure Dardé de me faire l'honneur de présider ce jury ; votre présence préfigure une réjouissante et, espérons-le, fructueuse collaboration à Limoges.

Je souhaite également remercier les membres actuels et passés de l'équipe Epigénétique et Parasites (Ali, Alexandre, Laurence, Dominique, Fabien, Aurélie, sans oublier Flore) pour leur bonne humeur et la qualité de leur accueil, qui ont facilité mon intégration et mon épanouissement au sein de l'équipe.

Il va également de soi que la réussite de cette intégration en recherche n'aurait pas été possible sans l'aide et la solidarité des membres de l'équipe de Parasitologie – Mycologie du CHU de Grenoble. Hervé, Bernadette, Claudine, Hélène, Muriel, Marie-Pierre, Odile, Cécile et bien-sûr mes incontournables voisins de bureau Danièle et Bernabé : je vous témoigne ici toute ma gratitude et mon amitié.

Bien entendu, une grande partie de ce travail aurait été difficile en l'absence de Jason van Rooyen, que je tiens à chaleureusement remercier pour sa compétence, sa simplicité, sa disponibilité, sa pédagogie et sa grande gentillesse. Ta présence m'a également permis de solliciter et améliorer mes compétences linguistiques. *From now on, I will no longer forget to RTFM... I wish you all the very best for the future. 'hope we'll meet again.*

Je remercie Bastien Touquet et le Dr Delphine Aldebert pour la mise à disposition de la plateforme de cytométrie en images, et leur aide à l'analyse des résultats. Merci Bastien pour ta contribution à ce travail (et pour la gestion efficace de l'équipe de foot du LAPM. Et le rapatriement sanitaire ! Mais au fait... qu'est-ce qu'il s'est passé ?).

Je n'oublie pas mes congénères thésards du LAPM, et notamment les bons moments passés à organiser la journée des doctorants.

Enfin, mes parents et proches m'ont soutenu constamment au cours de ces quatre années grenoblo-sappeyardes ; je souhaite ici leur témoigner toute mon affection.

Table des matières

Résumé	<u>.</u>	6
Mots cl	és	6
Summa	ry	7
Key wo	rds	7
Liste de	s figures	8
Liste de	s figures additionnelles	9
Liste de	s tableaux	9
Liste de	s abbréviations	10
Préamb	pule	12
Introdu	ction	14
I. 7	Toxoplasma gondii	14
1.	Historique et modes de contamination	14
2.	Cycle parasitaire	15
3.	La toxoplasmose humaine	17
4.	Options thérapeutiques : médicaments anti-Toxoplasma	18
5.	Positionnement taxonomique	29
6.	Organisation cellulaire spécifique	29
7.	Structure des populations	32
8.	Régulation de l'expression génique chez les Apicomplexes	34
II. F	Préambule à mon travail de thèse	39
1.	Des protéines toxoplasmiques exportées modulent l'expression gér	nique de la
cel	llule hôte	
2.	Une enzyme plasmodiale à activité cytokinique est un facteur de	e virulence
séo	crété	
3.	Un homologue de la protéine p43 serait présent chez <i>T. gondii</i>	41
Chapitre	e I : Les aminoacyl-ARNt synthétases et le complexe MARS chez T. gondii	43
I. L	es aminoacyl-ARNt synthétases	43
1.	Fonction d'aminoacvlation	43
2.	Contrôle de qualité de la réaction d'aminoacvlation	44
3.	Contingents subcellulaires	46
4.	Classification des aaRS	47
5.	Considérations évolutives	49
6.	Fonctions non canoniques	
7.	Association à des protéines non enzymatiques	
8.	Maladies liées à des dysfonctions des aaRS	
9.	Les aaRS chez les Anicomplexes	
и с	Composition protéique organisation et structure tridimensionnelle du	complexe
MAR [®]	Schez T. gondii	59
1	Introduction	59
1. 2	Résultats	
2. 2	Articlo	ور
з. Ш	Résultats additionnels	۵۵ مو
111.	Caractárisation des souches présentant une délétion de Te n42	0U Q1
1. ว	Immunomarquage de rOPS	LO
۲. ۲	Complexe en couche de tune II	04
5.	Complexe en souche de type il	ð4

IV. Discussion	85
1. Tg-p43 : une protéine d'architecture, mais pas une cytokine	85
2. Composition chez <i>T. gondii</i> : une nouvelle pierre à l'édifice de la con	naissance du
complexe MARS	85
3. Organisation du complexe	91
4. Interactions protéines-protéines : rôles des domaines conservés	et questions
sans réponses	94
5. Rôle du complexe TgMARS	96
Chapitre II : approche thérapeutique via le complexe MARS	101
I. Introduction	101
1. Contexte	101
Justification de l'étude de QRS en tant que cible thérapeutique	101
II. Travail personnel	105
1. Matériels et méthodes	105
2. Résultats	107
III. Conclusion	115
Conclusion générale	120
Bibliographie	121
Annexes	142

Résumé

Toxoplasma gondii, parasite digestif des Félidés, est l'agent de la toxoplasmose, maladie pouvant être grave voire mortelle en cas d'infection fœtale ou chez l'immunodéprimé. Les traitements actuellement disponibles permettent de prévenir ou traiter la plupart des cas, mais peuvent présenter un risque d'effets indésirables relativement sévères et ne permettent pas de détruire les kystes responsables de l'infection chronique et du risque de réactivation chez l'immunodéprimé. Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) sont des enzymes essentielles au mécanisme de traduction, où elles participent au chargement d'un acide aminé sur une molécule dédiée d'ARN de transfert, une étape initiale du processus de synthèse protéique.

Un gène codant une protéine homologue de p43, un partenaire protéique de certaines aaRS chez les Eucaryotes supérieurs, a été identifié dans le génome de *T. gondii*. La localisation subcellulaire post-invasion de Tg-p43 montre qu'il ne s'agit pas d'une cytokine sécrétée, contrairement à son homologue humaine ; au contraire, son immunopurification a révélé son association à quatre aaRS, les Méthionyl-, Glutamyl-, Glutaminyl- et Tyrosyl-ARNt synthétases, qui constituent donc le premier complexe multi-aaRS (MARS) décrit chez les parasites Apicomplexes, de localisation exclusivement cytoplasmique. La présence inattendue de la Tyrosyl-ARNt synthétase soulève plusieurs questions sur le plan de l'organisation et de l'assemblage du complexe. Des images de microscopie électronique et des analyses biochimiques soulignent l'hétérogénéité et la structure relâchée du complexe et confirment les récentes données issues des complexes MARS purifiés chez d'autres organismes. L'inactivation du gène *Tg-p43* n'induit pas de modifications phénotypiques majeures (capacité d'invasion, prolifération) ni de diminution de la virulence ou de la kystogénèse en modèle murin.

Les résultats sur la caractérisation du MARS ont été complétés par une approche thérapeutique. Un criblage *in vitro* de candidats-médicaments présélectionnés *in silico* pour inhiber la Glutaminyl-ARNt synthétase toxoplasmique a permis de mettre en évidence un composé parasitostatique, inhibiteur de la croissance des tachyzoïtes, avec une toxicité sur les cellules hôtes *in vitro* relativement faible.

Ce travail de thèse pose les bases moléculaires et structurales du complexe MARS chez *T. gondii*. Il permet également d'aborder dans une certaine mesure l'histoire évolutive de ce complexe. Sa fonction biologique reste cependant un mystère ; le rôle de Tg-p43 dans le contrôle post-transcriptionnel, voire d'autres fonctions biologiques, est probablement trop subtil pour être mesuré dans nos conditions expérimentales. Le versant thérapeutique de ce travail constitue une étude préliminaire pouvant servir de point de départ pour la recherche de médicaments anti-toxoplasmiques ciblant les aaRS, qui constituent assurément des cibles thérapeutiques intéressantes.

Mots clés

Toxoplasma gondii, aminoacyl-ARNt synthétases, complexe moléculaire, génétique moléculaire, chromatographie d'exclusion-diffusion, chromatographie d'affinité, microscopie électronique, criblage de candidat-médicaments

Summary

Biochemical, structural and functional studies of the *Toxoplasma gondii* MARS complex, a novel therapeutic target

Toxoplasma gondii, a parasite of felids gut, is responsible for toxoplasmosis, a disease that can induce severe sequelae or death in the foetus or immune-depressed patients. Currently available treatments can prevent or cure most of the cases, but are at risk for side effects and cannot suppress cysts, which cause the chronic disease and are responsible for disease when the immune status is altered. Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are essential for translation, by charging tRNA with cognate aminoacids, a preliminary step of the protein synthesis process.

A gene coding for a protein homologous to p43 (which interacts with a subset of aaRSs in higher eukaryotes) was identified in the genome of *T. gondii*. Following its epitope tagging, we show that Tg-p43 is not secreted nor exported beyond the vacuole as a cytokine, as it is for its human counterpart; however, biochemical analysis of the Tg-p43 interactome reveals four aaRSs as interacting partners, namely Methionyl-, Glutamyl-, Glutaminyl- and Tyrosyl-tRNA synthetases. This is the first description of the multi-aaRS (MARS) complex in the *Apicomplexa* phylum; it is strictly localized in the parasite cytoplasm. The unexpected presence of the Tyrosyl-tRNA synthetase in the complex raises several questions about how the complex is organised and assembled, and also evolved. Electronic microscopy along with size exclusion chromatography shows heterogeneity and loose structure of the complex, similarly to recent data characterizing higher eukaryotic complexes. Disruption of the complex by knocking-out of the gene *Tg-p43* does not induce detectable phenotypic modification, nor alterations of the virulence and cystogenesis in a murine model.

Alongside the study on the MARS complex, we used an *in silico* approach to screen for new compounds to inhibit *T. gondii* Glutaminyl-tRNA synthetase. We thus identified one parasitostatic compound that was able to significantly slow down parasite growth while having a relatively low *in vitro* toxicity against the human host cell.

The function of the MARS in *T. gondii* still remains unknown; the role of Tg-p43 in the posttranscriptional control or any other biological function is probably too subtle to be measured under our experimental conditions. However, our data help to some extent to better measure the evolutionary history of the MARS family. The therapeutic side of this work, although preliminary, may serve as a base for anti-*T. gondii* drug discovery focusing on aaRS inhibitors, which are obviously good candidate targets.

Key words

Toxoplasma gondii, aminoacyl-tRNA synthetases, molecular complex, molecular genetics, size exclusion chromatography, affinity chromatography, electronic microscopy, drug screening

Liste des figures

Figure 1. Cycle parasitaire de Toxoplasma gondii15
Figure 2. Arbre phylogénétique des Apicomplexes30
Figure 3. Composition cellulaire d'un Apicomplexe31
Figure 4. Modèle proposé pour l'expansion clonale des populations de T. gondii
Figure 5. Structure génétique de la population de <i>T. gondii</i>
Figure 6. Sécrétion de PfTyrRS40
Figure 7. La réaction d'aminoacylation catalysée par l'aminoacyl-ARNt-synthétase44
Figure 8. Représentation schématique d'un ARNt45
Figure 9. Domaines additionnels retrouvés au sein des aaRS et leurs protéines accessoires
chez l'Homme
Figure 10. Réaction de formation d'Ap₄A52
Figure 11. Composition des complexe MARS connus chez les Eucaryotes
Figure 12. Différents modèles bi- et tridimensionnels proposés pour représenter le complexe
MARS des Eucaryotes supérieurs92
Figure 13. Formule semi-développée du composé 73107
Figure 14. Evaluation de la rémanence et de la parasiticidie du composé 73108
Figure 15. Aspect des parasites sous traitement. Marquage anti-SAG1110
Figure 16. Aspect des parasites sous traitement. Marquage anti-SUMO111
Figure 17. Aspect des parasites sous traitement. Marquage anti-HDAC3112
Figure 18. Aspect des parasites sous traitement. Marquage anti-QRS113
Figure 19. Evaluation de l'efficacité sur souches de type I et de type II114
Figure 20. Evaluation de la toxicité sur fibroblastes115
Figure 21. Représentation schématique des domaines conservés et du niveau de désordre
prédits dans la structure des Glutaminyl-RS117
Figure 22. Alignement des séquences protéiques des domaines catalytiques et de liaison à
l'anticodon des Glutaminyl-RS humaine et toxoplasmique118
l'anticodon des Glutaminyl-RS humaine et toxoplasmique

Liste des figures additionnelles

Figure additionnelle 1. Effets du maintien en conditions extracellulaires sur le nombre de
parasites viables et fonctionnels81
Figure additionnelle 2. Evaluation <i>in vivo</i> de la virulence des souches Δ Tg-p4382
Figure additionnelle 3. Evaluation <i>in vivo</i> de la kystogénèse de la souche Pru∆Ku80∆Tg-p43.
Figure additionnelle 4. Vérification de la spécificité de l'antisérum dirigé contre rQRS84
Figure additionnelle 5. Immunopurification du complexe via Tg-p43-HA-FLAG en souche de
type II Pru∆Ku80

Liste des tableaux

Tableau I. Molécules utilisées dans le traitement de la toxoplasmose	22
Tableau II. Classification des aaRS	49

Liste des abbréviations

aaRS : aminoacyl ARNt synthétase ACP : acyl carrier protein ADN : acide désoxyribonucléique AIMP : aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein AMP : adénosine monophosphate AppppA ou Ap₄A : diadénosine tétraphosphate AP2/ERF : apetela2/ethylene response factor ATM : ataxia telangiectasia mutated ATP : adénosine-triphosphate ATR : ATM and Rad3 related Arc1p : aminoacyl-tRNA synthetase co-factor 1 protein ARNm : acide ribonucléique messager ARNt : acide ribonucléique de transfert miRNA : microARN siRNA : small interfering RNA RNAi : RNA interference CP1 : connective peptide 1 CE₅₀: concentration efficace 50 CREB : C-AMP response element-binding protein CT_{50} : concentration toxique 50 C-terminal : carboxy-terminal DHFR : dihydrofolate réductase dCMP : désoxycytidine monophosphate DMEM : Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium DMSO : diméthylsulfoxyde DOZI : development of zygote inhibited dUMP : désoxyuridine monophosphate EF1 : elongation factor 1 EGR1 : early growth response protein 1 eIF2 : eukaryotic initiation factor 2 EMAP II : endothelial monocyte-activating polypeptide II EPRS : glutamyl-prolyl-ARNt synthétase ERS : glutamyl-ARNt synthétase GAIT: IFN-γ-activated inhibitor of translation GCN : general control nonrepressed GST : glutathion S-transférase G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase HA : hémagglutinine HAUSP : herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease HDAC : histone déacétylase HEK293 : human embryonic kidney 293 HFF : human foreskin fibroblast HTH : motif de type hélice-tour-hélice HLH : motif de type hélice-boucle (loop)-hélice ICAM : intercellular adhesion molecule

ICGEB: international centre for genetic engineering and biotechnology IFN : interféron Ig : immunoglobuline LTCD4+ : lymphocytes CD4+ LZ : motif leucine zipper MARS : multi-aminoacyl tRNA synthetase complex MCP-1 : monocyte chimoattractant protein 1 MCP : MARS complex-associated protein MITF : microphtalmia-associated transcription factor MRS : méthionyl-ARNt synthétase MVP : membrane de la vacuole parasitophore μ M : micromolaire, μ mol.L⁻¹ nM : nanomolaire, nmol.L⁻¹ N-terminal : amino-terminal OB fold : domaine replié oligonucleotide / oligosaccharide binding OMS : Organisation Mondiale de la Santé PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide PCR : polymerase chain reaction PfDTD : Plasmodium falciparum D-Tyr-tRNA deacylase PSP : protéine sécrétée par le parasite P-S : association pyriméthamine - sulfamide QRS : glutaminyl-ARNt synthétase RF : domaine replié de type Rossmann-fold SEC : size exclusion chromatography TMP-SMX : association triméthoprime – sulfaméthoxazole SAGE : serial analysis of gene expression SAXS : small angle X-ray scattering SUMO : small ubiquitine-like modifier SAG1 : surface antigen 1 TGF : transforming growth factor TNF : : tumor necrosis facteor Trbp111 : tRNA binding protein 111 VCAM : vascular cell adhesion molecule VEGA : valyl-RS / elongation factor 1α / guanine exchange factors assembly VEGF : vascular endothelial growth factor YRS : tyrosyl-ARNt synthétase

Préambule

Ce document présente les travaux menés au cours des quatre années que j'ai passées au sein de l'équipe Épigénétique et Parasites de l'UMR 5163 (Université Joseph Fourier Grenoble I, CNRS) codirigée par le Pr Hervé Pelloux et le Dr Mohamed-Ali Hakimi.

La toxoplasmose est une maladie provoquée par l'infection par *Toxoplasma gondii*, parasite intracellulaire qui réalise son cycle reproductif sexué dans le tube digestif des Félidés (hôtes définitifs), permettant la dissémination du stade infectant, l'oocyste. Tout animal homéotherme ayant ingéré des oocystes matures peut développer une toxoplasmose aiguë, causée par la forme végétative du parasite, appelée tachyzoïte. La réponse immune de l'animal contaminé conduira à la formation de kystes, structures constituées par une paroi contenant la forme de latence du parasite appelée bradyzoïte, qui persistera à vie chez l'hôte intermédiaire. L'ingestion de kystes, principalement contenus dans les tissus nerveux périphériques (cerveau, rétine) et musculaires, est l'autre mode de contamination des hôtes définitifs et intermédiaires.

Toxoplasma gondii est un des parasites les plus étudiés, aussi bien en raison de son importance médicale et vétérinaire que parce qu'il constitue un modèle unicellulaire de choix pour les études de biologie cellulaire et moléculaire. L'exploration des mécanismes biologiques par la génétique est maintenant possible grâce à un génome parfaitement séquencé et annoté disponible sur la base de données en ligne ToxoDB. Une distribution quasi-ubiquitaire, une grande diversité d'hôtes, l'existence de réservoirs à la fois animaux, telluriques et hydriques, rendent inenvisageable son éradication. Parasite non spécifique de l'homme (contrairement à l'agent du paludisme, son proche parent), sa formidable capacité de dissémination associée à sa discrétion clinique conduisent à le considérer comme un des parasites les plus accomplis (1).

En introduction de ce document, je ferai quelques rappels bibliographiques puis décrirai le parasite *Toxoplasma gondii*, son mode de propagation ainsi que l'état de l'arsenal thérapeutique actuel. Enfin, j'expliquerai les raisons qui nous ont conduits aux thématiques explorées dans mon travail de thèse.

12

Dans un premier chapitre, j'introduirai le monde des aminoacyl-ARNt synthétases, famille d'enzymes autour de laquelle ce travail est centré, et en particulier leurs caractéristiques fonctionnelles. J'exposerai ensuite mes travaux de recherche, qui m'ont conduit à l'exploration du complexe multi-aminoacyl-ARNt synthétases chez *T. gondii*. Un article publié dans PLOS ONE contenant les principaux résultats de ces travaux sera précédé d'un résumé de l'article exposant les principaux résultats, augmentés de quelques données non publiées, complémentaires à cet article. Une discussion reprendra ces résultats et les confrontera à la littérature.

Un second chapitre introduira l'utilisation actuelle ou potentielle des aminoacyl-ARNt synthétases en tant que cible thérapeutique, puis les travaux concernant l'approche thérapeutique de notre travail de recherche seront décrits de manière académique (matériels et méthodes, suivis de résultats), avant une conclusion/discussion de ces travaux préliminaires.

Une courte conclusion générale sur les informations apportées par ces travaux terminera ce manuscrit.

Introduction

I. Toxoplasma gondii

1. Historique et modes de contamination

Toxoplasma gondii est un protozoaire parasite découvert accidentellement à l'institut Pasteur de Tunis par Charles Nicolle en 1908, alors qu'il cherchait un réservoir de Leishmanies dans le rongeur *Ctenodactylus gundi*.

Initialement, la connaissance de la pathogénie de T. gondii était essentiellement restreinte à la maladie congénitale issue de la transmission transplacentaire humaine et animale, avec la description d'une triade clinique : hydrocéphalie, choriorétinite et encéphalite (1). De rares cas d'infection disséminée chez l'adulte avaient été décrits, lorsque Sabin et Feldman publièrent en 1948 la mise au point du premier test sérologique permettant le diagnostic de la toxoplasmose, le « dye test » (ou test de lyse) (2). Cet outil permit alors d'entreprendre les premières études de prévalence de l'infection, et révélèrent une forte distribution du parasite, dans les populations humaines mais aussi de nombreux autres hôtes animaux, et permit de reconnaitre son implication comme facteur majeur dans les avortements du bétail (3). Il était peu probable que la seule transmission congénitale soit à l'origine d'une aussi large distribution. La relative résistance des bradyzoïtes à l'action d'enzymes protéolytiques rendait plausible l'idée d'une contamination par ingestion de kystes lors du carnivorisme (4), ces formes de latence enkystées étant retrouvées notamment dans les tissus musculaires et nerveux d'hôtes infectés. La présence du parasite chez les animaux uniquement herbivores posait cependant un problème de cohérence dans la compréhension du cycle parasitaire. Après avoir porté les premiers soupçons sur le chien, l'étude, inspirée, du contenu de fèces de chat permit de découvrir une nouvelle forme pouvant rester infectieuse dans l'environnement pendant plus d'un an, excrétée hors du tube digestif des félins, et nommée oocyste (5). L'infectiosité des oocystes fut confirmée expérimentalement chez la souris (6), épidémiologiquement par la survenue d'épidémies de toxoplasmose humaine associées à des contaminations environnementales, notamment des eaux de boisson (7-9), et sérologiquement par la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre ce stade (10,11). La présence d'oocystes sur les côtes est depuis quelques années reconnue comme

responsable d'une prévalence élevée de la parasitose chez certains mammifères marins, conséquence du lessivage des côtes contaminées (12).

2. Cycle parasitaire

Le cycle parasitaire complet ne fut pas compris avant les années 1970 et la découverte des stades sexués dans l'intestin du chat. Il est depuis lors très bien connu, et décrit comme l'association d'un développement asexué se déroulant chez l'hôte intermédiaire (la plupart des animaux à sang chaud) et donnant lieu à l'enkystement de bradyzoïtes dans les tissus, et d'une phase sexuée située dans l'intestin grêle des félidés (Figure 1).



Figure 1. Cycle parasitaire de *Toxoplasma gondii* (13)

Reprinted from Clin. Microbiol. Rev., 25, Robert-Gangneux F, Dardé ML, Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis, 264-296, Copyright 2012, American Society for Microbiology.

Lors de la phase asexuée chez l'hôte intermédiaire, *T. gondii* est présent sous deux formes : tachyzoïte et bradyzoïte. Le premier est responsable de la phase aiguë de l'infection, permettant la dissémination hématogène et l'infection cellulaire dans différents organes. Après adhésion à la cellule hôte, la phase d'invasion se poursuit par la formation d'une vacuole dite parasitophore qui contiendra le parasite à l'intérieur de la cellule, et jouera le

rôle d'interface entre les deux protagonistes. Après multiplication au sein de cette vacuole selon un mode singulier appelé endodyogénie (la réplication de l'ADN, une mitose, suivis de l'assemblage de 2 cellules filles et de la cytocinèse se font à l'intérieur de la cellule-mère, sans fission de cette dernière) jusqu'à l'obtention de 32 ou 64 éléments, la sortie active et synchrone des parasites peut entraîner la lyse de la cellule hôte. Un nouveau cycle d'invasion est alors possible (14).

Dans le cas d'une infection asymptomatique, parce que contrôlée par la réponse immunitaire (dès 2 à 3 jours après inoculation parentérale de tachyzoïtes chez la souris) quelques parasites migrent vers les tissus profonds où ils persisteront dans un état de latence/quiescence (15). Ce processus d'interconversion entraînera une modification morphologique et biochimique du parasite. Ce nouveau stade appelé bradyzoïte continuera à se répliquer de manière très ralentie au sein d'une paroi kystique. En l'absence d'altération de l'immunité, les kystes persistent à vie dans les tissus infectés sans manifestation délétère prouvée à ce jour, bien que de nombreuses spéculations aient lieu sur de possibles effets des kystes intracérébraux sur le comportement et la survenue de certaines pathologies psychiatriques (tendances suicidaires, schizophrénie) (16–18). Lors de l'ingestion d'un kyste par un carnivore, la paroi, sensible à l'action gastrique (acidité et protéolyse par la pepsine), sera rompue, libérant les bradyzoïtes (19).

La contamination de l'hôte définitif félidé par l'ingestion soit de kystes contenus dans l'alimentation carnée, soit d'oocystes présents dans l'environnement, entraînera une infection digestive et la production de formes morphologiquement différentes des stades présents chez l'hôte intermédiaire. Au sein des cellules de l'épithélium digestif, les parasites se multiplieront par endopolygénie. Une phase de schizogonie (division séquentielle des noyaux au sein d'une cellule unique) verra la succession de cinq stades asexués (stades A à E), puis une phase de gamogonie génèrera les formes sexuées (micro- et macrogamètes), dont la fusion engendrera un zygote diploïde. La lyse de l'entérocyte libèrera cet oocyste qui sera excrété dans les fèces, dans un délai allant de 3 à plus de 18 jours après infection, en fonction du mode de contamination initial (15). L'oocyste subira enfin une méiose au cours de la sporulation (phase de sporogonie) qui a lieu dans l'environnement, conduisant à la production de deux sporocystes, renfermant chacun 4 sporozoïtes. Cet oocyste pourra alors rester infectieux pendant plusieurs mois (20).

16

3. La toxoplasmose humaine

Chez l'homme, l'infection aiguë est généralement asymptomatique, ou bien ne nécessite pas de traitement médical. Cependant, dans certaines situations cliniques où la réponse immune est altérée (vie fœtale, immunosuppressions, infections intraoculaires), l'infection peut être grave, voire fatale.

La primo-infection pendant la grossesse peut avoir de graves conséquences pour le fœtus. Le passage transplacentaire du parasite en phase d'infection maternelle aiguë entraîne une toxoplasmose congénitale, dont la pathogénie va de l'infection asymptomatique ou bénigne à de graves symptômes (hydrocéphalie ou microcéphalie, encéphalite) ou séquelles (choriorétinite, calcifications intracrâniennes, retard de développement psychomoteur ou mental) et parfois à la mort fœtale intra-utérine (21). Le risque d'infection fœtale est directement corrélé à l'avancement de la grossesse lors de l'infection maternelle. La perméabilité chronologiquement croissante de la barrière placentaire entraine un risque d'environ 10 % de passage au premier trimestre de grossesse, de 30 % au deuxième et de plus de 60 % en fin de grossesse (23). A l'inverse, la gravité d'une infection intra-utérine est maximum pendant les premières semaines de grossesse, et les travaux de Desmonts montrèrent dès les années 1970 que plus de 80 % des enfants infectés pendant le troisième trimestre de grossesse sont asymptomatiques (24). L'atteinte de la rétine (choriorétinite) est une manifestation fréquente de la toxoplasmose congénitale, quel que soit le moment de l'infection, et qui peut survenir de manière retardée. Cependant, il est désormais admis que la choriorétinite peut être une manifestation de la primo-infection chez l'adulte (25). Une analyse systématique de la littérature publiée en 2013 dans le Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a conclu que la toxoplasmose congénitale représente une charge de morbidité considérable au niveau mondial, avec une incidence annuelle globale estimée à plus de 190 000 cas, équivalant à une charge de 1,2 million d'années de vie corrigées du facteur invalidité (26). Ce rapport met en évidence des disparités selon les régions mondiales, les taux les plus élevés ayant été observés en Amérique du Sud et dans certains pays du Moyen-Orient et d'Afrique à faibles revenus. Pour expliquer la variabilité de l'impact de la toxoplasmose congénitale, on peut notamment invoquer 1) la variabilité des expositions environnementale et alimentaire au parasite, 2) la variabilité de la virulence des génotypes de toxoplasme, et 3) la variabilité des mesures de prévention mises en œuvre. Si

les deux premières composantes sont dépendantes de la géographie et des habitudes (notamment alimentaires) des populations, les mesures de prévention résultent des choix politiques de prise en charge et de la capacité du pays à la financer.

La question de la toxoplasmose chez l'immunodéprimé concerne de plus en plus de patients, étant donnée l'intensité de l'immunodépression induite par les thérapeutiques antirejet actuelles utilisées lors des transplantations d'organes, et l'augmentation actuelle du nombre de transplantations réalisées. Chez ces patients, le risque d'infection grave focalisée ou disséminée provient soit de la réactivation d'un kyste chez un patient anciennement infecté, soit de la contamination par le biais d'un greffon contenant des kystes, notamment lors des transplantations cardiaques (27). Les patients bénéficiant d'une greffe de moelle osseuse sont quant à eux parmi les plus à risque d'une réactivation, étant donnée la profondeur et la durée de l'immunodépression chimio-induite. Globalement, les patients atteints d'hémopathies malignes semblent les plus fragiles, comme l'a montré le fort taux de létalité (plus de 95 %) observé lors une étude rétrospective multicentrique française des toxoplasmoses nécessitant une hospitalisation en unités de réanimation (28). A ces situations s'ajoute le contingent des immunosuppressions d'origine infectieuse : les patients contaminés par le VIH présentent en effet un risque corrélé au taux de Lymphocytes T CD4+ (LTCD4+), et donc à la maîtrise de l'infection par les antirétroviraux. Chez ces patients surviennent volontiers des réactivations entraînant dans la plupart des cas des encéphalites, bien que d'autres organes soient également concernés (notamment poumons et œil) (13).

4. Options thérapeutiques : médicaments anti-*Toxoplasma* actuels et perspectives

a) Prise en charge actuelle de la toxoplasmose

i. Toxoplasmose congénitale

En l'absence de vaccin efficace, la première des préventions consiste à éviter la contamination de la femme enceinte. Elle réside en l'observance d'une série de recommandations hygiéniques et alimentaires destinées d'une part à éviter la présence d'oocystes dans l'alimentation en provenance de fèces félins par l'intermédiaire de sols, eaux ou denrées alimentaires contaminés, et d'autre part à rendre non infectieux les éventuels kystes présents dans la viande par congélation ou cuisson à cœur (29).

Malgré cette prévention primaire, une infection chez la femme enceinte reste possible, et certains pays ont fait le choix de mettre en place un dépistage systématique de l'infection chez la femme enceinte. Comme l'infection par *T. gondii* est la plupart du temps asymptomatique, le diagnostic de l'infection chez la femme enceinte repose sur la réalisation systématique d'examens biologiques, et plus précisément sérologiques (recherche d'anticorps dans le sérum). La France fait probablement en la matière figure d'exemple rare, le dépistage étant réalisé de manière mensuelle, à la différence d'autres pays européens comme l'Italie, l'Autriche ou la Belgique, où il est trimestriel, ou encore la Pologne, la Suède et le Danemark, où aucun programme de dépistage n'existe (27,30). Aux USA, le dépistage maternel est complètement dépendant du choix de l'équipe réalisant le suivi médical de la patiente, certains auteurs pointant l'importance d'un changement des pratiques (31). Une transmission à l'enfant né de mère infectée pendant la grossesse sera également recherchée à la naissance (analyse du placenta par inoculation à la souris et PCR, et tests sérologiques sur le nouveau-né à la recherche d'anticorps IgG ou IgM néosynthétisés) et dans les mois suivant la naissance (suivi sérologique) (13,27).

Cette politique de dépistage de la mère et de l'enfant n'aurait cependant aucun effet en l'absence d'options thérapeutiques. En France, lorsqu'une infection pendant la grossesse a été diagnostiquée (apparition d'anticorps chez une femme préalablement séronégative) ou fortement suspectée (infection non datable, ou en période périconceptionnelle), la prise en charge est adaptée en fonction de la date de l'infection et du résultat de la recherche d'ADN parasitaire dans le liquide amniotique (si elle a pu être pratiquée). Une abstention thérapeutique sera la règle en cas d'infection antéconceptionnelle. Dans tous les cas d'infection post- ou périconceptionnelle, un traitement de la mère par spiramycine, présentant une grande sécurité d'emploi, sera instauré et poursuivi jusqu'à l'accouchement. Dans les cas d'infection fœtale prouvée (ADN parasitaire retrouvé dans le liquide amniotique) ou suspectée (infection en fin de grossesse), un traitement associant la pyriméthamine et un sulfamide (P-S) est généralement mis en place. L'efficacité de cette association est avérée, mais présente des risques d'effets indésirables sérieux et nécessite un suivi particulier et une supplémentation en folates. Les recommandations allemandes et autrichiennes diffèrent en ce qu'elles insèrent systématiquement un traitement de 4 semaines par P-S à la 17^{ème} semaine de grossesse (32). Enfin, dans certains cas d'atteinte

fœtale constatée par imagerie, une interruption thérapeutique de grossesse sera proposée. Chez le nouveau-né, lorsque la certitude d'une infection est acquise, l'enfant est traité par association P-S associée à un suivi radio-clinico-biologique, pendant 18 à 24 mois (33).

ii. Toxoplasmose de l'immunodéprimé

Chez l'immunodéprimé, les recommandations visant à éviter la contamination sont les mêmes que chez la femme enceinte, et une surveillance biologique sera mise en place, mais selon le risque évalué, une chimioprophylaxie pourra être instaurée d'emblée.

Pour les patients séropositifs pour le VIH et pour T. gondii, une prophylaxie est recommandée lorsque le taux de LTCD4+ est inférieur à 100/µL, jusqu'à ce que le taux remonte durablement (au moins 3 mois) au-dessus de 200/µL. Le traitement retenu dans cette indication est l'association triméthoprime – sulfaméthoxazole (TMP-SMX), en double dose (800mg – 160 mg par jour). Les patients non immunisés contre T. gondii et sans prophylaxie active (potentiellement prescrite dans le but de prévenir d'autres maladies opportunistes comme la pneumocystose) doivent être régulièrement testés sérologiquement lorsque leur taux de LTCD4+ descend sous cette limite (34). Le traitement curatif de première intention de l'immunodéprimé fait appel à l'association P-S, pour une durée minimale de 6 semaines. D'autres molécules peuvent être utilisées, toujours dans le cadre d'une association (35). En cas d'extension radiologique ou clinique, le traitement sera poursuivi (34). En plus d'une surveillance biologique (PCR dans le sang), le même choix prophylactique basé sur TMP-SMX sera fait chez les patients recevant une greffe de moelle osseuse, particulièrement ceux présentant un haut risque du fait d'une infection ancienne ou d'un traitement par immunosuppresseurs dans le cadre d'une maladie du greffon contre l'hôte. Le traitement sera maintenu pendant toute la durée de l'immunosuppression (36).

iii. Toxoplasmose de l'immunocompétent

Pour les atteintes oculaires, un traitement pourra être mis en place, mais seulement après évaluation au cas par cas de la balance bénéfice – toxicité, sachant que le traitement n'aura au mieux qu'un effet limitant sur la multiplication parasitaire pendant la phase de rétinite. Le traitement sera ici aussi l'association P-S, auquel sera généralement adjoint un antiinflammatoire corticoïde (37). L'évaluation prendra en compte d'une part les aspects cliniques et le risque pour la fonction visuelle, et d'autre part la preuve biologique d'une sécrétion intraoculaire d'anticorps (preuve sérologique par le calcul du coefficient de Desmonts ou l'utilisation de l'immunoblot, ou moléculaire par PCR quantitative dans l'humeur aqueuse ou le vitré) (32). La question de la prise en charge se pose davantage lors d'infections par des souches de génotypes dits atypiques, qui peuvent présenter une virulence très supérieure à celle attribuable aux souches appartenant aux lignées clonales habituellement retrouvées en Europe ou en Amérique du Nord (38). La pathogénie et le traitement de ces souches atypiques se rapprochent des caractéristiques des infections dues aux souches de génotypes « classiques » observée chez les sujets immunodéprimés.

b) Nécessité de nouveaux traitements antitoxoplasmiques

i. Un arsenal thérapeutique limité

Les médicaments actuellement utilisés sont en nombre limité et ont été introduits sur le marché il y a plusieurs décennies. Les protocoles habituels font généralement appel aux sulfamides, à la pyriméthamine, à la spiramycine pour les traitements thérapeutiques et à l'association TMP-SMX pour la prophylaxie (35). Quelques molécules alternatives peuvent être proposées, en cas d'intolérance à celles utilisées dans les protocoles standards, mais les niveaux de preuve d'efficacité sont inférieurs (39) et les indications pas toujours formalisées (Tableau I).

ii. L'efficacité du traitement actuel chez la femme enceinte est sujette à controverses

Il est globalement considéré dans les pays utilisant le dépistage systématique que la mise en place d'un traitement chez la femme enceinte victime d'une infection aiguë est pleinement justifiée. Cette attitude est confortée par la plus grande incidence de cas graves de toxoplasmose congénitale dans les pays où une approche diagnostique et thérapeutique standardisée n'est pas appliquée de manière systématique (31,40,41). Une étude américaine a observé 85 % d'atteintes sévères parmi les enfants atteints de toxoplasmose congénitale confirmée inclus (41) ; de telles valeurs, nettement supérieures à celles qui sont observées en Europe, rendent compte d'un impact médico-économique considérable (42).

Malgré ces données épidémiologiques globalement en faveur du dépistage et du traitement pendant la grossesse, la récurrence de biais méthodologiques et la difficulté à obtenir

Dénomination Commune Interna- tionale	Classe phar- macochimique	Cible / mode d'action	Indications mentionnées dans les <i>Résumés des Caractéristiques du Produit</i> des médi- caments commercialisés en France	Utilisation
Spiramycine	Macrolides	Machinerie traductionnelle de l'apicoplaste.	« Toxoplasmose de la femme en- ceinte. »	Toxoplasmose aiguë chez la femme en- ceinte, jusqu'au terme ou documenta- tion et/ou conviction d'une infection fœtale.
Pyriméthamine	Autre anti- infectieux (pyrimidique)	Voie de synthèse de l'acide tétrahydrofolique : inhibition de la dihydrofolate réduc- tase.	« Traitement de la toxoplasmose grave. »	Associée à un sulfamide : ·toxoplasmose aiguë chez la femme en- ceinte avec documentation ou convic- tion d'une infection fœtale ; ·enfant né avec toxoplasmose congéni- tale ; ·choriorétinite toxoplasmique de l'adulte ; ·encéphalite toxoplasmique du patient immunodéprimé.
Sulfadiazine	Sulfamides	Voie de synthèse de l'acide tétrahydrofolique : inhibition de la dihydroptéroate syn- thase.	« Traitement de la toxoplasmose, parti- culièrement chez l'immunodéprimé, en association habituellement avec la pyri- méthamine. Prévention des rechutes de toxo- plasmose viscérale de l'immunodépri- mé. »	Associé à la pyriméthamine.
Sulfadoxine	Sulfamides	Voie de synthèse de l'acide tétrahydrofolique : inhibition de la dihydroptéroate syn- thase.	Pas d'indication formelle.	Associé à la pyriméthamine : alternative à la sulfadiazine.

Tableau I. Molécules utilisées dans le traitement de la toxoplasmose (d'après (29,32,35,47–50))

Triméthoprime Sulfaméthoxazole	Autres anti- infectieux (pyrimidique) Sulfamides	Voie de synthèse de l'acide tétrahydrofolique : inhibition de la dihydrofolate réduc- tase. Voie de synthèse de l'acide tétrahydrofolique : inhibition de la dihydroptéroate syn- thase.	« Infections de l'adulte dues aux germes sensibles », parmi lesquels <i>T. gondii</i> . Mention de l'efficacité dans l'utilisation en prévention des infections à <i>Pneumo-</i> <i>cystis</i> , chez l'immunodéprimé, et no- tamment chez les patients infectés par le VIH et à risque de pneumocystose : « Dans ces cas, l'incidence de la toxo- plasmose cérébrale semble également diminuéo »	[Association fixe] Prophylaxie de l'immunodéprimé. Traitement curatif de la choriorétinite toxoplasmique de l'adulte.
Clindamycine	Lincosamides	Machinerie traductionnelle de l'apicoplaste.	Pas d'indication formelle ; mention « La clindamycine possède une activité in vitro et in vivo sur Toxoplasma gondii. »	Choriorétinite toxoplasmique de l'adulte. Associé au triméthoprime chez l'immunodéprimé en cas d'intolérance aux sulfamides.
Atovaquone	Hydroxy- naphto- quinones	Supposé : inhibition du trans- port d'électrons dans la chaîne respiratoire par fixa- tion au cytochrome b.	Pas d'indication.	Associée à la pyriméthamine ou à la sul- fadiazine : traitement curatif de seconde ligne de l'encéphalite de l'immunodéprimé.
Dapsone	Sulfones	Voie de synthèse de l'acide tétrahydrofolique : Inhibition de la dihydroptéroate syn- thase.	Pas d'indication.	Associée à la pyriméthamine : traitement curatif de seconde ligne de l'encéphalite de l'immunodéprimé.
Clarithromycine	Macrolides	Machinerie traductionnelle de l'apicoplaste ?	Pas d'indication formelle ; mention « La clarithromycine possède une activité <i>in</i> <i>vitro</i> et <i>in vivo</i> sur <i>Toxoplasma gondii</i> . »	Associée à la pyriméthamine : traitement curatif de seconde ligne de l'encéphalite de l'immunodéprimé.
Azithromycine	Macrolides	Machinerie traductionnelle de l'apicoplaste ?	Pas d'indication.	Associée à la pyriméthamine : traitement curatif de seconde ligne de l'encéphalite de l'immunodéprimé.

Tableau I (suite)

des échantillonnages de grande taille empêchent la plupart du temps de conclure de façon claire quant à l'efficacité de ces mesures. Ainsi, en 1999, une analyse de la littérature mettait déjà en évidence qu'un faible nombre d'études étaient suffisamment bien menées pour permettre d'évaluer l'efficacité du traitement chez la femme enceinte, et échouait donc à dégager un effet statistiquement favorable de ce traitement (43). Les études menées durant les quinze dernières années ont continué à susciter des interrogations sur l'efficacité du traitement prénatal, à la fois sur la transmission materno-fœtale et sur la gravité des séquelles fœtales (44–46). En 2007, une revue de 26 cohortes incluant 1438 mères infectées ayant bénéficié d'un dépistage prénatal concluait qu'en l'absence d'essai clinique randomisé de grande ampleur, il ne serait pas possible de conclure à un bénéfice du traitement prénatal sur le taux de transmission (51). L'efficacité sur les taux d'atteintes fœtales graves est également discutée : plusieurs études multicentriques européennes ont trouvé un effet protecteur du traitement pendant la grossesse vis-à-vis de la survenue de séquelles et de séquelles sévères (45,46,52), mais essentiellement dans le cas où le traitement est instauré précocement, c'est-à-dire dans les 4 semaines suivant l'infection maternelle (46). Certaines études ont échoué quant à elles à prouver un effet de la spiramycine sur la survenue de séquelles, oculaires ou neurologiques (53). Concernant le choix du médicament, l'association P-S présente une efficacité supérieure à la spiramycine pour l'éradication du parasite dans le placenta, puisque ce traitement a pour conséquence une détection plus rare du parasite dans cet organe (54). En revanche, les études observationnelles ne permettent pas de mettre en évidence un avantage du traitement P-S par rapport à la spiramycine en termes de réduction du risque oculaire et de survenue de séquelles intracrâniennes (53). Les dernières données françaises issues de la cohorte lyonnaise de femmes diagnostiquées entre 1987 et 2008 sont de nouveau en faveur du dépistage et du traitement (55). Elles présentent une diminution du taux d'infection néonatale et une amélioration de l'issue à 3 ans d'âge, chronologiquement corrélées à la mise en place du suivi et l'amélioration des méthodes diagnostiques anténatales (PCR dans le liquide amniotique). Malgré tout, la tendance française est actuellement à l'évaluation prospective de l'efficacité du traitement, avec l'essai thérapeutique Toxogest qui a pour but de comparer prophylaxie par spiramycine et par P-S, et pourrait déboucher sur une modification de l'attitude française (47).

iii. Pas de traitement permettant une « stérilisation parasitaire » avec destruction des kystes

Le risque toxoplasmique est paradoxal : chez la femme immunocompétente en âge de procréer, le risque concerne quasi-exclusivement les sujets non encore infectés. Au contraire, le risque pour les immunodéprimés réside le plus souvent dans la réactivation d'une toxoplasmose latente par réversion des formes de latence (bradyzoïte) en forme active (tachyzoïte). Or il n'est actuellement pas possible d'anticiper ce risque chez un patient séropositif pour la toxoplasmose qui développe une immunodépression.

Notre équipe a récemment travaillé sur la caractérisation d'un candidat-médicament, la molécule FR235222. Chez *T. gondii*, ce peptide tétracyclique inhibe l'histone déacétylase 3 (TgHDAC3). Les enzymes HDAC contrôlent le niveau d'acétylation des résidus lysines sur les queues des histones qui influent sur le degré de condensation de la chromatine et déterminent ainsi l'expression génique. *In vitro*, cette molécule s'est avérée capable non seulement d'inhiber la croissance de *T. gondii* à des concentrations très basses, de l'ordre du nanomolaire (nM), mais également d'induire la différenciation partielle des tachyzoïtes en pseudo-bradyzoïtes (56). Par ailleurs, le pré-traitement de kystes *ex-vivo* par FR235222 réduit drastiquement leur infectiosité chez la souris (57), ce qui serait cohérent avec l'apparente capacité de cette molécule à traverser la paroi kystique (résultats non publiés). Ces résultats constituent un espoir de développement de thérapeutiques permettant de « stériliser » parasitologiquement les individus porteurs de kystes, et donc à risque de réactivation potentiellement fatale en cas d'immunodépression d'origine infectieuse, maligne, ou chimio-induite.

iv. Une utilisation délicate

La principale difficulté dans la recherche de traitements efficaces réside dans la distance génétique faible entre l'Eucaryote dit « supérieur » humain et le parasite, également eucaryote. Cette proximité évolutive est un obstacle qui n'existe pas dans le domaine de la thérapeutique antibactérienne, et il est d'autant plus difficile de trouver des molécules à index thérapeutique suffisamment élevé pour constituer une piste thérapeutique. Par conséquent, les principales molécules aujourd'hui utilisées sont soit d'efficacité modérée, soit accompagnées d'effets indésirables potentiellement graves. Ainsi, si la pyriméthamine présente l'avantage d'une forte efficacité sur les tachyzoïtes vis-vis desquelles elle est parasiticide, son utilisation est rendue délicate par sa toxicité médullaire. Celle-ci est liée à son mécanisme d'action qui, de manière analogue à l'effet recherché sur la dihydrofolate réductase (DHFR) du parasite, intervient dans le métabolisme de l'acide folique chez l'humain, et, via la voie de biosynthèse de la thymidine, perturbe la production des lignées médullaires. Peuvent en résulter des effets hématologiques graves (thrombopénie, anémie macrocytaire, neutropénie voire agranulocytose) (47). A cette toxicité s'ajoutent les potentiels effets secondaires hématologiques dus aux sulfamides, dont les anémies hémolytiques chez les patients déficitaires en Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), et des allergies potentiellement sévères dont la fréquence peut aller jusqu'à 8 % des cas, contre-indiquant l'utilisation de cette classe d'anti-infectieux (58). La prévention de ces effets indésirables nécessite l'administration concomitante d'acide folinique et la surveillance resserrée de la numération globulaire. A la morbi-mortalité associée à la maladie s'additionne donc la morbidité accompagnant le traitement, d'autant plus élevée lorsque celui-ci dure plusieurs années.

v. Des médicaments potentiellement actifs sur les autres Apicomplexes

Etant phylogénétiquement proches, *T. gondii* et les espèces du genre *Plasmodium* partagent de nombreuses caractéristiques biochimiques et physiologiques. Par conséquent, certaines molécules classiquement utilisées comme antipaludiques sont officiellement indiquées dans le traitement de la toxoplasmose (35). Les candidats-médicaments visant l'un ou l'autre de ces parasites sont fréquemment étudiés de manière conjointe (59), et *T. gondii* est reconnu comme un bon modèle de validation de cible thérapeutique pour les autres parasites du phylum (60). Etant données les difficultés actuelles en termes de traitements antipaludéens liées à l'émergence de résistances aux différentes classes de molécules disponibles sur le marché (61,62), la recherche de candidats-médicaments chez *T. gondii* est susceptible de fournir des pistes de traitements du paludisme, actuellement responsable de plus de 200 millions de cas et environ 630 000 morts dans le monde en 2012, et d'un impact économique considérable dans les pays les plus touchés (63).

c) Perspectives thérapeutiques – développements récents

Comme exposé en 2012 par Rodriguez et Szajnman dans une revue des brevets déposés dans le domaine (35), la recherche de nouvelles molécules antitoxoplasmiques a conduit d'une part à tenter de développer de nouveaux composés au sein de familles pharmacologiques déjà connues, et d'autre part à explorer de nouvelles cibles thérapeutiques.

i. *Cibles thérapeutiques connues*

Dans la famille des inhibiteurs de la DHFR, des molécules relativement nombreuses, dérivant pour certaines de la pyriméthamine, d'autres structuralement plus proches du triméthoprime, ont été évaluées. Un de ces composés s'est notamment avéré 16 fois plus puissant que le triméthoprime, tout en gardant une sélectivité d'espèce semblable (64). Ces développements ont été facilités par l'utilisation de méthodes informatiques d'ancrage moléculaire (*docking*), ayant permis de réaliser des criblages moléculaires virtuels en fonction de l'activité prédite. Des dérivés lipophiles du priritrexime ont permis d'allier une forte sélectivité à la grande puissance de cette molécule, qui affiche une CE₅₀ (concentration conférant 50 % de l'effet maximal) de l'ordre du nM (65). L'exploration de cette famille de molécules, qui a déjà fait ses preuves en utilisation clinique, permet d'espérer rendre plus sûrs et moins lourds les traitements à l'avenir.

ii. *Cibles thérapeutiques connues dans d'autres parasitoses*

L'une des stratégies consiste à tester sur *T. gondii* des molécules développées ou déjà utilisées contre d'autres protozoaires. L'artémisinine, composé naturellement actif contre le paludisme (utilisé en médecine traditionnelle chinoise) et qui a donné naissance à la plus récente famille d'antipaludéens utilisables dans les crises graves, a ainsi été l'objet d'intenses recherches, en matière de thérapeutique anti-toxoplasmique. De nombreux dérivés ont été ciblés, dont certains ont ramené des résultats prometteurs, avec des concentrations efficaces *in vitro* de l'ordre du micromolaire (µM) (66).

Les voies de synthèse des isoprénoïdes, large famille de molécules parmi les plus répandues dans la nature, font également partie des axes de recherche thérapeutique anti-*T. gondii*. Ces métabolites jouent un rôle crucial dans la machinerie cellulaire de tous les organismes,

en raison de la multitude de processus cellulaires dans lesquels ils sont impliqués. Initialement connus comme cibles thérapeutiques chez les Trypanosomatidés, certaines enzymes impliquées dans ces voies métaboliques ont récemment été étudiées chez d'autres parasites pathogènes, et notamment chez *T. gondii* (67). Les azastérols, inhibiteurs connus de la $\Delta^{24(25)}$ -stérol méthyltransférase, montrent notamment une activité inhibitrice sur la croissance de tachyzoïtes qui pourrait potentialiser l'effet du traitement classique par P-S, permettre son utilisation à moindre dose et ainsi diminuer sa toxicité hématologique (68). Les bisphosphonates, classe pharmacologique utilisée dans le traitement de l'ostéoporose, et certains inhibiteurs de la squalène synthase, sont d'autres candidats-médicaments prometteurs (35).

iii. Cibles thérapeutiques innovantes

Certaines familles d'enzymes sont désormais considérées comme de potentielles cibles thérapeutiques anti-*T. gondii*, comme les dérivés de la molécule FR235222 qui ciblent l'histone déacétylase TgHDAC3 (57). Des dérivés de la pyrazolo-pyrimidine, inhibiteurs de la protéine kinase calcium-dépendante TgCDPK1, ont également montré une intéressante activité anti-invasion, à des concentrations très basses de l'ordre du nM (69).

L'auxotrophie de *T. gondii* pour la synthèse *de novo* des purines a conduit certaines équipes à s'intéresser à une enzyme essentielle de la voie de récupération des purines, l'adénosine kinase, et certains de ses ligands dérivés de la N⁶-benzyladenosine, capables d'inhiber la croissance du parasite à des concentrations de l'ordre de la dizaine de μ M (70).

Depuis la revue de Rodriguez et Szajnman de 2012, d'autres candidats-médicaments ont fait l'objet de publications récentes. Les β -carbolines sont des alcaloïdes naturels, dont l'effet sur l'invasion cellulaire et la croissance de tachyzoïtes ont été montrés à des concentrations de l'ordre du μ M, sans toxicité visible sur cellules humaines (71). Une équipe a récemment réussi à synthétiser des molécules pourvues d'une activité inhibitrice de la Thymidylate Synthase (TS) (enzyme de la voie des folates agissant en aval de la DHFR en catalysant la méthylation de la dUMP en dCMP (72)), avec une spécificité pour le parasite qui n'avait pas pu être atteinte auparavant (73). Cette innovation permet d'envisager l'utilisation combinée d'inhibiteurs de différentes voies de la synthèse des folates, de manière complémentaire aux inhibiteurs de la DHFR. Enfin, une avancée importante a été obtenue concernant les inhibiteurs de l'*enoyl-acyl carrier protein* (ACP) réductase, enzyme catalysant l'étape finale de chaque cycle d'élongation des chaînes d'acides gras. La molécule princeps, le triclosan, n'est pas hydrosoluble, mais la synthèse de dérivés a permis de modifier la pharmacocinétique de la molécule, et l'évaluation *in vivo* dans un modèle murin d'un de ces dérivés montrait une réduction significative de la charge parasitaire, par rapport au contrôle (74).

5. Positionnement taxonomique

Le parasite *Toxoplasma gondii* est classé sur des arguments ultrastructuraux et moléculaires dans l'embranchement des Apicomplexes (taxons amonts : supergroupe des Chromalvéolés, groupe des Alvéolés comprenant également Ciliés et Dinoflagellés) (75). Les Apicomplexes sont des Eucaryotes unicellulaires parasites intracellulaires obligatoires, classés traditionnellement en quatre classes, selon des considérations essentiellement phénotypiques : Coccidies, Piroplasmes, Grégarines et Hémosporidies (Figure 2) (76). Certains d'entre eux sont des pathogènes importants en médecine humaine, responsables de zoonoses ou d'infections strictement humaines (genres *Isospora, Cyclospora, Babesia, Cryptosporidium, Plasmodium*, et *Toxoplasma gondii*).

6. Organisation cellulaire spécifique

La cellule type qui caractérise les parasites du phylum possède un certain nombre de structures spécifiques, dont la plupart sont impliquées dans le mode de vie parasitaire de ces organismes (Figure 3). Pourvue d'une mitochondrie unique et tubulaire, d'un réticulum endoplasmique et d'un appareil de Golgi, mais dépourvue de lysosomes, cette cellule contient un organite caractéristique, l'apicoplaste. Cet organite résulte de l'endosymbiose secondaire d'une algue rouge par un ancêtre commun aux Apicomplexes et aux Dinoflagellés actuels (77). Il est indispensable au développement intracellulaire du parasite, probablement en raison de sa contribution à la synthèse des lipides et des isoprénoïdes (77,78).

La réussite intracellulaire de *T. gondii* est fortement liée à l'efficacité et la rapidité des processus d'invasion d'une part, et d'autre part à la formation d'une vacuole parasitophore. Tout en le protégeant des défenses cellulaires de son hôte, cette vacuole lui permet de créer un environnement singulier et propice à sa multiplication. Un certain nombre de spécificités de la cellule parasitaire extracellulaire, mobile et polarisée, permettent une telle réussite. Le



Figure 2. Arbre phylogénétique des Apicomplexes proposé par D.A. Morrison, basé sur les séquences complètes du gène de la petite sous-unité de l'ARNr (ARNr18S) (76) Reprinted from Trends Parasitol., 25, Morrison DA, Evolution of the Apicomplexa: where are we now?, 375-382, Copyright (2009), with permission from Elsevier.

processus d'invasion fait intervenir un moteur actine-myosine submembranaire qui, après adhésion des deux cellules, permet l'entrée active du parasite au niveau d'une interface entre le pôle apical parasitaire et la cellule hôte, nommée jonction serrée (*tight junction*). Cette jonction serrée sert à connecter les actines corticales des deux cellules, et d'ancrage pour que le parasite exerce sa force de traction basée sur la myosine. Elle permet également d'exclure de la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) les protéines membranaires de l'hôte (79).



Figure 3. Composition cellulaire d'un Apicomplexe, d'après (80) Reprinted from Curr. Opin. Microbiol., 16, Klinger CM, Nisbet RE, Ouologuem DT, Roos DS, Dacks JB, Cryptic organelle homology in apicomplexan parasites: insights from evolutionary cell biology, 424–431, Copyright (2013), with permission from Elsevier.

sécrétoires Par ailleurs, trois organites présents dans le cytoplasme des Apicomplexes interviennent de manière séquentielle lors de l'invasion par le parasite, de la formation de la vacuole parasitophore et en interférant avec les voies de signalisation et l'expression du génome de sa cellule hôte. Les micronèmes et rhoptries appartiennent au complexe apical (ou conoïde), tandis que les granules denses sont distribuées de manière aléatoire dans tout le cytoplasme (81). Les protéines de micronèmes, libérées dès le contact, sont impliquées dans la reconnaissance et l'adhésion à la cellule hôte. Le contenu des rhoptries, situées dans la partie antérieure du parasite, intervient ensuite dans la formation

de la membrane de la MVP et dans l'interférence avec les voies de signalisation de la cellule infectée. Les protéines de granules denses sont sécrétées pendant et après la phase d'invasion, et restent soit solubilisées dans la lumière de la vacuole, soit associées à la MVP, permettant sa maturation (82,83), ou bien encore exportées au-delà de la vacuole dans le cytoplasme voire le noyau de la cellule hôte (84,85).

Enfin, la réplication particulière du parasite, où les cellules filles sont assemblées *de novo* à l'intérieur du cytoplasme de la cellule-mère, fait intervenir un complexe membranecytosquelette particulier, le complexe membranaire interne (*inner membran complexe*), commun aux Apicomplexes mais également aux autres Alvéolés (80).

7. Structure des populations

Le genre *Toxoplasma* ne contient qu'une seule espèce, et les isolats étaient historiquement considérés comme fortement similaires. Les études moléculaires (polymorphisme de longueur de fragments de restriction, microsatellites) ont montré une clonalité très marquées, notamment en Amérique du Nord et en Europe, où trois lignées clonales, nommées type 1, 2 et 3, regroupaient la grande majorité des isolats (86). L'analyse du poly-



Figure 4. Modèle proposé pour l'expansion clonale des populations de *T. gondii* en Amerique du Nord et en Europe (87)

Quatre groupes clonaux (parmi lesquels les types 1, 2, 3 et 12) se sont répandus en Amérique du Nord. Trois croisements distincts entre la souche ancestrale II* et des souches parentales (α , β et γ) ont engendré les types 1, 3 et 12, respectivement.

Reprinted from Int. J. Parasitol., 41, Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, et al., Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America: 645–655. Copyright (2011) with permission from Elsevier.

morphisme par séquençage des introns de gènes de ménages a récemment conduit à décrire une quatrième lignée clonale, le type 12, où elle est fréquemment retrouvée dans la faune sauvage d'Amérique du Nord (87). Ces quatre lignées sont constituées de génotypes hautement similaires et présentant un faible taux de recombinaison. L'étude du polymorphisme génétique indique que ces lignées ont émergé au cours des 10 000 dernières années à la suite d'un unique croisement génétique (88) (Figure 4). Par rapport aux souches anciennes (1 million d'années), le succès de ces lignées serait lié à l'acquisition de l'infectiosité directe par voie orale sans recours au cycle sexué, permettant la transmission à travers différents hôtes, et conduisant à une expansion clonale. Même si l'épidémiologie est variable selon les pays, le génotype II est identifié de manière prédominante dans



Clade F

Figure 5. Structure génétique de la population de *T. gondii*, regroupée en six grands clades (A à F) contenant les 15 haplogroupes (nombres entourés). Caractères surlignés en jaune : souches représentatives de chaque haplogroupe.

Caractères noirs : souches non incluses dans les grands clades.

Reprinted from Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109, Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, et al., Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages: 5844–5849. Copyright (2012) with permission from National Academy of Sciences.

l'hémisphère Nord ; en France, il représente environ 90 % des cas de toxoplasmose donnant lieu à l'isolement d'une souche, qu'il s'agisse de cas de toxoplasmose congénitale ou de l'immunodéprimé (89,90). Au contraire, les souches retrouvées en Amérique du Sud présentent un profil tout à fait différent, constitué de lignées génétiquement divergentes présentant une grande diversité intra- et intergroupes, signes d'une recombinaison par reproduction sexuée significative dans ce sous-continent (91).

Plus récemment, l'analyse de près de 1 000 souches de multiples origines géographiques par l'utilisation combinée des différentes méthodes moléculaires a permis d'identifier 138 génotypes différents, regroupées en 15 haplogroupes définissant 6 clades (Figure 5).

En Amérique du Nord et en Europe, le génotype d'une souche est classiquement associé à un niveau de virulence. Celle-ci est habituellement définie en modèle murin après injection intrapéritonéale de tachyzoïtes ; cependant, la variabilité inter-espèces est forte et l'application du modèle murin à la pathogénie humaine reste délicate (38). Les souches de type I sont hautement virulentes, conduisant à la mort en moins de 10 jours, à de faibles inoculums (moins de 10 parasites). Au contraire, les souches des types II ou III sont considérées comme avirulentes, une inoculation de plus de 10³ tachyzoïtes n'étant pas létale mais induisant une infection chronique, associée pour le type II à la génération de kystes (38), et à une réponse immune pour le type III mais sans formation de kystes dans le cerveau (92). Cependant, les souches atypiques provenant d'Amérique du Sud ont été décrites comme beaucoup plus virulentes, et les cas d'infections graves et parfois mortelles, isolés ou sous forme d'épidémies, se sont multipliés dans la littérature depuis une dizaine d'années (93–98), sans que l'on puisse associer cette virulence à un génotype particulier, mais plutôt à une plus faible adaptation de ces souches à l'hôte humain (99).

8. Régulation de l'expression génique chez les Apicomplexes

Chez *T. gondii*, comme chez les autres Apicomplexes, les cycles parasitaires sont complexes, associant stades de latence et de prolifération chez de multiples hôtes. Au cours de ces cycles, les changements sont d'ordre morphologique, mais affectent également l'expression d'antigènes de surface et la mise en route de nouvelles voies métaboliques spécifiques à un stade parasitaire donné ; on estime entre 2 % et 5 % la proportion de gènes dont

l'expression est spécifique du stade parasitaire (100,101). Ces transformations radicales, mais également l'adaptation du parasite à un environnement non optimal lors des phases de vie extracellulaires, nécessitent un contrôle précis de l'expression des gènes à différents niveaux.

a) Régulation transcriptionnelle

La transcription chez *T. gondii* est extrêmement dynamique, avec de nombreux ARN messagers (ARNm) présents uniquement dans un seul stade. Les études du transcriptome du bradyzoïte de *T. gondii* ont montré une corrélation entre les niveaux d'ARNm et l'expression de protéines spécifiques de ce stade, ce qui suggère que les transitions d'un stade parasitaire à un autre chez les Apicomplexes sont gouvernées par des régulations au niveau transcriptionnel (102,103). L'analyse à grande échelle du transcriptome (*serial analysis of gene expression*, SAGE) a également mis en évidence des modifications radicales des pools d'ARNm au cours des différents stades parasitaires (100). Les altérations de la quantité des protéines pour un stade de développement donné sont maintenant corrélées aux niveaux d'expression de transcrits (données ToxoDB), ce qui renforce à une échelle génomique la contribution majeure des processus transcriptionnels à l'expression du génome.

Ces processus restent pour l'instant peu décrits et font face à un curieux paradoxe : nécessitant une régulation transcriptionnelle forte, les Apicomplexes semblaient quasiment dépourvus de facteurs de transcription avec des domaines de liaison à l'ADN typiques de ceux retrouvés chez les autres Eucaryotes (HTH, HLH, doigts de zinc), malgré la présence d'un nombre de gènes comparables et de voies de signalisation communes. Alors que la proportion de facteurs de transcription semble augmenter avec la complexité biologique de l'organisme, les Apicomplexes ne semblent pas suivre cette règle (104).

Une première réponse à ce paradoxe a été la découverte par analyse bio-informatique d'une grande famille de gènes codant des homologues au facteur de transcription végétal *Apetela2/ethylene response factor* (AP2/ERF), caractérisés par la présence d'un ou plusieurs domaines de liaison à l'ADN « AP2 » (105). La plupart de ces ApiAP2 sont très conservés entre espèces, mais certains semblent restreints à certaines espèces présentant une même spécificité d'hôte ou des particularités du cycle (comme la formation d'hypnozoïtes) (106). Leur acquisition est probablement une conséquence de l'endosymbiose ancienne d'un plaste non-photosynthétique, qui a abouti chez *T. gondii* à une expansion de cette famille

avec 68 membres contre 27 chez *P. falciparum*. Depuis leur découverte, la fonction et le *modus operandi* de plusieurs protéines ApiAP2 ont été étudiés. Leur expression chez *Plasmodium* est principalement corrélée au stade du cycle parasitaire asexué (105) ; un phénomène similaire est observé au cours du cycle cellulaire du tachyzoïte pour *T. gondii* (107). Ces protéines se lient à des séquences d'ADN spécifiques en amont des gènes, qui peuvent être multiples, suggérant une régulation transcriptionnelle d'un même gène par plusieurs ApiAP2 (108); ces régulations peuvent être positives ou négatives. Récemment, l'équipe de M. Llinàs a montré que la protéine PfAP2-G est essentielle pour la transition du parasite depuis le cycle réplicatif asexué vers le stade sexué ; la transcription du gène *pfap2-g* est elle-même réprimée lors du stade asexué (109). La découverte d'un second membre de cette famille, PfAP2-G2, qui est responsable d'une modulation de la gamétocytogénèse, indique que l'engagement dans le cycle sexué dépend en partie de ces protéines (110).

La deuxième réponse à notre paradoxe est la présence inédite chez ces parasites d'un vaste répertoire d'enzymes impliquées dans le remodelage physique et chimique de la chromatine et d'un « code histone » aussi sophistiqué que celui des mammifères (111,112). Le remodelage nucléosomal a un impact drastique sur la régulation de la transcription des gènes eucaryotes en jouant sur le niveau de compaction de l'ADN : plus la compaction est importante, plus la transcription est réprimée ; inversement, la décompaction se traduit par une activité transcriptionnelle intense. Les machineries de remodelage physique et chimique de la chromatine sont apparemment associées aux facteurs ApiPA2 qui les dirigent vers leurs gènes cibles (112,113). Parmi les diverses modifications possibles des histones, la régulation de l'acétylation des histones s'avère particulièrement cruciale pour déterminer les profils d'expression génique spécifiques des stades parasitaires. Ce type de régulation a été étudié ces dernières années par notre équipe, qui a montré que le facteur ApiAP2 TgCRC350 est associé à la déacétylase HDAC3 (114), et plus récemment que l'acétylase TgGCN5b est copurifiée avec plusieurs ApiAP2 (115).

b) Régulation post-transcriptionnelle

Cette corrélation transcriptome-protéome est partiellement contestée par l'analyse globale du niveau d'expression des transcrits et de l'abondance protéique au cours du cycle de développement de *Plasmodium*. Le Roch *et al.* ont montré des discordances d'intensité entre transcriptome et protéome, consistant en un décalage temporel entre les pics
d'intensité d'ARNm et de protéines (116). D'autres études abondent dans ce sens (117,118) et sont en faveur d'une action plus significative des mécanismes de régulation posttranscriptionnels.

Chez T. gondii comme chez Plasmodium spp., l'un des mécanismes de régulation posttranscriptionnels les plus étudiés ces dernières années se situe au niveau de l'initiation de la traduction. En 2006, Mair et al. ont détaillé la répression traductionnelle chez les gamétocytes femelles de Plasmodium médiée par l'hélicase DOZI (119). Dans ce stade parasitaire, cette enzyme s'associe à certains ARNm sous forme de complexes cytoplasmiques ; cette séquestration permet de retarder la traduction de plusieurs centaines de transcrits jusqu'à la fécondation. D'autres mécanismes impliquent la modulation de la phosphorylation de la sous-unité alpha du facteur eucaryote d'initiation de la traduction eIF2 (eIF2 α). Chez *Plasmodium*, la phosphorylation d'eIF2 α par la kinase IK1 constitue une réponse au stress dû à la privation d'acides aminés essentiels (120). L'action d'IK2 entraîne par ailleurs une répression de la traduction, permettant l'entrée du sporozoïte en phase de latence chez le moustique vecteur (121). Chez T. gondii, un déficit en phosphorylation de l'homologue de eIF2 α , TgIF2 α , entraîne un ralentissement du cycle lytique et un défaut de viabilité en conditions extracellulaires (122). Certaines kinases phosphorylant eIF2a, les GCN2 kinases, sont quant à elles activées en conditions de privation nutritive, entraînant l'arrêt de la traduction; ce mécanisme semble conservé chez les Apicomplexes pour permettre l'entrée en latence (123). Une autre kinase impliquée dans la réponse à l'accumulation de protéines mal repliées, PERK, participe de manière déterminante à la modulation essentiellement traductionnelle due au stress du réticulum endoplasmique (124). Au total, quatre kinases ont été identifiées affectant eIF2α chez T. gondii, dont l'activité de phosphorylation participe à l'adaptation au stress via le contrôle de la traduction (125).

Chez les Eucaryotes, la présence subcellulaire des granules de stress et des « P bodies » (*processing bodies*) dans le cytoplasme a été associée au stockage, voire la séquestration, et la dégradation des ARNm. Chez *T. gondii*, des agrégats d'ARNm évocateurs de granules de stress ont été observés pour la première fois en 2011 dans des tachyzoïtes extracellulaires en phase d'invasion ; ces granules, liées à des changements profonds dans la composition ionique du milieu, seraient déterminants pour la survie extracellulaire, l'invasion et la croissance (126). Notre équipe a localisé la protéine de régulation traductionnelle Argonaute

(TgAGO) sous forme de ponctuations cytosoliques, sans toutefois apporter la preuve d'une co-localisation avec des *P bodies* de *T. gondii*, qui n'ont pas été formellement identifiés jusqu'ici (127).

Récemment, d'autres familles d'ARN non codants, générés par clivage d'au moins 10 ARN de transfert (ARNt) principalement au niveau de la boucle anticodon, ont été mises en évidence chez T. gondii (128). Les résultats de comparaisons entre souches suggèrent un lien de cause à effet entre ce clivage, qui concerne probablement toute la gamme des ARNt, et une diminution de la vitesse de croissance, voire de la virulence. La mise en jeu de ce mécanisme en conditions hostiles (privation en tryptophane, acide aminé essentiel au développement intracellulaire, ou incubation en milieu extracellulaire, à températures non optimales) et l'accumulation de formes clivées dans les stades bradyzoïtes et oocystes suggère par ailleurs un rôle dans le déclenchement et le maintien en phase de latence du parasite. Des résultats similaires chez le parasite murin Plasmodium berghei montrent la conservation de ce phénomène au sein des Apicomplexes. Le mécanisme de régulation par les ARNt clivés n'est pas connu chez les Apicomplexes, mais l'analogie avec de récentes découvertes chez l'homme conduit à faire l'hypothèse d'un rôle de guide pour une machinerie alternative de dégradation des ARNm ciblés (129). Notre équipe a exploré les processus impliquant les petits ARN régulateurs et a ainsi mis en lumière un éventail très large de molécules riborégulatrices chez T. gondii, de type siRNA (small interfering RNA) ou miRNA (microARN). Les machineries RNAi (RNA interference) qui génèrent ces petits ARN (enzyme Dicer) ou les prennent en charge (protéine TgAGO) pour cibler les ARNm à réguler sont conservées chez les coccidies mais absentes chez tous les autres parasites du phylum (127,130). La protéine TgAGO a été copurifiée avec des complexes de répression de la chromatine, et notamment tous les composants du complexe majeur de régulation de la chromatine TgCRC (114), suggérant une possible implication de la machinerie d'ARN-interférence dans la formation et le maintien de l'hétérochromatine, comme cela est largement décrit chez la levure S. pombe (131). Si les mécanismes impliquant des ARN non codants (longs ou petits) sont suggérés par ces études, la démonstration de leur implication dans le développement parasitaire reste à établir.

II. Préambule à mon travail de thèse

1. Des protéines toxoplasmiques exportées modulent l'expression génique de la cellule hôte

A mon arrivée dans l'équipe en 2010, un des axes de recherche de l'équipe visait à mieux comprendre la communication entre le parasite et sa cellule hôte par l'identification et la caractérisation de protéines exportées par le parasite après l'invasion (PSP), qui viendraient interférer avec les voies de signalisation de la cellule infectée.

Plusieurs effecteurs parasitaires ont été découverts, dont GRA16 qui est la première protéine de granule dense exportée au-delà de la vacuole parasitophore vers le noyau de la cellule infectée (84). Cette protéine régule la transcription de gènes de l'hôte impliqués principalement dans le métabolisme et le cycle cellulaire. Son action est médiée par une interaction avec l'ubiquitine-protéase HAUSP, un régulateur du suppresseur de tumeur p53, et par une autre interaction avec la phosphatase 2A (PP2A) contribuant à la translocation nucléaire de cette enzyme.

Une deuxième protéine exportée par le parasite, GRA24, promeut une réponse immune de type Th1 chez l'hôte l'infecté, en stimulant la sécrétion de plusieurs cytokines (IL-12) et chimiokines (MCP-1) pro-inflammatoires. GRA24 agit ainsi en stimulant l'autophosphorylation de la MAP-Kinase p38 α , qui stimule à son tour l'expression/activation de plusieurs facteurs de transcription (c-Fos, EGR1, CREB...) responsables de la régulation de l'expression des cytokines proinflammatoires. GRA24 contribue ainsi au contrôle la réplication précoce du parasite au site d'infection dans l'intestin (85).

GRA16 et GRA24 constituent donc désormais une nouvelle famille de protéines hébergées par les granules denses qui, une fois déversées dans l'espace vacuolaire, ont la capacité inédite de traverser la PVM et d'être dirigées dans le noyau de la cellule hôte où elles modulent l'expression génique (132).

2. Une enzyme plasmodiale à activité cytokinique est un facteur de virulence sécrété

Cet axe de recherche PSP a trouvé un écho particulier avec les travaux publiés dans Nature en 2011 par nos collaborateurs le Dr. Amit Sharma (ICGEB, New Delhi) et le Dr. Hassan Berhali (EMBL-Grenoble *outstation*), qui ont révélé une fonction non canonique de la Tyrosyl-ARNt Synthétase, une enzyme cytoplasmique de *Plasmodium falciparum* (PfTyrRS) (133). Cette protéine, à l'image de son homologue humaine aux activités cytokiniques pro-angiogéniques, possède un motif ELR (glutamate-lysine-arginine) – retrouvé également dans la séquence de l'IL-8. Cependant, dans la version humaine, ce motif nécessite, pour se retrouver exposé à la surface de la molécule, le clivage d'un peptide EMAP II-*like* C-terminal et la libération de la forme mini-TyrRS, tandis que la version plasmodiale exprime ELR de manière constitutive (Figure 6 A). L'utilisation d'anticorps dirigés contre PfTyrRS suggérait la présence de la protéine dans le cytoplasme des érythrocytes infectés (Figure 6 C), malgré l'absence d'un signal d'export dans sa séquence.



Figure 6. Sécrétion de PfTyrRS. A : organisation des Tyrosyl-RS humaine, de *P. falciparum* et de *S. cerevisiae*. B : Chimiluminescence de lysats et de surnageants de culture cellulaire ; anticorps dirigés contre PfTyrRs, PfDTD, PfmsP1 and Pf falcipaïne 2. C : Microscopie confocale de *P. falciparum* (stades asexués ; anti-sérum de lapin dirigé contre PfTyrRS). D : Microscopie confocale montrant la liaison et l'internalisation de PfTyrRs (PfTyrRs : souche sauvage ; contrôles : sérum de lapin avant immunisation ; mutant de PfTyrRs avec motif ELR remplacé par AAA, et anticorps seuls sans TyrRS).

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature communications, 2, Bhatt TK, Khan S, Dwivedi VP, Banday MM, Sharma A, Chandele A, et al. Malaria parasite tyrosyl-tRNA synthetase secretion triggers pro-inflammatory responses. 2011, 530, copyright 2011.

Ce résultat a été confirmé par la production d'une souche recombinante exprimant PfTyrRS fusionnée avec une *green fluorescent protein* (GFP). De la même manière, PfTyrRS a été retrouvée dans le surnageant de culture sur érythrocytes, suggérant que la protéine est libérée lors de la lyse érythrocytaire en fin de cycle asexué du parasite (Figure 6 B). La fixation de PfTyrRS à la surface de macrophages humains et son internalisation ont été observées par microscopie confocale (Figure 6 D). Les auteurs ont également constaté une libération dose-dépendante des cytokines IL-1, IL-6 et TNF-α par des macrophages humains mis en présence de PfTyrRS. Or, le niveau d'expression de ces cytokines pro-inflammatoires est habituellement augmenté dans les manifestations cliniques de paludisme grave. Le rôle de PfTyrRS dans la virulence semble être confirmé par son interaction avec les macrophages, qui augmente également l'expression de VCAM-1 et ICAM-1, molécules impliquées dans la virulence du parasite liée au phénomène de cyto-adhérence dans les capillaires veineux.

Cette fonction « non canonique » de PfTyrRS, c'est-à-dire qui joue, en plus de son activité enzymatique, le rôle d'une cytokine parasitaire et de facteur de virulence, a inspiré notre équipe qui était en recherche de facteurs parasitaires secrétés au-delà de la vacuole. Se posait dès lors la question de la (des) fonction(s) de l'homologue de PfTyrRS chez *T. gondii* : s'agissait-il d'une PSP à action cytokinique impliquée dans le déroulement de l'infection ?

3. Un homologue de la protéine p43 serait présent chez T. gondii

Alors qu'émergeait ce questionnement, l'intérêt de notre équipe se renforçait pour une protéine identifiée en spectrométrie de masse comme un homologue de p43, co-purifiée avec TgAGO lors de l'étude des petits ARN régulateurs (données non publiées), et que nous appellerons Tg-p43.

La protéine p43 humaine est un précurseur du peptide EMAP II (<u>endothelial monocyteactivating polypeptide II</u>). En conditions de stress cellulaire (apoptose, hypoxie, chimiothérapies), le peptide mature est libéré par clivage protéolytique de la partie Cterminale de p43, et se comporte alors comme une cytokine (134). Initialement décrit comme un peptide aux propriétés chimiotactiques sur les polynucléaires, il est capable d'induire l'expression du facteur tissulaire par les cellules endothéliales (activité procoagulante) et d'activer les monocytes (135). Il combine par ailleurs des activités proapoptotiques (137) et anti-angiogènes (inhibition de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales) par interaction avec un composant de la voie de dégradation associant la protéasome (136). EMAP II entraîne également une régulation positive des récepteurs au TNF- α , et est capable de rendre sensible au TNF- α des tumeurs résistantes (138).

Notre hypothèse initiale était donc que Tg-p43 pourrait, de manière similaire, jouer un rôle de cytokine ou de précurseur de cytokine chez *T. gondii*, avec potentiellement une action de manipulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Le fait qu'elle soit co-purifiée avec TgAGO suggérait par ailleurs un rôle dans la machinerie d'ARN interférence. Enfin, une des principales caractéristiques de la protéine p43 est son association à certaines enzymes de la famille des aminoacyl-ARNt synthétases (à laquelle appartient la Tyrosyl-ARNt Synthétase) au sein d'un complexe multiprotéique appelé MARS (139). S'il en était de même chez *T. gondii*, il était envisageable que Tg-p43 puisse alors jouer un rôle de coordination entre les potentielles fonctions cytokiniques qu'elle-même et ses partenaires supposées pourraient jouer. Afin de tester ces hypothèses, je me suis intéressé à Tg-p43 et à ses partenaires.

Chapitre I : Les aminoacyl-ARNt synthétases et le complexe MARS chez *T. gondii*

Les premiers résultats de nos recherches nous indiquèrent très rapidement que Tg-p43 ne présentait pas le profil d'une cytokine, la protéine endogène n'étant jamais observée par immunofluorescence en dehors du cytoplasme du parasite. Par ailleurs aucune de nos purifications biochimiques utilisant Tg-p43 comme appât n'a permis de retrouver l'interaction avec la protéine TgAGO, ce qui rend l'hypothèse d'une contribution au mécanisme d'ARN interférence peu probable. J'ai donc focalisé mes efforts sur la caractérisation de Tg-p43 et de ses partenaires enzymatiques.

Après une synthèse bibliographique introduisant la nature et la fonction des aminoacyl-ARNt synthétases, je présenterai les résultats de mes travaux publiés complétés de quelques résultats additionnels, puis discuterai ces résultats au regard des connaissances actuelles concernant p43 et le complexe MARS dans le monde vivant.

I. Les aminoacyl-ARNt synthétases

1. Fonction d'aminoacylation

Les aminoacyl-ARNt synthétases (en anglais : <u>aminoacyl-tRNA synthetases</u>, aaRS) sont essentielles au mécanisme de traduction, où elles participent au chargement d'un acide aminé sur une molécule dédiée d'ARNt, une étape initiale du processus de synthèse protéique (140). Cette réaction d'aminoacylation conduit à la formation d'un ARNt dit « chargé » de son acide aminé correspondant. Cet ensemble est ensuite amarré à un facteur d'élongation, qui le transporte jusqu'au sein du complexe ribosomal, où il sert d'unité d'élongation lors de la synthèse protéique, selon le modèle fourni par la molécule d'ARN messager (ARNm). Parce que cette réaction d'aminoacylation de l'ARNt établit l'algorithme de correspondance entre un acide aminé et un triplet nucléotidique, l'apparition de ces enzymes est étroitement associée à celui du code génétique (141).

La réaction d'aminoacylation de l'ARNt se déroule en deux étapes (Figure 7). Lors de la première étape d'activation de l'acide aminé, une molécule d'ATP (ou rarement d'un autre nucléoside triphosphate) et l'acide aminé sont liés, au sein du site actif de l'enzyme, libérant une molécule de pyrophosphate inorganique. L'enzyme porte alors un aminoacyl-adénylate

(ou aminoacyl-AMP, anhydride entre le groupement carboxyle de l'acide aminé et le groupement phosphoryle de l'AMP). En amont de la deuxième étape intervient une ARNtnucléotidyl-transférase qui ajoute à l'extrémité 3' de l'ARNt une terminaison CCA. Le carbonyle de l'aminoacyl-adénylate lié à l'aaRS peut alors être attaqué par l'extrémité hydroxylée en 2' ou 3' de l'adénosine terminale de la molécule d'ARNt. En résulte l'estérification de l'ARNt par l'acide aminé, accompagnée de la libération d'une molécule d'AMP, et la dissociation de la molécule d'aminoacyl-ARNt néoformée et de l'enzyme (140).

 $aa + ATP + aaRS \Rightarrow aaRS \bullet aa-AMP + PPi (1)$

 $aaRS \bullet aa-AMP + ARNt^{aa} \Rightarrow aaRS + aa-ARNt^{aa} + AMP (2)$

Figure 7. La réaction d'aminoacylation catalysée par l'aminoacyl-ARNt-synthétase

(1): activation de l'acide aminé
(2): transfert du groupe aminoacyl vers l'ARNt

Abréviations:

aa: acide aminé
ARNt^{aa}: ARNt spécifique de l'acide aminé aa
aa-AMP: aminoacyl-adénylate
aa-RNt^{aa}: ARNt chargé
aaRS: Aminoacyl-ARNt synthétases spécifique de l'acide aminé aa
ATP: adénosine-triphosphate
AMP: adénosine monophosphate
PPi: pyrophosphate inorganique

2. Contrôle de qualité de la réaction d'aminoacylation

La rigueur de la lecture du code génétique est une condition indispensable à une synthèse protéique correcte. Afin d'éviter l'apparition de mutations dans le protéome, l'appariement d'un acide aminé à l'ARNt doit donc être hautement contrôlé. La fidélité de l'aminoacylation est obtenue par la mise en jeu conjointe d'éléments de contrôle positifs (production et reconnaissance des appariements corrects) et négatifs (détection et élimination des mésappariements) (142). La spécificité de l'appariement et les mécanismes de corrections des erreurs permettent d'atteindre une fréquence d'erreurs relativement faible, de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} (143,144).

a) Mécanismes assurant la spécificité de la réaction

L'acide aminé fait l'objet d'une reconnaissance spécifique, liée à des interactions entre l'aaRS et la chaîne latérale de l'acide aminé. Cependant, ce fonctionnement peut être pris en défaut, essentiellement pour les acides aminés à chaînes aliphatiques courtes et sans motif très discriminant : glycine, alanine, valine, isoleucine, sérine et thréonine (143).

La spécificité de reconnaissance de l'ARNt est quant à elle souvent conférée par l'interaction de l'enzyme avec l'anticodon (Figure 8), triplet de bases complémentaires de celles composant le codon situé sur l'ARNm. Le bras accepteur de l'acide aminé joue également un rôle important dans cette spécificité, avec la présence d'une base discriminante près de l'extrémité 3' (145). Pour certains ARNt (spécifiques de la sérine et de l'alanine), l'anticodon



Figure 8. Représentation schématique d'un ARNt (d'après (146)).

n'est cependant pas reconnu par l'enzyme; dans ces cas particuliers, des éléments d'identification répartis sur toute la molécule d'ARNt seraient impliqués (147). Les mécanismes assurant cette spécificité de reconnaissance sont d'autant plus sophistiqués que plusieurs ARNt de séquences différentes peuvent être chargés par le même acide aminé. Ces ARNt dits « isoaccepteurs », sont codés par différents gènes et peuvent présenter des variations de nucléotides dans l'anticodon (tout en gardant la même spécificité d'acide aminé, définissant la nature dégénérée du code génétique), voire disposer du même anticodon mais contenir des variations de séquences dans d'autres zones reconnues par l'aaRS (148).

b) Mécanismes de relecture

Afin de pallier les erreurs d'appariement, les aaRS présentant des niveaux de fidélité insuffisants sont capables de catalyser une étape de relecture (*proofreading* ou *editing*), qui précède l'élongation protéique. Cette étape permet la vérification du bon appariement et la correction des mésappariements, par une réaction d'hydrolyse, soit de la liaison phosphoanhydride de l'aminoacyl-adénylate incorrect (correction pré-transfert), soit de la liaison ester de l'aminoacyl-ARNt incorrect (correction post-transfert) (144). Cette action est possible grâce à la présence intrinsèque dans la structure de ces aaRS de domaines correcteurs dédiés (*editing domains*) à activité hydrolytique, retrouvés dans 9 des 20 principales aaRS. Dans certains cas, ces domaines de relecture existent de manière indépendante dans des hydrolases nommées ARNt-déacylases (147). Il est possible que ces domaines autonomes aient été intégrés au cours de l'évolution aux aaRS présentant aujourd'hui une activité hydrolytique (149).

3. Contingents subcellulaires

Le nombre d'aaRS chez les Procaryotes est variable, certains taxons possédant certaines aaRS aux spécificités propres qui ne sont pas retrouvées chez les Eucaryotes (Phosphoséryl-RS, Pyrolysyl-RS chez certaines bactéries et archées) (150). Certaines aaRS affichent également une multi-spécificité, comme l'enzyme codée par le gène de la Prolyl-RS de l'Archée *Methanococcus jannaschii*, capable de catalyser les aminoacylations correctes des ARNt^{pro} et ANRt^{cys} (151).

A la différence des Procaryotes, les Eucaryotes possèdent un répertoire complet de 20 aminoacyl-ARNt synthétases correspondant aux 20 acides aminés les plus fréquemment utilisés dans la synthèse des séquences polypeptidiques (142). En théorie, il existe un sousensemble de 20 aaRS dans chaque compartiment où se déroule une traduction, soit le cytosol et la mitochondrie dans la plupart des Eucaryotes (152). Cette vision canonique est cependant modérée par la mise en évidence de l'origine multiple des gènes d'aaRS mitochondriales, suggérant des phénomènes de transfert, de duplication ou de pertes de gènes au cours de l'évolution (153). En règle générale, les différentes isoformes sont synthétisées dans le cytosol, à partir de gènes nucléaires ; les formes mitochondriales sont transportées dans l'organite de manière post-traductionnelle, où elles pourront prendre part à la traduction locale. L'existence de plusieurs jeux d'enzymes implique que celles qui sont destinées aux mitochondries se distinguent par la présence d'un signal de localisation spécifique, dit « peptide signal ». Selon les organismes et les spécificités d'acide aminé, deux cas de figure sont possibles. Les deux isoformes peuvent être codées par deux gènes différents (cas des Leucyl-, Histidyl-, Isoleucyl-, Phénylalanyl-, Tryptophanyl-, Séryl-RS humaines) (154). Certaines aaRS sont au contraire encodées par un gène unique ; dans ce cas, les deux versions d'une aaRS peuvent être générées par deux mécanismes différents : 1) la présence sur le transcrit de deux sites d'initiation de la traduction, conduisant à la synthèse de deux protéines différentes, l'une d'elles comportant le peptide signal N-terminal de localisation mitochondriale (cas de la Glycyl-RS humaine ou des Valyl- et Histidyl-RS de S. cerevisiae) (155) ; 2) un épissage alternatif qui maintient ou non la séquence d'adressage mitochondrial dans le transcrit (cas de la Lysyl-RS humaine (156) ou de l'Isoleucyl-RS de Trypanosoma brucei (157)). Possédant un troisième compartiment traductif hébergé par les plastes, les plantes devraient théoriquement disposer d'un ensemble supplémentaire d'isoformes chloroplastiques spécifiques à cet organite ; on observe au contraire chez Arabidopsis thaliana une situation extrême où la moitié des 45 aaRS encodées uniquement au niveau nucléaire sont partagées entre deux voire les trois compartiments (152).

4. Classification des aaRS

Les aaRS ont été réparties en deux classes qui se distinguent par des topologies distinctes de leurs sites actifs, conséquences de divergences évolutives de cette ancienne famille d'enzymes (158) (Tableau II).

La classe I regroupe des enzymes généralement monomériques, à l'exception des enzymes dimériques Tyrosyl-RS et Tryptophanyl-RS, et de la Méthionyl-RS, dimérique exclusivement chez les Procaryotes (159). Elles possèdent au sein de leur site actif, près de l'extrémité amino-terminale (N-terminale), un domaine replié de type *Rossmann-fold*, (RF) (160). Les RF, retrouvés de manière ubiquitaire dans différentes familles protéiques se liant aux composés adénylés, comme certaines déshydrogénases et kinases (149,159), contiennent un domaine de liaison à l'ATP et un domaine de liaison à l'acide aminé, séparés par une insertion peptidique (*connective peptide 1*, CP1) (150). Dans certaines aaRS, CP1 existe sous une

forme élargie incluant un site catalytique qui constitue le principal domaine impliqué dans la relecture post-transfert (147,161). Deux motifs conservés, contenant des séquences consensus HIGH et KMSKS caractéristiques d'un centre catalytique construit autour d'un RF, interviennent en facilitant la liaison à l'ATP et en stabilisant l'état transitoire lors de l'étape d'activation de l'acide aminé (162). Lors de la deuxième étape, les aaRS de classe I abordent l'ARNt par le sillon mineur du bras accepteur de la molécule, et lient l'acide aminé à l'hydroxyle en 2' du ribose terminal de l'ARNt (143).

A l'inverse, les enzymes de classe II sont rarement monomériques, la Glycyl-RS et la Phénylalanyl-RS présentant la particularité d'exister sous forme hétérotétramérique de formule $\alpha_2\beta_2$ (150). Cette famille d'enzymes se distingue essentiellement par la structure du domaine catalytique, quasiment unique dans le monde des protéines (149). Le site actif est constitué d'un feuillet *bêta* antiparallèle contenant 3 motifs consensus (appelés 1, 2 et 3), flanqué d'une hélice *alpha* (158). Le motif 1 fait partie de l'interface de dimérisation, alors que les 2 et 3 constituent le site d'aminoacylation, dont certains résidus-clés permettent le positionnement correct du substrat (143,163). Lors de la deuxième étape, les aaRS de classe II abordent l'ARNt par le sillon majeur de son bras accepteur, et lient l'acide aminé à l'hydroxyle en 3' du ribose terminal (à l'exception de la Phénylalanyl-RS) (143). La différence de site actif entre les deux classes entraîne la fixation de l'ATP dans une conformation étendue pour la classe I, et repliée pour la classe II. Enfin, contrairement aux aaRS de classe I dont l'étape de relecture, quand elle est présente, réside dans l'activité du domaine CP1, les enzymes de classe II peuvent contenir des domaines structuraux distincts, situés en position N-terminale, voire en position centrale (147,150).

Pour chaque classe, différentes sous-classifications ont été établies. Dans un premier temps, six sous-classes, trois pour chaque classe, avaient été créées essentiellement sur la base d'identités de séquence (147,150). Des analyses plus récentes, basées sur des phylogénies de structure, ont conduit à reclasser certaines aaRS, et reconnu 5 sous-classes pour les aaRS de classe I (Tableau II) (164). A titre d'exemple, les aaRS de classes II sont principalement subdivisées en fonction de la nature de leur domaine de liaison à l'anticodon : alors que celui de la classe II présente une topologie structurale conservée α/β , celui de la classe IIb est constitué par un domaine replié *OB fold (oligonucleotide / oligosaccharide binding*) en

position	N-terminale (150,163),	domaine	retrouvé	dans	d'autres	protéines	liant	les	acides
nucléiqu	es (165).								

	Classe I	Classe II			
Structure du site actif	Rossmann	feuillet bêta antiparallèle			
Motifs caractéristiques	HIGH et KMSKS	motif 1, motif 2, motif 3			
Conformation de l'ATP	étendue	repliée			
Sous-classe (structure quaternaire)	la	lla			
	Méthionyl-RS ($\alpha_{_{\it J}} \alpha_{_{\it 2}}$)	Séryl-RS (α ₂)			
	Leucyl-RS ($lpha$)	Prolyl-RS (α_2)			
	Isoleucyl-RS (α)	Thréonyl-RS (α_2)			
	Valyl-RS ($lpha$)	Glycyl-RS (α ₂)			
		Histidyl-RS (α_2)			
	Ib	IIb			
	Cystéinyl-RS ($lpha$)	Aspartyl-RS (α_2)			
	Glutamyl-RS ($lpha$)	Asparaginyl-RS (α_2)			
	Glutaminyl-RS ($lpha$)	Lysyl-RS II ($lpha_2$)			
	lc	llc			
	Tyrosyl-RS (α ₂)	Phénylalanyl-RS (($\alpha\beta$) ₂ , α)			
	Tryptophanyl-RS (α_2)	Glycyl-RS ((αβ) ₂)			
		Alanyl-RS (α_2 , α)			
	Id				
	Arginyl-RS (α)				
	le				
	Lysyl-RS I (α)				

Tableau II. Classification des aaRS (d'après (150,166))

5. Considérations évolutives

Les aaRS sont des enzymes très anciennes qui auraient participé au cours de l'évolution à la transition entre un supposé « monde d'ARN » et l'avènement des protéines. En effet, elles existaient au premiers moments du développement de la vie sur Terre, avant son éclatement en différents règnes, et sont retrouvées aussi bien chez les Eucaryotes que chez les Procaryotes (167).

Les aaRS pourraient avoir évolué à partir de molécules plus simples, principalement des protéines capables de se lier à l'ARN. L'existence d'aaRS multifonctionnelles chez certains micro-organismes conduit à suggérer que les aaRS contemporaines ont dérivé d'enzymes ancestrales de large spécificité de substrat (151). Un ancêtre catalytique commun

correspondant au cœur actif canonique aurait précédé les enzymes actuelles des deux classes, puis évolué à travers l'acquisition séquentielles de domaines accessoires, conférant la spécificité de liaison à l'ARNt, mais aussi des modules de relecture et d'interactions protéines-protéines et d'autres fonctions dites non canoniques (147,165). La présence de ces régions additionnelles non catalytiques explique notamment la taille globalement supérieure de ces enzymes chez les Eucaryotes par rapport à leurs homologues procaryotes (142) (Figure 9).



Figure 9. Domaines additionnels retrouvés au sein des aaRS et leurs protéines accessoires chez l'Homme (168)

Domaines catalytiques conservés : cadres blancs ; domaines de reconnaissance de l'ARNt : cadre gris.

Reprinted from FEBS Lett 584, Guo M, Schimmel P, Yang X-L, Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions, 434–442, Copyright (2010), with permission from Elsevier.

La coexistence de deux classes d'aaRS structuralement différentes mais remplissant la même fonction peut être considérée comme un exemple d'évolution convergente (149). Les aaRS de classe II sont considérées par certains comme probablement la plus ancienne évolution depuis les protéines catalytiques ancestrales, en raison des moindres performances de leurs domaines de liaisons aux nucléotides, qui, s'ils sont fonctionnels, apparaissent moins sophistiqués que les aaRS possédant un domaine RF. Cette considération est cependant modérée par la présence d'un domaine OB au sein des aaRS de sous-classe IIb, conférant à celles-ci une meilleure efficacité de liaison à l'anticodon que les enzymes de la sous-classe IIa (165). En règle générale, une aaRS d'une spécificité donnée appartient toujours à la même classe, quel que soit l'organisme considéré, observation qui reflète l'évolution très ancienne de cette famille protéique (158). La Lysyl-RS est la seule aaRS à enfreindre cette règle, puisque deux enzymes distinctes affichant la même spécificité coexistent, l'une possédant les caractéristiques de la classe I et l'autre celles de la classe II. L'enzyme de classe I semble être apparue en premier, puis aurait été remplacée par l'aaRS de classe II dans la plupart des branches de l'évolution (150), de sorte que cette dernière est la seule présente chez les Eucaryotes actuels, quand l'enzyme de classe I subsiste dans de nombreux embranchements des Archées et des Bactéries, avec parfois une coexistence des deux enzymes au sein d'un même organisme (169).

6. Fonctions non canoniques

L'acquisition au cours de l'évolution de domaines accessoires aux extrémités amino- et carboxy-terminales des domaines catalytiques, essentiellement chez les Eucaryotes supérieurs, confère aux aaRS des fonctions autres que l'activité canonique d'aminoacylation des ARNt (170). Ces activités alternatives peuvent s'exprimer au niveau intracellulaire (régulations transcriptionnelle et traductionnelle, transport d'ARNt), ou après sécrétion dans le milieu extérieur (fonctions cytokiniques). Elles peuvent ainsi réguler un large spectre de processus biologiques comme l'apoptose, l'angiogénèse, la tumorogénèse, la réponse immune ou la différenciation tissulaire (171). Quelques exemples de ces fonctions non canoniques sont mentionnés ci-après. L'exercice de ces fonctions dites « non-canoniques » peut nécessiter la libération par protéolyse d'un fragment peptidique autonome, permettant des interactions inter-protéiques nouvelles. Dans d'autres cas, les domaines catalytiques peuvent être directement impliqués, soit par la mise à profit d'une surface non utilisée dans l'activité canonique de traduction, soit par le biais d'une protéolyse exposant de nouveaux éléments structuraux au sein même du site actif (168). Lorsque l'aaRS s'avère multifonctionnelle à l'état natif, elle peut être qualifiée de moonlighting protein (to moonlight signifiant « avoir un second travail ») (172). L'existence de ces fonctions additionnelles n'est pas spécifique de cette catégorie de protéines. Il semblerait au contraire que de nombreuses protéines, voire la plupart, soient dotées de fonctions multiples, dont la découverte se fait progressivement (173). Il a été suggéré que l'apparition de fonctions additionnelles au cours de l'évolution favoriserait la duplication de gènes, la présence de

deux versions d'une même protéine permettant de supporter une mutation affectant spécifiquement une fonction au bénéfice de l'autre (172).

a) Régulation transcriptionnelle par la Lysyl-RS

En plus de leur fonction d'aminoacylation, plusieurs aaRSs eucaryotes peuvent produire des polyphosphates de dinucléotides dans diverses conditions physiologiques. Ces molécules sont actives à la fois aux niveaux extra- et intracellulaires, et semblent agir en tant que molécules de signalisation importantes. La Lysyl-RS est par exemple capable de produire le diadénosine tétraphosphate (AppppA ou Ap₄A) comme produit secondaire de la réaction d'aminoacylation de l'ARNt^{Lys}, par réaction du Lysyl-adénylate lié à la Lysyl-RS avec une molécule d'ATP (au lieu d'un pyrophosphate) (174) (Figure 10).

 $Lys + ATP + LysRS \Rightarrow LysRS \cdot Lys-AMP + PPi (1)$

 $LysRS \bullet Lys-AMP + ATP \Rightarrow LysRS + Lys + Ap_4A (2)$

Figure 10. Réaction de formation d'Ap₄A (1) : activation de l'acide aminé (2) : attaque du lysyl-adénylate par l'ATP Abréviations : Lys: lysine Lys-AMP : lysyl-adénylate LysRS : Lysyl-ARNt synthétase ATP : adénosine-triphosphate PPi : pyrophosphate inorganique Ap₄A : diadénosine tétraphosphate

Ce messager secondaire, en se liant au répresseur Hint-1, libère le facteur de transcription MITF (*microphtalmia-associated transcription factor*) impliqué dans l'activation de la transcription de médiateurs de l'allergie dans les mastocytes. Plus de la moitié des aaRS sont capables de catalyser cette réaction, mais la Lysyl-RS est à l'origine de 70 à 80 % de la production de Ap4A, et constitue le seul levier d'augmentation de la transcription dans les mastocytes (175). La production d'Ap₄A a également été observée chez des Procaryotes (*Salmonella enterica*) mais plutôt identifiée à un élément de réponse à des conditions de stress, et qualifiée à ce titre d'« alarmone » (176).

b) Régulation traductionnelle par EPRS

La fonction dans la répression post-transcriptionnelle de l'aaRS bifonctionnelle Glutamyl-Prolyl-RS (EPRS) a été montrée en 2004 (177). Cette aaRS intervient comme composant du complexe tétramérique GAIT (*IFN-γ-activated inhibitor of translation*). Ce complexe est observé dans le cytosol de cellules myéloïdes stimulées par la présence d'interféron gamma (IFN-γ) ; il est capable de se lier à un élément GAIT contenu dans une tige-boucle de la région non-traduite en 3' (3'-UTR) de l'ARNm de nombreux médiateurs de l'inflammation comme la céruloplasmine ou le VEGF-A, empêchant leur traduction (178). Initiateur de la formation du complexe, EPRS est également le composant effectuant directement la liaison entre GAIT et le transcrit de la céruloplasmine (177).

c) Fonctions cytokiniques

Libérées dans l'environnement extra-cellulaire, certaines aaRS sont capables de se comporter en cytokines. Elles sont alors impliquées dans divers processus, régulant migration, division, différenciation de cellules immunitaires et endothéliales, et participant à la transformation maligne. Elles peuvent également jouer un rôle important dans la progression cancéreuse, en modulant l'angiogénèse tumorale et son échappement au système immunitaire (179). L'existence de ces activités cytokiniques adossées à des aaRS est interprétée comme un moyen de connecter traduction et voies de signalisation (180,181). L'exemple de la version humaine de la Tyrosyl-RS est à ce titre paradigmatique : l'enzyme intereste une fait libérée dans la milieu extracellulaire est aciadée en deux parties estives

intacte, une fois libérée dans le milieu extracellulaire, est scindée en deux parties actives. L'extrémité carboxy-terminale (C-terminale) libérée présente une forte identité de séquence avec le peptide EMAP II. *In vitro*, ce peptide « EMAP II-*like* » affiche de manière similaire à l'EMAP II un pouvoir chimiotactique puissant sur les leucocytes mononucléés et les polynucléaires, et stimule la production de myéloperoxydase, TNF-α et facteur tissulaire par ces cellules. Le second peptide libéré par clivage (mini-TyrRS), analogue de la Tyrosyl-RS d'*Escherichia coli* et contenant donc le site catalytique, présente quant à lui une activité chimiotactique vis-à-vis des polynucléaires, mimant l'action de l'IL-8 en se liant au mêmes récepteurs. Ces deux molécules à activité cytokinique, libérées dans le milieu extracellulaire lors de l'apoptose, autoamplifient leur production en recrutant les polynucléaires producteurs d'élastase (protéase capable de scinder la Tyrosyl-RS), et par conséquent le recrutement de macrophages nécessaires au « nettoyage » du site (182).

Il a également été montré que la mini-TyrRS était un facteur angiogène similaire à l'IL-8, capable d'induire la migration de cellules endothéliales *in vitro* et de stimuler l'angiogénèse *in vivo* en modèles animaux (murin et aviaire) (183). De manière analogue à la Tyrosyl-RS, il existe une version tronquée de la Tryptophanyl-RS pouvant être générée soit par épissage alternatif (induit par l'IFN-γ), soit par clivage (en présence d'élastase). Cette mini-TrpRS se comporte alors comme un inhibiteur de l'angiogénèse, capable d'inhiber les effets pro-angiogénèse de la Tyrosyl-RS (183,184). Les effets antagonistes remarquables de ces deux aaRS, de structures pourtant très proches, suggèrent l'existence d'une fine régulation de la balance des *stimuli* pro-/antiangiogènes (185).

7. Association à des protéines non enzymatiques

Chez les Eucaryotes, une fraction des aaRS est associée sous la forme d'un complexe cytosolique stable appelé <u>Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetases</u> (MARS), ou parfois MSC pour <u>Multi-aminoacyl-tRNA Synthetase Complex</u>. Ces assemblages supramoléculaires font intervenir, outre les aaRS elles-mêmes, un nombre, variable selon les espèces, de protéines accessoires permettant l'échafaudage du complexe, appelées <u>Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins</u> (AIMP). Chez la plupart des Eucaryotes pluricellulaires, celle-ci sont au nombre de trois, et initialement nommées d'après leur masse apparente (en kDa) : p43 (AIMP1), p38 (AIMP2), et p18 (ou AIMP3) (186). A l'image des aaRS, les AIMP des Eucaryotes pluricellulaires sont dotées de fonctions apparemment distinctes de leur rôle structural au sein du complexe MARS, essentiellement liées à certains domaines conservés présents dans leur structure.

a) AIMP1 ou p43

Rôles liés au domaine C-terminal EMAP II-like

Au-delà des effets dus au peptide EMAP libéré par clivage (cf. plus haut), la protéine p43 intacte présente elle-même des activités cytokiniques. Certaines de ces activités sont partagées avec EMAP II car dues à des interactions entre son domaine EMAP II et divers effecteurs (187). Sécrétée par les cellules de mammifères, p43 stimule ainsi l'expression de facteurs pro-inflammatoires (dont le TNF- α et l'IL-8) par les monocytes/macrophages (188).

Une action anti-angiogène (inhibition de la prolifération des cellules endothéliales) a également été caractérisée, liée à une interaction avec la sous-unité α de l'ATP synthase, son récepteur à surface des cellules-cibles (189) qui a été proposée comme médiateur cellulaire de l'angiostatine. Mais p43 serait aussi impliquée dans le rétrocontrôle négatif du TGF- β : la fixation de son extrémité C-terminale à Smurf2 empêche l'ubiquitination de ce régulateur négatif du TGF- β et sa donc dégradation (190).

L'analyse cristallographique de l'extrémité C-terminale de p43 a révélé au sein du peptide EMAP II un site de liaison non spécifique à l'ARNt basé sur un motif de type OB-fold (191) très proche de celui de la protéine de liaison à l'ARNt Trbp111 retrouvée chez la bactérie *Aquifex eolicus* (192). Le domaine EMAP II a ainsi probablement évolué par accumulation de mutations, d'une fonction accessoire de liaison à l'ARN vers une fonction de facilitation d'interactions protéiques hors du complexe MARS et de la traduction (168).

Rôles liés au domaine N-terminal contenant le motif Leucine Zipper (LZ)

Une étude de Park en 2005 décrit p43 comme un intervenant majeur de la réparation tissulaire. Au niveau d'un site lésé, le TNF- α attire les macrophages qui sécrètent alors p43. Le domaine N-terminal de p43, contenant le motif LZ, est responsable d'une prolifération fibroblastique et d'une synthèse accrue de collagène, via une interaction de ce domaine avec la kinase Erk (193). Le rôle ambivalent de p43 dans l'angiogénèse, provoquant à faible dose la migration de cellules endothéliales, mais induisant à forte dose l'apoptose, est également attribuable à son domaine N-terminal (194).

Sans être attribués à un domaine particulier de p43, d'autres mécanismes ont été associés à cette protéine. Elle serait ainsi impliquée dans l'homéostasie du glucose : sécrétée par le pancréas après déplétion en glucose, son action hormonale engendre un ensemble d'effets mimant ceux du glucagon (195). Un rôle dans la réaction auto-immune découle de son association à la protéine de choc thermique (*heat shock protein*) gp96 impliquée dans la stimulation auto-antigénique. L'interruption du gène *p43* en modèle murin entraîne un phénotype auto-immun lupique. Elle agirait ainsi comme un régulateur de la rétention de gp96 dans le réticulum endoplasmique, et la survenue de maladies inflammatoires chroniques (196). Enfin, p43 intervient dans le développement neuronal comme facteur essentiel de l'intégrité des axones des motoneurones. Elle participe au maintien du niveau

de phosphorylation nécessaire à l'assemblage correct des neurofilaments, principaux éléments du cytosquelette de ces cellules (197). La protéine p43 se comporte donc comme un facteur de signalisation dans des voies très variées et aux multiples fonctions, dépendantes du contexte et de la cible cellulaire.

b) AIMP2 ou p38

p38 intervient en tant que médiateur de la régulation du proto-oncogène c-myc par le TGF- β . Le TGF- β induit l'expression et promeut la translocation de p38 vers le noyau, où elle régule négativement la transcription de c-myc en se liant à et en ubiquitinant son facteur de transcription FBP (*far upstream element-binding protein*), entrainant sa dégradation par le protéasome (198). La répression de c-myc étant nécessaire à la différenciation de certaines cellules alvéolaires, p38 intervient donc au cours de l'embryogénèse, et notamment de la différenciation pulmonaire.

En 2005, il a été montré que p38 constitue l'un des substrats de l'ubiquitine-protéine ligase E3 codée par le gène *parkin*, dont les mutations ont été associées avec la survenue de certaines formes de la maladie de Parkinson. Un défaut d'ubiquitination et de dégradation de ces substrats protéiques spécifiques entraîne l'accumulation de protéines toxiques, déclenchant l'apoptose ; p38 pourrait ainsi jouer un rôle dans la neurodégénération et la pathogénèse de la maladie (199).

Enfin, en interagissant avec p53, p38 inhibe son ubiquitination et donc sa dégradation, favorisant la réponse apoptotique au stress génotoxique (200).

*c) AIMP3 ou p*18

De manière similaire à p38, p18 présente une activité suppressive de tumeur : la délétion biallélique de p18 chez la souris s'avère létale et l'hétérozygotie entraîne une haute sensibilité à la tumorogénèse spontanée. L'altération de l'ADN par l'exposition à des rayonnements UV induit la translocation nucléaire de p18. Cette protéine régule alors positivement p53 par une interaction via son domaine GST (homologue à l'extrémité C-terminale de la Glutathion-S-transférase) avec ATM et ATR, deux sérine/thréonine kinases impliquées dans les processus de réparation de l'ADN (réponse dépendante de p53) (201). Ainsi, hors de leur rôle structural et potentiellement régulateur au sein du complexe MARS, les trois AIMP des Eucaryotes supérieurs semblent posséder des fonctions propres dans le contrôle du devenir cellulaire.

8. Maladies liées à des dysfonctions des aaRS

De nombreuses mutations affectant plusieurs aaRS humaines, cytoplasmiques et mitochondriales, ont pu être associées à la survenue de maladies.

Les anomalies concernant neuf des aaRS mitochondriales sont liées à un large éventail d'encéphalopathies et de myopathies. Les mutations affectent l'activité d'aminoacylation de l'aaRS (et parfois de la relecture), entraînant un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les anomalies liées aux aaRS cytoplasmiques sont associées à un ensemble de neuropathies héréditaires sensitivo-motrices, regroupées sous la dénomination de maladie de Charcot-Marie-Tooth. Malgré la grande variété de mutations concernant plusieurs aaRS (Glycyl-, Tyrosyl-, Lysyl-, et Arginyl-RS), l'homogénéité de la maladie consécutive suggère un mécanisme commun encore mal documenté. Un défaut des mécanismes de relecture, voire une mauvaise localisation subcellulaire, sont évoqués. L'apparition inopportune de fonctions supplémentaires, ou la perte de fonctions non canoniques, sont les autres mécanismes évoqués pour expliquer la survenue de ces maladies, mais leur étiologie moléculaire reste actuellement très peu connue (202).

9. Les aaRS chez les Apicomplexes

Les processus impliquant les aaRS chez les Apicomplexes présentent plusieurs singularités. L'analyse de profils d'expression des ARN messagers souligne la transcription sélective de plusieurs aaRS en fonction du stade parasitaire (203). Par ailleurs, l'apicoplaste héberge des mécanismes alternatifs de glutaminylation : une amidotransférase permet par exemple, après l'action de la Glutamyl-RS sur un ARNt^{Glm}, d'amider le Glutamyl-ARNt^{Glm} en Glutaminyl-ARNt^{Glm}, contournant ainsi l'absence de Glutaminyl-RS apicoplastique (203,204).

Une des principales originalités des aaRS du phylum est la présence d'un contingent d'enzymes étonnamment restreint. Seules 37 gènes d'aaRS ont été identifiés dans le génome de *Plasmodium falciparum* au lieu de 60 théoriques (203) si on considère les trois sous-compartiments où la traduction est attendue (le cytoplasme, la mitochondrie et l'apicoplaste). Les mêmes conclusions ont été avancées chez T. gondii (205). Ainsi, des analyses in silico prédisent des localisations exclusivement cytoplasmique et apicoplastique de respectivement 14 et 20 aaRS plasmodiales, mais aucune localisation mitochondriale. Il a été expérimentalement confirmé que l'Alanyl-, la Glycyl- et la Thréonyl-RS de P. falciparum (codées chacune par un seul gène) sont localisées à la fois dans le cytosol et l'apicoplaste (206). De même, 6 aaRS codées par un gène unique auraient une double localisation chez T. gondii (205). Ces données impliquent que pour plusieurs ARNt, la réaction d'acylation se déroule hors de la mitochondrie, dans laquelle ils sont ensuite importés, une fois chargés. Il s'agirait d'un fonctionnement original de la machinerie de traduction dépendant entièrement d'un transport des ARNt chargés depuis un autre compartiment (207). A titre de comparaison, chez d'autres protozoaires parasites comme les Trypanosomatidés se déroule une aminoacylation intra-mitochondriale, avec l'intervention d'aaRS dédiées (157). La traduction mitochondriale des Apicomplexes serait donc complètement dépendante de la contribution cytosolique. Cette hypothèse suggère une évolution de ces parasites vers une simplification maximale du génome mitochondrial, comme c'est déjà le cas pour *Cryptosporidium* qui héberge uniquement un vestige de mitochondrie, le mitome.

L'apicoplaste héberge quant à lui une machinerie de traduction autonome constituée essentiellement de protéines importées dans l'organite via une séquence de sécrétion bipartite qui permet une translocation du réticulum endoplasmique vers l'apicoplaste et la fusion avec la première membrane apicoplastique. Un appareillage d'import chloroplastique très simplifié permet ensuite la traversée de la deuxième membrane (80). Cette séquence d'adressage N-terminale est retrouvée pour au moins trois aaRS chez *Plasmodium* spp. (la Cystéinyl-, l'Alanyl- et la Thréonyl-RS (208)), pour la Glutamyl-RS de *Babesia bovis* (209), et pour au moins 7 aaRS doublement localisées chez *T. gondii* (205). Selon des travaux récents, un mécanisme d'épissage alternatif serait responsable de l'absence ou la présence de cette séquence dans la Cystéinyl-RS de *Plasmodium* (210).

II. Composition protéique, organisation et structure tridimensionnelle du complexe MARS chez *T. gondii*

1. Introduction

Le travail exposé dans ce chapitre a été initié afin de tenter de répondre aux questions qui s'étaient fait jour concernant la nature et le rôle de Tg-p43. Nos investigations nous ont amenés à analyser la composition de l'interactome de cette protéine et donc à décrire le complexe MARS de *T. gondii*. En étroite collaboration avec l'équipe du Dr. Hassan Belrhali (EMBL-Grenoble), une étude biochimique, ultra-structurale et des interactions moléculaires de ce complexe a été entreprise. Ces travaux sont pour la plupart synthétisés dans un article scientifique paru en février 2014 dans la revue PLOS ONE, dont le Dr Jason van Rooyen (post-doctorant, EMBL-Grenoble) et moi-même sommes co-premier auteur. Cet article, qui combine les résultats de nos travaux conjoints, est reproduit en fin de chapitre, précédé d'un résumé des résultats obtenus. Quelques résultats complémentaires font suite à cet article et closent le chapitre. Une partie discussion correspondant à ces résultats se trouve en fin de document.

2. Résultats

a) Caractérisation bio-informatique d'une AIMP hybride

La protéine précédemment co-purifiée avec TgAGO correspond à un gène enregistré dans la base de données génomiques ToxoDB sous le numéro d'accès TgGT1_223140. La recherche de domaines conservés prédisait la présence d'un domaine GST dans la portion N-terminale de cette protéine et d'un domaine de liaison à l'ARNt de type EMAP II-*like* en C-terminal (luimême composé d'un domaine de liaison à l'ARNt désigné Myf ; PONE, figure 1). Après une recherche des homologues de ces deux domaines, nous montrons des homologies significatives entre Tg-p43 et les AIMP connues de l'Homme et de *S. cerevisiae*. Le domaine GST de Tg-p43 partage ainsi 20 % d'identité de séquence avec le domaine GST de Arc1p, 17 % avec celui de p18 et 15 % avec celui de p38. Le domaine de liaison à l'ARNt de type EMAP II de Tg-p43 partage 30 % d'identité de séquence avec celui d'Arc1p et 25 % avec celui de p43. Ces homologies classent cette protéine parasitaire dans la famille des AIMP, avec une proximité structurale forte vis-à-vis d'Arc1p ; elle peut aussi être décrite comme un hybride entre les AIMP p18 et p43 humaines.

b) Localisation subcellulaire de Tg-p43

Un des premiers objectifs du travail était de déterminer si Tg-p43 ou son domaine C-terminal (une fois clivé) étaient sécrétés, et pouvaient par conséquent jouer le rôle d'une cytokine à l'image de p43 et du peptide EMAP II généré par clivage chez les Eucaryotes supérieurs. Nous avons généré des parasites exprimant de manière stable la protéine endogène Tg-p43 étiquetée (HA/Myc et FLAG) en C-terminal (protéines désignées Tg-p43-Myc-FLAG et Tg-p43-HA-FLAG) dans deux fonds génétiques distincts : une souche virulente de type I (RHΔKu80) et une souche kystogène de type II (Pru∆Ku80). Ces souches, dérivées des souches cliniques RH et Prugniaud classiquement utilisées en recherche, présentent l'intérêt d'un très faible taux de recombinaison hétérologue, conféré par l'absence du gène codant Ku80, une protéine responsable de la réparation de l'ADN par recombinaison hétérologue. Après transfection et sélection, les parasites recombinants étaient cultivés sur fibroblastes humains, fixés au stade intracellulaire, et l'étiquette protéique Myc était visualisée par immunofluorescence (PONE, figure 4A). Dans les différentes souches testées, les signaux correspondant à la protéine Tgp43 étaient localisés dans le cytosol du parasite ; aucun signal n'a été observé dans la vacuole parasitophore, ni dans le cytoplasme ou le noyau des cellules hôtes infectées, traduisant l'absence (ou la non détection) de sécrétion de Tg-p43, voire de son extrémité Cterminale.

c) Expression et caractérisation de rTg-p43 - comportement en solution

La production de Tg-p43 recombinante (rTg-p43) et les expérimentations de microscopie électronique ont été menés par Jason van Rooyen.

Tg-p43 a été produite chez *E. coli* et en cellules humaines HEK293, afin d'obtenir des quantités suffisantes à l'analyse de son comportement en solution. L'analyse de son poids moléculaire globulaire par chromatographie d'exclusion-diffusion (SEC, *size exclusion chromatography*) (environ 252 kDA, *PONE*, figure 2B), sa rétention sur filtre de crible 100 KDa (*PONE*, figure 2C), et la présence majoritaire de dimère (*PONE*, figure 2D) soulignent la tendance de cette protéine recombinante à l'oligomérisation. L'analyse en spectroscopie par dichroïsme circulaire (CD) a également permis de déterminer la répartition des différentes structures secondaires (hélice α , feuillet β , coudes, structure désordonnée). Le pourcentage

de structure désordonnée obtenue (40,7 %) était en accord avec les analyses informatiques prédisant que 38 % de la séquence protéique était non ordonnée (PONE, figure 8).

d) Importance physiologique de Tg-p43

La recherche de cibles thérapeutiques nouvelles chez *T. gondii* était une des perspectives sous-tendant le travail de recherche basé sur Tg-p43. Il était donc crucial de déterminer l'importance de cette protéine dans le développement parasitaire. Pour ce faire, le gène *Tgp43* a été interrompu et remplacé par recombinaison homologue par une cassette de sélection de résistance à la pyriméthamine dans un fonds génétique de type I (RH Δ Ku80 Δ p43) ou de type II (Pru Δ Ku80 Δ p43) (*PONE*, figure S1).

i. Analyse du phénotype des parasites mutants $\Delta p43$ in vitro

Une altération des capacités de croissance in vitro était initialement observée avec la souche de type I produite, qui présentait quelques difficultés à l'entretien en culture sur fibroblastes (diminution de la vitesse de lyse d'un tapis cellulaire de 25 cm² par rapport à la souche parentale). Des études préliminaires utilisant l'incorporation préférentielle d'uracile tritié par les parasites en croissance in vitro échouèrent à mettre en évidence de manière reproductible une diminution de la vitesse de croissance de cette souche, comparée à la souche parentale RHAKu80 (données non montrées). D'après le comportement du parasite observé lors de l'entretien quotidien de la souche (dont la capacité à lyser une boîte entière semblait fortement ralentie lorsque le réensemencement d'une nouvelle boîte était retardé), l'hypothèse la plus probable était un défaut de survie des tachyzoïtes en milieu extracellulaire. Afin de tester cette hypothèse, une étude du nombre de plages de lyses dans le tapis cellulaire dans différentes conditions était réalisée. Le stress induit par 2 et 6 heures de maintien en conditions extracellulaires avant inoculation se traduisait par une diminution du nombre de plages de lyse, avec la souche RH∆Ku80∆p43 comme avec sa souche parentale (Figure additionnelle 1). Cet effet, corrélé avec le temps de prétraitement, était significativement plus marqué avec la souche modifiée. Ces résultats étaient en faveur d'une capacité de survie inférieure de la souche RH∆Ku80∆p43 en milieu extérieur. Cependant ce défaut n'a pas pu être répété dans un autre fond génétique (création de la souche RHΔKu80Δp43-YRS-HA-FLAG) (cf. plus loin). Les résultats étaient même relativement contradictoires, avec une survie plus élevée des parasites modifiés après 6 heures de prétraitement extracellulaire (Figure additionnelle 1).

De la même manière, des essais préliminaires étaient menés en milieu de culture pauvre (dépourvu de Glutamate et d'Arginine, pour laquelle *T. gondii* est auxotrophe). Si la croissance en milieu appauvri était visiblement plus ralentie pour la souche RHΔKu80Δp43 que pour la souche parentale, aucune différence n'était observée entre RHΔKu80Δp43-YRS-HA-FLAG et sa souche parentale (données non montrées).

Par conséquent, il est très probable que le défaut constaté sur la souche issue de la première transfection ne soit pas représentatif de la suppression de *Tg-p43*, d'autant plus qu'aucun défaut de croissance n'était visible pour les souches de type II (Pru Δ Ku80 Δ p43). L'altération phénotypique observée pourrait être la conséquence d'une insertion aléatoire ailleurs dans le génome.

ii. Analyse du phénotype des parasites mutants Δp43 in vivo

Nous avons comparé la virulence et la kystogénèse en modèle murin entre le mutant Δp43 et sa souche parentale par inoculation intrapéritonéale de tachyzoïtes. Aucune modification de létalité n'a été constatée avec les souches de type I ou de type II inoculées à la souris Swiss à des doses létales (Figure additionnelle 2). La kystogénèse n'était pas affectée non plus : le nombre de kystes intracérébraux en phase d'infection chronique n'était pas significativement différent entre souches de type II parentale et modifiée (Figure additionnelle 3).

e) Interactome de Tg-p43 – localisation du complexe

Afin de déterminer quels sont les protéines partenaires de Tg-p43, un lysat contenant la protéine étiquetée a été soumis à une chromatographie d'affinité sur une résine portant des anticorps dirigés contre l'étiquette peptidique FLAG. L'analyse des éluats par spectrométrie de masse a révélé que Tg-p43 est associée à la Méthionyl-RS (MRS), la Glutaminyl-RS (QRS), la Glutamyl-RS (ERS) et la Tyrosyl-RS (YRS) (*PONE*, figure 3A, image de gauche). Le profil du complexe est le même pour un lysat issu d'une souche PruΔKu80 (Figure additionnelle 5). Afin de confirmer la réciprocité des interactions, nous avons purifié le complexe en utilisant les partenaires de Tg-p43 comme appâts. Des parasites exprimant des versions étiquetées de MRS et YRS ont été créés. La présence de l'étiquette n'induit aucune altération visible de

la croissance des parasites. Par contre, l'étiquetage de QRS et ERS n'a pas été possible, suggérant une possible létalité due à la modification C-terminale des protéines. Les purifications via YRS et MRS ont néanmoins permis de confirmer la composition du MARS de *T. gondii* (*PONE*, figure 3A, images du centre et de droite), avec cependant une hétérogénéité dans l'abondance des protéines. Par ailleurs, YRS et MRS ont été localisées via leurs étiquettes HA dans le compartiment cytoplasmique, comme Tg-p43 (*PONE*, figure 4A). La localisation cytoplasmique de la Glutaminyl-RS (QRS) a été confirmée (*PONE*, figure 4B) par l'utilisation d'un antisérum dirigé contre une QRS recombinante produite en *E. coli* et dont la réactivité spécifique avait été préalablement testée (Figure additionnelle 4).

f) Interactions protéines-protéines

Afin de vérifier le rôle supposé de Tg-p43 dans l'assemblage du complexe et d'identifier d'éventuels sous-complexes formés en son absence, le gène *Tg-p43* a été supprimé dans des souches transgéniques exprimant des versions étiquetées de ses partenaires YRS et MRS. L'immunopurification des deux aaRS en absence de Tg-p43 a alors montré l'absence du complexe MARS (*PONE*, figure 5A), traduisant l'interaction directe d'YRS et de MRS avec Tgp43 et/ou le rôle de cette protéine dans la mise en place et le maintien de l'ultrastructure. Afin de déterminer si les deux extrémités de la protéine Tg-p43 sont nécessaires à l'assemblage, un mutant n'exprimant que les 296 acides aminés de l'extrémité N-terminale de Tg-p43 a été produit par insertion de l'étiquette protéique au sein de la séquence codante du gène *Tg-p43*. Les protéines co-purifiées avec cette version tronquée Δ C-Tg-p43-HA-FLAG étaient les mêmes qu'avec la version native, indiquant que la partie N-terminale

(incluant le domaine GST) de Tg-p43 est suffisante à l'assemblage du complexe (*PONE*, figure 5B).

Pour déterminer si QRS interagit directement avec Tg-p43, les protéines contenues dans les lysats des souches RHΔKu80-p43-Myc-FLAG et RHΔKu80-ΔTg-p43 ont été séparées par SEC. L'analyse des fractions montre que QRS est associé à Tg-p43 au sein des fractions de haut poids moléculaire (de 0,3 à 1 MDa), tandis que QRS migre avec des poids globulaires plus petits en absence de Tg-p43 (PONE, figure 5C), traduisant une interaction directe entre Tg-p43 et QRS.

63

g) Comportement du complexe en solution

L'application de la SEC aux diverses protéines immunopurifiées a ensuite permis d'analyser la distribution des espèces obtenues en fonction de leur taille globulaire. La majeure partie de Tg-p43 apparaissait dans des fractions de faible masse, autour de 250 kDa, en accord avec la masse globulaire de la protéine recombinante r-Tg-p43 observée précédemment (PONE, figure 2B) et correspondant probablement à un homo-oligomère.

Si la masse maximum du complexe avoisinait 1,5 MDa, les espèces co-éluées avec Tg-p43-Myc-FLAG apparaissaient cependant distribuées de manière bimodale, avec un maximum d'intensité vers 1 MDa et un autre vers 300 kDa (PONE, figure 6A). YRS était préférentiellement associé au complexe de haut poids moléculaire, quel que soit son partenaire utilisé pour la purification du complexe (PONE, figure 6A, B) ; réciproquement, la purification via YRS-HA-FLAG se traduisait par la quasi-absence d'espèces de bas poids moléculaire (PONE, figure 6D). Le profil obtenu à partir de ΔC-Tg-p43-HA-FLAG était semblable (PONE, figure 6C).

h) Aspect du complexe en microscopie électronique

Le complexe qui a permis les observations microscopiques a été isolé en immunopurifiant YRS-HA-FLAG, les tentatives à partir de MRS et p43 n'ayant pas permis d'obtenir une homogénéité de taille. L'observation après contre-coloration à l'acétate d'uranyle montrait la présence d'entités de taille homogène et bien séparées, mais moins distinctes que ce qui pouvait être attendu pour une structure macromoléculaire dense (*PONE*, figure 7A et B). A l'aide de programmes informatiques de traitement d'images, des vues représentant la moyenne de l'ensemble des images après pré-centrage (*PONE*, figure 7C) ou pré-centrage et alignement rotationnel d'un sous-ensemble d'images de forme hélicoïdale (*PONE*, figure 7D) étaient produites. Dans tous les cas, ces analyses concordaient à établir l'image d'une particule en forme d'hélice, compatible avec une organisation en domaines flexibles disposés autour d'un noyau central annulaire conservé. Les domaines périphériques, après moyennage des images, apparaissent comme un large anneau dont l'intensité est inférieure au noyau central (*PONE*, figure 7C, D, E).

3. Article

Assembly of the Novel Five-Component Apicomplexan Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex Is Driven by the Hybrid Scaffold Protein Tg-p43. PLoS ONE. 2014;9(2):e89487.

Assembly of the Novel Five-Component Apicomplexan Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex Is Driven by the Hybrid Scaffold Protein Tg-p43

Jason M. van Rooyen^{1,2,3}^{*}, Jean-Benjamin Murat^{2,3}^{*}, Pierre-Mehdi Hammoudi^{2,3}, Sylvie Kieffer-Jaquinod⁴, Yohann Coute⁴, Amit Sharma⁵, Hervé Pelloux^{2,3}, Hassan Belrhali¹*, Mohamed-Ali Hakimi^{2,3}*

1 European Molecular Biology Laboratory, Grenoble, France, 2 CNRS, UMR5163, LAPM, Grenoble, France, 3 Université Joseph Fourier, Grenoble, France, 4 CEA, IRTSV, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, Grenoble, France, 5 Structural and Computational Biology Group, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), New Delhi, India

Abstract

In *Toxoplasma gondii*, as in other eukaryotes, a subset of the amino-acyl-tRNA synthetases are arranged into an abundant cytoplasmic multi-aminoacyl-tRNA synthetase (MARS) complex. Through a series of genetic pull-down assays, we have identified the enzymes of this complex as: methionyl-, glutaminyl-, glutamyl-, and tyrosyl-tRNA synthetases, and we show that the N-terminal GST-like domain of a partially disordered hybrid scaffold protein, Tg-p43, is sufficient for assembly of the intact complex. Our gel filtration studies revealed significant heterogeneity in the size and composition of isolated MARS complexes. By targeting the tyrosyl-tRNA synthetases subunit, which was found exclusively in the complete 1 MDa complex, we were able to directly visualize MARS particles in the electron microscope. Image analyses of the negative stain data revealed the observed heterogeneity and instability of these complexes to be driven by the intrinsic flexibility of these ubiquitous but poorly understood eukaryotic complexes.

Citation: van Rooyen JM, Murat J-B, Hammoudi P-M, Kieffer-Jaquinod S, Coute Y, et al. (2014) Assembly of the Novel Five-Component Apicomplexan Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex Is Driven by the Hybrid Scaffold Protein Tg-p43. PLoS ONE 9(2): e89487. doi:10.1371/journal.pone.0089487

Editor: Ira J. Blader, University at Buffalo, United States of America

Received November 25, 2013; Accepted January 20, 2014; Published February 20, 2014

Copyright: © 2014 van Rooyen et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Agence Nationale Recherche, France [grant ANR Blanc 2012 TOXOHDAC - grant number ANR-12-BSV3-0009-01]; the Laboratorier d'Excellence ParaFrap, France [grant number ANR-11-LABX-0024]; the Fondation Innovations en Infectiologie Foundation, France (FINOVI); and the Outstanding Scientist Research Programme of the Department of Biotechnology, India. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The coauthor Mohamed Hakimi, is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: Mohamed-ali.hakimi@ujf-grenoble.fr (M-AH); belrhali@embl.fr (HB)

• These authors contributed equally to this work.

Introduction

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) are responsible for correctly charging tRNA molecules with their cognate amino acids, the essential precursor step of protein translation in all life [1]. While certain aaRSs are absent in prokaryotes, eukaryotes on the other hand possess a full complement of the 20 synthetases and these often contain additional non-catalytic regions, making them on average larger than their prokaryotic counterparts [2]. It is these N- and C-terminal extensions, and their derivatives, that endow the eukaryotic aaRSs with their non-canonical functions including their roles as cytokines responsible for eliciting inflammatory and apoptotic responses [3,4].

In eukaryotes a subset of these aaRSs are arranged into a stable cytoplasmic assembly called the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex (MARS). The largest and best described complex is found in higher eukaryotes, from vertebrates to arthropods, and comprises nine aaRSs from both class I and II: aspartyl (DRS), lysyl (KRS), glutaminyl (QRS), methionyl (MRS), arginyl (RRS), leucyl (LRS), isoleucyl (IRS), and the bifunctional glutamyl-prolyl aminoacyl-tRNA synthetase (ERS,PRS), together with three accessory proteins: p18, p38, and p43 [5]. As in the case of the

aaRSs, some of these aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins (AIMPs) have regulatory roles as cytokines or precursors thereof [6]. Notably, p43 is known to be cleaved into EMAP II, a secreted peptide implicated in apoptosis induction and angiogenesis [7]. Detailed protein-protein interaction studies [8] however have shown that the most important roles of the AIMPs is as the principal factors driving the assembly of MARS complexes. Specifically, it is now understood that dimers of the p18 and p43 scaffold proteins are each responsible for the assembly of separate subcomplexes which are then brought into association by their interactions with a dimer of p38 [9]. In addition to the interactions affected by the scaffold proteins there is also strong evidence for direct associations between aaRSs [10]. Surprisingly, the MARS complex from the nematode Caenorhabditis elegans differs by the absence of the p18 and p43 scaffold proteins, and only contains eight of the nine aaRS (seven of which are common) present in the human complex [11]. In addition to the assemblies discovered in metazoans, a rather limited and well characterized MARS complex has been isolated from the yeast Saccharomyces cerevisiae. It is composed of only the class I aaRSs:

methionyl- and glutamyl-RS, together with one scaffold protein, Arc1p [12].

Although several theories have been suggested for the function of these assemblies, the best supported being (a) direct channeling of charged tRNA to actively translating ribosomes via nuclear export of charged tRNA [13,14], (b) the enhancement of aaRS activity through the recruitment of non-specific tRNA binding domains [15], and (c) spatio-temporal control of the moonlighting functions of component aaRSs [9], the exact cellular role and the basis for the choice of aaRS in the complex remains in dispute. In spite of this uncertainty and the differences in both the arrangements and numbers of components present in the various MARS complexes described to date, common features do suggest a shared mechanism of assembly. In particular, several conserved domains have been identified in both the non-catalytic extensions of the aaRSs and the AIMPs [4]. For instance, a motif with homology to the C-terminal domain of glutathione-S-tranferase (GST-like domain) occurs frequently in proteins associated with translation [5] and is known to drive pairwise protein-protein interactions in these assemblies [16]. Another commonly observed motif derives from ancestral tRNA binding proteins, like Trbp111, and in addition to their role in enhancing the catalytic activity of binding partners, through non-specific tRNA binding [17,18], these motifs have also been implicated in protein associations [19]. The molecular basis underlying these interactions has best been described in the yeast MRS-ERS-Arc1p MARS complex. Through a series of structural and biochemical studies it has been shown that the GST-like domain of the hybrid Arc1p scaffold protein is solely responsible for the associations with the aaRSs of the complex [20] and that these dimerization interfaces are contributed by independent sites in the same motif [21]. Whether similar interfaces are responsible for some interactions of components in the larger metazoan complexes is highly likely but the exact molecular basis of all the interactions and how they relate to the function of these poorly understood complexes still awaits further structural studies.

In an attempt to answer these questions and to shed light on the universality of the current assumptions regarding these apparently ubiquitous eukaryotic complexes, we undertook a molecular interaction, biochemical, and ultra-structural study of a MARS complex from *Toxoplasma gondii*. In this work, we provide the first description of the composition and arrangement of the MARS complex from apicomplexans, a phylum of unicellular eukaryotes that comprises several obligate intracellular parasites of medical importance, and also explain some of its properties, such as its instability and heterogeneity, directly in terms of the flexibility of its structure. Our results have important implications for future structural studies aiming to elucidate the molecular basis of the assembly and functioning of the MARS complex in higher eukaryotes.

Materials and Methods

Chemicals and Cell culture methods

All chemicals were sourced through Sigma-Aldrich and cell culture media from Life technologies unless otherwise specified. Human foreskin fibroblast (HFF) and Human Embryonic Kidney 293 cells (HEK293) cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 10 mM HEPES buffer (pH 7.2), 4 mM glutamine, and 50 mg/mL each of penicillin and streptomycin. Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂ in humidified air. All *Toxoplasma* strains were maintained by serial passage in HFF monolayers.

Animal methods

Outbred female Swiss mice, weighing approximately 20 g, each were used for *in vivo* experiments. These animals were maintained in specific pathogen-free conditions in accordance with institutional and national regulations and all protocols were approved by the Floralis (Joseph-Fourier University) Committee on Animal Care. Parasites were inoculated by intraperitoneal injection of 200 μ L of a suspension in Hank's balanced salt solution (HBSS). To check that an infection had occurred, mice that did not spontaneously die were euthanized in an approved CO₂ chamber; whole blood was collected through an intracardiac puncture, and serum was subjected to the Toxoscreen DA (bioMérieux) assay. To test the ability to induce cysts, brains from these mice were treated as previously described [22] and cysts were observed and numbered microscopically.

Bioinformatics

Homologs of the Toxoplasma p43 protein (TgME49_223140) were identified by GenTHREADER [23] after splitting the sequence into domains on the basis of the NCBI Conserved Domain Search annotation [24]. These included: Saccharomyces cerevisiae Arc1p (pdb id: 2htqA), Homo sapiens p18 (2uz8A), Homo sapiens p43 (1fl0A). In order to generate a multiple-sequence alignment, the corresponding structures were aligned in UCSF Chimera [25] using Match-Maker [26]. The Tg-p43 and Hs-p38 sequences were then manually aligned to the resulting structurebased profile, from Match-Align, on the basis of the original GenTHREADER alignment using GeneDoc [27]. The latter program was also used for sequence identity calculations and alignment rendering. Domain structure analyses of the GST Cterminal domain containing proteins: Tg-MRS (TgVEG_083160), Tg-QRS (TgVEG_007070), Tg-ERS (TgVEG_049140), Tg-p43 (TgME49_223140), and Tg-YRS (TGVEG_000460) were carried out using NCBI Conserved Domain Search with an E-value threshold of 1. In silico predictive disorder analysis was carried out with Genesilico MetaDisorder2 [28].

Construction of recombinantly tagged MARS subunits and Tg-p43 knockout

To construct the vectors: pLIC-p43-Myc-FLAG, pLICp43 Δ Cterm-HA-FLAG, pLIC-p43-HA-FLAG, pLIC-YRS-HA-FLAG, and pLIC-MRS-HA-FLAG, coding sequences of Tgp43, Tg-YRS and Tg-MRS were amplified from genomic DNA of a RH $\Delta Ku80$ strain using primers (Table S1). The resulting PCR products were cloned into pLIC-MF-dhfr and pLIC-HF-dhfr vectors using the LIC cloning method as described previously [29]. Plasmids were transfected into freshly isolated tachyzoites by electroporation as described previously [29] and transfected parasites were selected for resistance to pyrimethamine (DHFR selection) and cloned by limiting dilution.

To generate a Tg-p43 knockout, the Multisite Gateway Pro 3fragment Recombination system (Life Technologies) was used to clone the dhfr cassette or the hxgprt cassette flanked by the 5' and 3' surrounding regions of the Tg-p43 coding sequence of RH- $\Delta Ku80$ and Pru $\Delta Ku80$ genomic DNA as described previously (20) using primers attB1-066670, attB4-066670, attB3-066670 and attB2-066670 (Table S1). The final plasmids (p Δ Tg-p43-DHFR or p Δ Tg-p43-HXGPRT) were used as templates to amplify the sequences for transfection, using primers attB1-066670 and attB2-066670. Purified DNA fragments were transfected as above and clones selected for by incorporation of both xanthine and mycophenolic acid (HXGPRT selection).

PLOS ONE | www.plosone.org

2

Immunouorescence assays (IFA)

For labeling, HFFs grown on cover-slips infected with parasites were treated as described previously [29] with the following modifications. Coverslips were incubated for 1 h with the primary antibodies anti-Myc (9E10:sc-40, Santa Cruz Biotechnology), anti-HA (3F10; Roche) or anti-TgQRS rabbit polyclonal antibodies (see Western blot section below), followed by the secondary antibodies goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG coupled with either Alexa Fluor 568 or Alexa Fluor 488 dye (Invitrogen) at a 1:1,000 dilution. *Toxoplasma* anti-TgSUMO labels parasite nucleus [30].

Immunoprecipitation of recombinantly tagged MARS subunits

Cell-free extracts containing FLAG-tagged proteins were prepared as follows: extracellular parasites from twenty 500 cm² flasks (Nunc TripleFlasks, Thermo Fisher Scientific) were lysed in 7 mL of BC100 buffer (20 mM TrisHCl pH 8, 10% glycerol; 0.2 mM EDTA, 0.1 M KCl) with the addition of a protease inhibitor cocktail (Complete Protease Inhibitor Tablets, Roche) using a Dounce homogenizer (tight plunger). The lysate was centrifuged twice at 21,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was then incubated with 200 µL anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma- Aldrich) for 1 hour. Beads were then washed with 5 column volumes (CV) washing buffer (25 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10% glycerol, 10 mM MgCl2), followed by 5 CV of washing buffer with 500 mM KCl and finally another 5 CV of low-salt wash buffer, before bound polypeptides were eluted with two CV of wash buffer containing 250 µg/mL FLAG peptide.

Size-exclusion chromatography (SEC)

Immunoprecipitation eluates were concentrated to <100 μ l by ultra-filtration with a 10 kDA molecular weight cut-off (MWCO) filter (Nanosep centrifugal device, Pall Corporation, Omega membrane) before loading onto a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) using the AKTA Purifier system (GE Healthcare). Separations were carried out in 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 10% glycerol, 10 mM MgCl₂ at 4°C with a flow rate of 0.5 mL/min and fractions were collected every minute. The column was periodically calibrated using high-molecular weight standards (Sigma-Aldrich) and the consistency of chromatographic profiles was assessed by comparison of the FLAG peptide's elution volume in each separation.

Protein analysis, visualization, and identification

Eluates from immunoprecipitation or SEC were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using pre-cast gradient gels (NuPAGE® Novex®4–12% Bis-Tris polyacrylamide gel, Life Technologies) with MES-SDS running buffer using the XCell SureLock® Mini-Cell as per the manufacturer's instructions. Proteins were then visualized by silver staining using ProteoSilver Plus Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich). For identification by mass-spectrometry (MS), proteins were first concentrated by precipitation with trichloracetic acid (1/6th volume), washed twice with ice-cold acetone, before separation by SDS-PAGE and staining with the Colloidal Blue Staining Kit from Life Technologies. Identification of the proteins in the excised bands by MS-MS was carried out as previously described [31].

Western blot analysis

Cell-free extracts were prepared from three 175 cm² flasks as described above, maintaining the same ratio of resuspension buffer to plate surface area. Following size-exclusion chromatographic separations, eluted fractions were separated by SDS-PAGE and then electro-blotted onto polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P; Millipore) with the XCell IITM Blot Module (Life Technologies) as per the instructions.

Membranes were then probed with a 1:4000 dilution of the anti-TgQRS antiserum or a 1:1000 dilution of an anti-FLAG antibody (mouse Monoclonal ANTI-FLAG[®] M2 antibody, Sigma-Aldrich). The blots were developed with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Thermo Fisher Scientific) and imaged on the C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences). The anti-Tg-QRS rabbit polyclonal antibodies were raised against recombinant *E. coli* – derived Tg-QRS protein by Eurogentec following their Speedy 28-day protocol and the final bleed (day 28) was used for blotting.

Electron Microscopy

Immunoprecipitation eluents of YRS-HA-FLAG, from 17 500 cm² flasks (Nunc TripleFlasks, Thermo Fisher Scientific) using 0.4 μ l anti-FLAG resin, were concentrated to 100 μ l (from an original volume of 1500 µl) by ultrafiltration with a 10 kDa MWCO centrifugal unit (as described above). Samples were then diluted by 1:5 in 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl before application of 3.5 μ l onto copper electron microscope grids coated with a plasma-treated thin carbon support films (Electron Microscopy Sciences). Staining was accomplished with 2% uranyl acetate solution using the droplet method and electron micrographs were recorded by a Gatan ORIUS 2.7 k×2.7 k CCD camera at a nominal magnification of 25 000 times using a JEOL 1200 EX II microscope operating at 100 kV. Particle images (1030) were manually selected and windowed (128 pixel) from 50 micrographs (sampling of 2.7 Å/pixel) using SIGNATURE [32]. Rotational averages were calculated in EMAN1 [33] following pre-centring and the radial profile was plotted from the resulting total average in ImageJ [34]. Iterative reference-free averaging in EMAN was used to generate the representative average of a manually selected sub-set of images (137 out of 1030) and iterative reference-free classification produced the class averages for heterogeneity assessment.

Heterologous expression and purification of recombinant proteins

The gene for Tg-p43 (TgVEG_053640), codon-optimized for expression in E. coli by GeneArt (Life Technologies), was the starting material for cloning. Primers were designed to amplify a region corresponding to the TgME49_223140 gene product (see text for details regarding the identification of the shorter gene product and Table S1 for primer sequences) and the included NcoI and BamHI sites were used to subclone the resulting PCR product, which included a C-terminal 6×histidine tag, into a pETDuet-1 (Novagen) expression vector. Positive transformants were selected for in E. Coli Top10 cells (Life Technologies) and isolated plasmid DNA was transformed into E. coli BL21 (DE3) cells for expression. Cultures were grown in Luria Broth (1 L), at 37°C, with shaking (200 rpm), in the presence of ampicillin, to an optical density of 0.6 (at 600 nm) before Isopropyl β-D-1thiogalactopyranoside (1 mM final concentration) was added to induce protein expression. Induced cultures were incubated at 37°C for 3 hrs before cells were collected by centrifugation at 5000 rcf for 10 min at 4°C, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), and stored at -20° C. Lysis of cell pellets resuspended in 25 mM Tris pH 7.5, 20 mM imidazole, 300 mM KCl, 10% glycerol, 10 mM MgCl₂, was accomplished by 3 min sonication (Vibra-Cell VC750 from Sonics and Materials, inc.) on ice before

clarification using two rounds of centrifugation at 21000 rcf for 10 min at 4°C. Immobilized metal affinity chromatographic purification was carried out by loading supernatents onto a nickel-nitrilotriacetic acid agarose column (Qiagen) pre-equilibrated with lysis buffer at 1 ml/min. Unbound proteins were removed by washing with 10 column volumes (CV) before elution of tagged-proteins with a linear gradient (10 CV) of imidazole (from 25 mM to 175 mM) in the same buffer. Selected fractions were pooled and concentrated by ultrafiltration (Vivaspin 15 turbo unit – Sartorius-Stedim and Microsep unit – Pall Corporation; 10 kDa MWCO 4°C) to 20 mg/ml before SEC. Following concentration, peak fractions were flash-frozen into liquid nitrogen for long-term storage at -80°C.

The shortened construct of Tg-p43 was also cloned into a pcDNA4 vector (Life Technologies) using primers (Table S1) which included a C-terminal FLAG-tag, as described in [29]. Transient expression was achieved by transfecting HEK293 cells, grown to 60% confluence in 3×75 cm² plates (Greiner Bio-one), with 35 μ g of vector DNA and 45 μ g of polyethylenimine. Following 48 hrs incubation, with one change of medium at 24 hrs, plates were washed with PBS before storage at -80° C. Cells were then harvested from thawed plates by scraping with 6 ml of 20 mM TrisHCl pH 8, 10% glycerol, 0.2 mM EDTA, 500 mM KCl buffer containing protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Tablets, Roche). Following lysis using a Dounce homogenizer, samples were clarified by two rounds of centrifugation at 21,000 g for 10 min at 4°C. Isolation of tagged protein was achieved with the same protocol as describe above for immunoprecipitation of recombinantly-tagged Toxoplasma proteins. For final purification, eluted proteins were concentrated by ultracentrifugation and subjected to SEC.

The sequence for Tg-QRS (TgME49_217460) was codonoptimized for expression in E. coli and synthesized by GenScript. The included NdeI and XhoI restriction sites were used to subclone the gene into a pET-28 b (+) vector (Novagen) and transformants selected in Top10 cells (Life Technologies). Expression and purification conditions were the same as for the Tg-p43 preparations (described above) with the exception that kanamycin was employed during cell culture and cellular lysis was accomplished chemically. Briefly, cell pellets were thawed and resuspended in 1/20th of the volume of 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, and 50 mM NaCl containing protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Tablets, Roche). Lysozyme was added to 0.1 mg/ml and samples left shaking at 37°C for 30 min before carrying out three freeze-thaw cycles. Another 30 min incubation followed the addition of MgCl₂ to 20 mM and DNAse to 0.1 mg/ml.

Biophysical and biochemical characterization

Analytical SEC separations of recombinantly prepared Tg-p43 from *E. coli* and HEK293 cells were carried out as described above with a calibrated S200 column. Multi-angle laser light scattering measurements were carried out on *E. coli* – derived Tg-p43 samples (2.3 mg/ml), separated by an identical S200 column (operated under the same conditions but without glycerol or DTT and calibrated with the same standards as above) attached to a dedicated chromatography system with an in-line Dawn EOS detector (Wyatt). Circular dichroism spectroscopy analysis was performed on diluted *E. coli* – derived Tg-p43 (2.3 mg/ml in 25 mM phosphate buffer solution containing 150 mM sodium fluoride) at 20°C using a Jasco J810 spectropolarimeter. Cross-linking experiments were carried with purified *E. coli*-derived Tg-p43, β-amylase, and carbonic anhydrase (Sigma HMW SEC standards), following buffer exchange and concentration by

ultrafiltration to 1 mg/ml in PBS with 10% glycerol. Crosslinking was carried out with 0.25% glutaraldehyde on ice and the reaction stopped at the given intervals by adding Tris-HCl pH 8 to 300 mM. Ultrafiltration retention tests of *E. coli* -derived Tgp43 utilized a 100 kDa MWCO filter (Nanosep centrifugal device, Pall Corporation, Omega membrane) operated according to the manufacturer's recommendations.

Results

Toxoplasma possesses a hybrid p18/p43-like protein, Tg-p43

Our interest in Tg-p43 initially derived from its inclusion in the category of disordered proteins with possible roles in host cell posttranslational control. Preliminary isolations of endogenous Tg-p43 (tagged with a FLAG motif via homologous recombination) however soon showed that the EMAPII cytokine-like portion of the protein was not cleaved and secreted beyond the parasitophorous vacuole by tachyzoites, as first suspected. Instead, a highly abundant full-length protein was recovered and confirmed by mass-spectroscopy to correspond to the annotated gene product TgGT1_223140. This protein comprises an all-alpha helical glutathione-S-transferase C-terminal-like domain followed by an EMAPII-like tRNA binding domain (Figure 1). The former domain shares 17% identity with the GST domain of human p18 and only 15% with human p38. The latter domain displays 30% identity with the tRNA-binding domain of human p43 (Figure 1). Tg-p43 also shares 20 and 25% identity with the GST-C and RNA-binding domains respectively of S. cerevisiae Arc1p. Being a member of the Myf tRNA-binding domain family, the EMAPIIlike tRNA binding domain of Tg-p43 also displays some (13 %) resemblance to the tRNA binding domain of Toxoplasma MRS.

The regions outside of the GST and tRNA-binding domains of the Tg-p43 sequence (38% of the total residues) were predicted to be disordered on the basis of their high percentage of charged and polar residues and this was subsequently confirmed by CD spectroscopy of pure Tg-p43, recombinantly expressed in E. coli, which measured a random coil composition of 40.7% (Figure 2A). Interestingly, various biochemical and biophysical analyses of recombinant material purified from both E. coli and human (HEK293 cells) expression systems also suggested a tendency of Tg-p43 to oligomerise. Firstly, size-exclusion chromatographic separations of recombinant Tg-p43 from both E. coli and human HEK293 cells (Figure 2B), as well as Tg-p43-Myc-FLAG isolated from extracellular parasites (see below) yielded molecular weight estimates far in excess (250 kDa) of the monomeric molecular weight (51 kDa). Secondly, E. coli-derived recombinant Tg-p43 is retained by membrane filters with a MWCO of 100 KDa (Figure 2C), and, lastly, Tg-p43 is rapidly chemically cross-linked as a predominantly dimeric species (Figure 2D).

Tg-p43 is not essential for survival or pathogenesis

In order to test whether p43 is an essential protein in *T. gondii*, the corresponding gene was deleted in the type I strain RH Δ Ku80 as well as in the type II strain, Pru Δ Ku80 (Figure S1). Both RH Δ Ku80 Δ p43 and Pru Δ Ku80 Δ p43 appeared to be viable without any obvious defect in culture. Most importantly, no differences in infectivity and lethality were observed between RH Δ Ku80 Δ p43 or Pru Δ Ku80 Δ p43 and their parental strains when injected into mice (at lethal inoculums) and their survival monitored (Figure S2). Similarly, numbering of brain cysts after infection with 10⁵ tachyzoites showed that cystogenicity of Pru Δ Ku80 Δ p43 was maintained (data not shown).

PLOS ONE | www.plosone.org



Figure 1. Relationship of Tg-p43 to similar amino-acyl tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins from other species. Multiple sequence alignments of the GST-C (GST) and RNA-binding (RB) domains of Tg-p43 and select homologs (Tg=Toxoplasma gondii, Sc=Saccharomyces cerevisiae, Hs = Homo sapiens) are shown above and below a schematic diagram of the Tg-p43 domain arrangement. The residue numbers of domain boundaries are listed in the schematic and at the beginning and end of the individual sequences. doi:10.1371/journal.pone.0089487.g001

The *Toxoplasma* MARS complex is cytoplasmic and comprises Tg-p43 together with four aaRSs

In order to determine if Tg-p43 is involved in Toxoplasma MARS complex formation, as predicted by the similarities with the MARS accessory proteins from yeast and humans, binding partners of Myc-FLAG-tagged-Tg-p43 were identified by immunoprecipitation. In addition to the tagged Tg-p43 protein four additional proteins were detected by SDS-PAGE (Figure 3) and identified by MS-MS as: methionyl-tRNA synthetase (106 kDa), glutaminyl-tRNA synthetase (96 kDa), glutamyl-tRNA synthetase (88 kDa), tyrosyl-tRNA synthetase (YRS) (48 kDa). The same result was obtained from freshly egressed tachyzoites of the type II (Prugniaud) cystogenic strain (data not shown) and immunoprecipitations targeting the YRS and MRS subunits of the MARS complex subsequently confirmed the composition of the complex (Figure 3). It can also be seen from Figure 3 that the MRS and YRS components were the least abundant (when not the target of immunoprecipitation) and that the level of Tg-p43 and ERS was always higher than that of QRS in the isolations. Degradation products were also detected in eluates of the least abundant subunit, MRS, the only case where this was detected. The detection of any of the component subunits was not affected by salt concentrations, up to 500 mM of either potassium chloride or ammonium acetate, during the washings stages of the affinity purifications.

Unfortunately, it was not possible to generate viable *Toxoplasma* parasite strains expressing C-terminal tagged version of the ERS or QRS proteins. Instead we raised antibodies against heterologously-expressed QRS and immunofluorescence experiments using these identified an exclusively cytoplasmic location for QRS in agreement with the localizations of Tg-p43-HA-FLAG, MRS-HA-FLAG, and YRS-HA-FLAG (Figure 4A and Figure 4B).

The N-terminal GST C-terminal like domain of Tg-p43 is sufficient to mediate complete assembly of the MARS complex

Tagging and immunoprecipitation experiments of select subunits were then carried out in parasite strains lacking $T_{g-p}43$ (Figure S1) to confirm the predicted role of Tg-p43 in complex assembly and to identify any sub-complexes formed in its absence. The deletion of $T_{g-p}43$ resulted in total disruption of the complex as evidenced by the absence of any binding partners in the eluates of both YRS and MRS HA-FLAG-tagged subunits (Figure 5A) from $T_{g-p}43$ knockout strains (Δ p43). Additional bands were visible in the latter case but MS-MS analyses confirmed that these were the degradation products seen previously rather than a subcomplex of MRS with other aaRS of *Toxoplasma* MARS.

In addition to the knock-out of Tg-p43, a tagged mutant lacking the C-terminal half of the protein i.e., only containing residues 1 to 296, was created to ascertain whether both domains of the protein are responsible for complex assembly. Immunoprecipitations of the Tg-p43 Δ C-HA-FLAG protein showed the same pattern of coeluting partners (as identified by MS-MS) thus confirming that the N-terminal GST-like domain alone is sufficient for assembly of the *Toxoplasma* MARS component subunits (Figure 5B).

Because it was not possible to create a tagged QRS protein, sizeexclusion chromatography of cell-free preparations of Tg-p43containing and Tg-p43 KO strains was used to determine whether the recruitment of QRS to the MARS complex is mediated by Tgp43 (Figure 5C). Western blot analysis using anti-QRS polyclonal antibodies clearly identified a high-molecular weight fraction, corresponding to a calibrated molecular weight between 1.0 and 0.3 MDa, in p43-containing tachyzoites but not in the KO strain.

PLOS ONE | www.plosone.org



49

38 28

Figure 2. Characterization of the folding and oligomeric state of recombinant Tg-p43. (A) Circular dichroism spectrum of recombinant Tgp43 expressed and purified from E. coli. The percentages of the calculated secondary structures are given in the inset. (B) SEC profile of pure recombinant E. coli (blue) and HEK293 (orange)-derived Tg-p43 protein. The MW of the eluted proteins, calculated by calibration with HMW standards (inset left), is shown above the trace. (C) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel image of E.coli-derived Tg-p43 retained and passed by a 100 kDa MWCO ultrafiltration device. (D) Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel comparing the susceptibility to cross-linking (glutaraldehyde) of E.coli-derived Tg-p43 vs. beta-amylase (tetrameric oligomer) and carbonic anhydrase (monomeric) proteins. Based on size considerations, bands have been labeled as either monomers (M), dimers (D), trimers (Tr), or tetramers (Te). doi:10.1371/journal.pone.0089487.g002

Toxoplasma MARS complex displays significant heterogeneity in solution

50⁻¹ dilution

1

28

The large upper size limit of the Toxoplasma MARS complex was confirmed by extensive size-exclusion chromatographic separations of FLAG-tagged material which also revealed a distribution of molecular weight sub-species (Figure 6). The size distribution of proteins co-eluting with the scaffold protein, Tg-p43-Myc-FLAG, displayed an almost bimodal distribution of species with a high molecular weight peak centred on 1.0 MDa and a low molecular

6



Figure 3. Composition of the *Toxoplasma* MARS complex. Silverstained PAGE of MARS complex proteins (identified by MS-MS) isolated by FLAG immuno-precipitation of endogenously tagged subunits (indicated in boldface: mF = Myc-FLAG and HF = HA-FLAG epitope tags) from extracellular parasites. doi:10.1371/journal.pone.0089487.g003

weight peak occurring around 0.3 MDa, with lower concentrations of subunits found in the intervening fractions (Figure 6A). The lower molecular weight peak, the position of which (250 kDa) was similar to the measurements from recombinant Tg-p43 (Figure 2B), contained the largest fraction of Tg-p43. Most interestingly, however, all of the detectable YRS protein was found in the high molecular weight fractions (Figure 6A) and similar results were obtained from separations of Tg-p43 Δ C-HA-FLAG (Figure 6B) and MRS-HA-FLAG (Figure 6C). This preferential association with the high molecular weight complexes was subsequently confirmed by isolations of YRS-HA-FLAG-tagged material (Figure 6D) which were highly enriched in this species with a conspicuous absence of intermediate and low molecular weight species (except for some presumably dimeric YRS). The Tg-p43∆C-HA-FLAG complex displayed a similar enrichment but with a broader distribution of QRS and ERS proteins occurring towards lower MWs (Figure 6B).

Flexible domains surround a central ring-like core in the *Toxoplasma* MARS complex

The poor homogeneity of the Tg-p43-Myc-FLAG- and MRS-HA-FLAG-tagged MARS complexes was confirmed by electron microscopy investigations which failed to identify a species of particle representative of the large molecular weight MARS complex. Unfortunately, attempts at imaging the various molecular weight species separated during SEC were no better due to the apparent susceptibility of the MARS complex to the large dilution effects imposed during separation (data not shown). In order to circumvent this heterogeneity, subsequent EM studies focused on the concentrated preparations of immunoprecipitated YRS-HA-FLAG-tagged material. Large and well separated particles were clearly visible in negatively-stained micrographs of these samples (Figure 7A) but these particles were not very distinct due to the extended nature of their substructures. These domains, although clearly separated from each other, were not arranged as the dense globular structures expected for large macromolecular complexes.

Careful analysis of the images led to the identification of a subset of particles displaying a consistent view of the large particles, or a species thereof (Figure 7A and 7B). In these views it is clear that particles have the overall appearance of a propeller-like structure with peripheral sub-structures radiating from a central ring-like core. Averaging of centred but not rotational aligned images clearly shows that the central ring, with a maximum diameter of 120 Å, is the most conserved feature between particles (Figure 7C). The arrangement of the peripheral substructures of the particles, however, differ not only in their distance from the core, with a maximum diameter of 240 Å, but also in their arrangement around the circumference leading a much weaker ring of averaged density (Figure 7C). This is further exemplified by the rotational alignment and averaging (compared to only centring) of images which resulted in the appearance of weak and diffuse density arranged in spatially separated regions around the periphery of the particle (Figure 7D – left). The core region, on the other hand, produces more homogenous class averages (sub-classes of aligned views), which display subdivisions consistent with an oligomeric arrangement of proteins, when only this central region is aligned and averaged (Figure 7D – right). Similar alignments and classifications of all the particles in the micrographs (not just the propeller-like views) confirmed this structural flexibility by showing a strong dominance of the central region in the highly heterogeneous averages (Figure 7E).

Discussion

Presence and features of Tg-p43

Our preliminary isolations of tagged endogenous Tg-p43 confirmed the bioinformatics analyses of the Toxoplasma genome [35] which predicted the presence of a protein with both an Nterminal, all-alpha helical, glutathione-S-transferase C-terminallike domain and a C-terminal EMAPII-like tRNA binding domains. Our results however showed that the latter domain is not cleaved to become an extracellular cytokine, as in the case of the human p43 protein [36,37]. Furthermore, the human p43 protein does not possess a GST C-terminal like domain. Instead, these motifs are contributed by the p38 and p18 accessory proteins. In this sense, the domain structure of Tg-p43 more closely resembles the yeast Arc1p protein which is also a hybrid scaffold protein containing sequence features resembling different regions of the human AIMPs. This similarity is reflected at the sequence level where these proteins share 20 and 25% identity between their matching GST-C and tRNA-binding domains, respectively. In comparison, the divergence is much larger between the Tg-43 GST domain and the human p43 and p38 proteins which only share 17% sequence identity.

The remainder of the Tg-p43 sequence shares very little homology with known proteins and was predicted to be largely disordered based on the percentage of highly charged and polar residues (Figure 8). The results of our circular dichroism measurements confirmed that 38% of the protein was unfolded thereby partially explaining the SEC results which suggested a far larger hydrodynamic radius than expected from molecular weight considerations. The fact that Tg-p43 was retained by filters with MWCO of 100 kDa and its susceptibility to rapid cross-linking as a dimeric species however also suggests that a tendency to oligomerise may be contributing to the unexpected solution behavior of Tg-p43.

Composition and location of the MARS complex

By demonstrating that a subset of aaRSs (MRS, QRS, ERS, and YRS) are binding partners of the Tg-p43 protein, our affinity purification experiments confirmed the predicted role of the protein in MARS complex formation and our immunofluorescence data confirmed in parallel that these components occur exclusively in the cytoplasm. Inspection of the sequences of these subunits shows that they possess large N-terminal extensions that are predicted to be partially disordered and in all cases, except for the YRS component, these regions are predicted to encode a GST-C terminal like domain (Figure 8). We believe that this group of five distinct proteins represent the stable cytoplasmic *Toxoplasma* MARS complex because immunoprecipitations targeting the MRS and YRS subunits gave identical results to the Tg-p43

PLOS ONE | www.plosone.org


Anti-HA or -myc antibody / Hoechst





Figure 4. Localization of the Tg-MARS complex. (A) Fluorescent, light, and overlay of the two channels of endogenously tagged subunits of Tg-MARS visualised by in situ immunofluorescence in intracellular parasites with anti-Myc or anti-HA (red) antibodies and Hoechst DNA-specific dye (blue). (B) Fluorescent, light, and overlay of two channels of the QRS subunit of Tg-MARS visualised by in situ immunofluorescence in intracellular parasites with an anti-rQRS (red) antibody and Hoechst DNA-specific dye (blue). Scale bar = 10 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0089487.g004

isolations (Figure 3). The presence of a single scaffold protein and the small number of enzymes in the Toxoplasma MARS complex, together with the fact that they are all class I aaRS enzymes [38], suggests further similarities with the yeast MARS complex wherein only ERS and MRS are present with Arc1p. In contrast, human and other metazoan complexes contain three scaffold proteins and comprise representative members of aaRSs from both classes. This, as far as we know, is also the first report of a YRS enzyme being found in a MARS complex.

One theory for the role of the MARS complex, put forward to explain the presence of ERS and not QRS in the yeast complex, is to recruit additional tRNA-binding domains to aaRSs that lack them [15]. The presence of MRS, which also contains a myftRNA binding domain, in the Toxoplasma MARS complex is therefore puzzling if this is also the driver for inclusion in the Toxoplasma complex. The choice of aaRSs and the exact function of the MARS complex in Toxoplasma therefore remains a mystery especially in light of our genetic analyses in both virulent (type I)

February 2014 | Volume 9 | Issue 2 | e89487

В



Figure 5. Dependence of MARS complex assembly on the scaffold protein Tg-p43. (A) Silver-stained PAGE gel of immunoprecipitations of HA-FLAG-tagged (HF) YRS and MRS subunits in Tg-p43 knockout strains. (B) Isolation of the MARS complex by immunoprecipitation of a C-terminal-truncated (Δ C) form of the Tg-p43 protein (a.a. 1–296). (C) Western blots of eluted fractions from SEC analyses of crude cell lysates of Tg-p43-containing and knock-out strains (all RH Δ ku80). Corresponding fractions (numbered above the first gel image) are vertically aligned and their solution molecular weights, as determined by calibration with high molecular weight standards, are also given. Molecular weight standards are shown for the anti-FLAG Western only as a reference for evaluation of the knock-out blot. doi:10.1371/journal.pone.0089487.g005

and non-virulent but cystogenic, (type II) *T. gondii* strains showing that Tg-p43 is not essential for viability or pathogenesis of the parasite. Together with what is known about the non-essential nature of AIMPs in yeast [12]] and humans [9], our results further suggest that the contribution of the MARS complex to post-transcriptional gene control must be subtle.

Assembly of the complex

Based on the similarity of the overall domain structures and the degree of homology between the Tg-p43 and the yeast Arc1p proteins it was assumed that assembly of the *Toxoplasma* complex would be driven by similar mechanisms. The associations between the yeast Arc1p protein and its ERS and MRS partners have been attributed to pairwise dimerizations occurring at distinct interfaces in the GST domain of the scaffold protein [21]. The presence of MRS, QRS, and ERS, all of which possess GST-like motifs, in the *Toxoplasma* complex was therefore not surprising but the inclusion of YRS was unexpected as its N-terminal extension is predicted to be highly disordered. Until more structural information is available for the N-terminal region of the *Toxoplasma* YRS protein, it remains to be seen in the GST motif is structurally conserved despite this apparent sequence divergence.



Figure 6. Compositional and size heterogeneity of MARS complex populations. Silver-stained PAGE gel of eluted fractions of immunoprecipitated MARS complexes separated by SEC. Each panel represents a separate SEC analysis of MARS complexes purified from strains harbouring C-terminal tags on different subunits of the complex: (A) Myc-FLAG-tagged Tg-p43 (mF = Myc-FLAG), (B) HA-FLAG-tagged Tg-p43 (mF = Myc-FLAG), (C) HA-FLAG-tagged methionyl-tRNA synthetase, and (D) HA-FLAG-tagged tyrosyl-tRNA synthetase. Corresponding fractions (numbered below each gel image, and calibrated by the elution peak of the FLAG peptide) are vertically aligned and their solution molecular weight standards, are given. Grey-levels of the images were adjusted to enhance the contrast but no bands were masked by this process. doi:10.1371/journal.pone.0089487.g006

We were able to reveal a direct association of MRS and YRS with the Tg-p43 and we subsequently showed that only the Nterminal region of this scaffold protein, harbouring the GST-motif, was necessary for the association. Although it was not possible to demonstrate direct interactions for the QRS and ERS proteins, because modifications to these genes compromised the viability of the parasite, we did show that the presence of QRS in the highmolecular weight fraction depended on Tg-p43. We cannot however exclude the possibility that QRS is recruited to the MARS complex through an interaction with ERS. Dissecting the interactions of these essential proteins will require biophysical characterisation of pairwise interactions in native MARS complex subassemblies or recombinant proteins.

Heterogeneity in MARS composition and sizes

The results of our SEC studies showed that the *Toxoplasma* MARS complex exhibited various degrees of size and composi-

PLOS ONE | www.plosone.org

February 2014 | Volume 9 | Issue 2 | e89487



Figure 7. Appearance of the MARS complex as revealed by electron microscopy. (A) Electron micrograph of negatively-stained YRS-HA-FLAG MARS complexes. The scale bar represents 50 nm. (B) Subset of representative propeller views (18/137) of negatively-stained immunoprecipitated YRS-HA-FLAG MARS complexes windowed from images such as shown in (A). (C) Left – Rotational average of all views (1030 particle including the 137 propeller views) following pre-centring. Right – Corresponding radial profile from which the central core (120 Å) and peripheral domain's (240 Å) maximum average diameters can be determined. (D) An average image of aligned representative particles (137 propeller views from B) based on the entire image is shown on the

left. On the right, three different class averages (homogenous subclasses) generated by re-aligning only the central regions of the 137 views on the left are presented. (E) Reference-free class averages (homogenous sub-classes) derived from classification of all windowed particles (1030 in total) not just the propeller views shown in (B). The last image is the rotational average of all particles that went into classification.

doi:10.1371/journal.pone.0089487.g007

tional heterogeneity depending on which subunit was the target for affinity purification. Both the Tg-p43-Myc-FLAG and MRS-HA-FLAG preparations displayed the broadest distribution of molecular weight species, between 0.3 and 1 MDa, which also differed significantly in the relative abundance of their component subunits. By contrast, preparations from YRS-HA-FLAG and ΔC-terminal-Tg-p43-HA-FLAG strains were highly enriched in the high molecular weight fractions leading us to believe this 1MDa species corresponds to the intact Toxoplasma MARS complex. Even if the fact that both YRS and MRS are expected to be dimeric [19,39] is considered along with the possibility that Tg-p43 could be oligomeric, the 1 MDa size estimate is far larger than expected. Such considerations predict a minimum molecular weight of 591 KDa for a complex composed of two copies of Tgp43, MRS, and YRS, and a single copy of ERS and QRS. In any regard, if this species represents the fully-assembled complex, then the lower molecular weight distributions and the differing levels of heterogeneity must be interpreted as resulting from differences in the affinity of the subunits for the labile complex. The exclusive



Figure 8. Disorder potential and domain structures of *Toxoplasma* MARS complex subunit proteins. Genesilico MetaDisorder2 disorder predictions [28] for each peptide are displayed below domain arrangement schematics derived from NCBI conserved domain searches [24]. Values above 0.5 are predicted to be disordered (coloured red) and values below 0.5 correspond to folded domains (coloured green). The number of residues in each protein is given after each schematic. doi:10.1371/journal.pone.0089487.g008

PLOS ONE | www.plosone.org

February 2014 | Volume 9 | Issue 2 | e89487

presence of YRS and it relatively low abundance in the high molecular weight complex could therefore be understood to reflect its weak association with Tg-p43. Such affinity/stability considerations make absolute size estimations of the various sub-complexes difficult and this is especially true considering that the sequences of the component subunits are predicted to contain some degree of disorder which can be expected to manifest as more extended and flexible domain organisations.

Ultrastructure of the MARS complex

Together with the results of our EM analyses which identified both compositional and structural heterogeneity, these hydrodynamic results suggest that previous concerns about MARS complex stability and sensitivity to preparation conditions [40] are justified in this instance too. By targeting the YRS subunit for affinity purification of Toxoplasma MARS complexes however we were able to overcome these issues thereby allowing us to directly visualize these structures in the microscope. Although it was possible to recognize consistent features in a fraction of the particles, the most telling result was in fact the absence of a large distinct consensus particle view, as expected for a 1 MDa globular assembly. Instead, image analysis revealed a "propeller-like" structure wherein a central ring-like core, exhibiting clear subdomains, is surrounded by highly flexibly and spatially separated substructures. Not only does the extended arrangement of these subunits explain some of the heterogeneity exhibited by the MARS complex as arising from their intrinsic flexibility but it also argues in favour of a smaller absolute molecular weight estimate for the complex which we believe exhibits a larger than expected hydrodynamic radius due to the intrinsic disorder present in the component subunits. Such behaviour has now been conclusively proven for the human MARS complex and is thought to be necessary for allowing access of bulky tRNA substrates to the active sites of independent component enzymes [41]. This flexibility has important implications for future structural studies which we believe will need to focus on the central core of the Toxoplasma MARS complex in order to provide a detailed understanding molecular interactions underpinning the assembly of this complex in both apicomplexa and higher eukaryotes.

Supporting Information

Figure S1 Generation and confirmation of p43KO in RH Δ Ku80 and Pru Δ Ku80 strains. (A) Schematic of the Tg-

References

- Ibba M, Soll D (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. Annu Rev Biochem 69: 617– 650. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.617.
- Szymański M, Deniziak M, Barciszewski J (2000) The new aspects of aminoacyltRNA synthetases. Acta Biochim Pol 47: 821–834.
- Hausmann CD, Ibba M (2008) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. FEMS Microbiol Rev 32: 705–721. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00119.x.
- Guo M, Schimmel P, Yang X-L (2010) Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions. FEBS Lett 584: 434–442. doi:10.1016/j.febslet.2009.11.064.
- Lee SW, Cho BH, Park SG, Kim S (2004) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. J Cell Sci 117: 3725–3734. doi:10.1242/ jcs.01342.
- Park SG, Choi E-C, Kim S (2010) Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins (AIMPs): a triad for cellular homeostasis. IUBMB Life 62: 296–302. doi:10.1002/iub.324.
- Ivakhno SS, Kornelyuk AI (2004) Cytokine-like activities of some aminoacyltRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis. Exp Oncol 26: 250–255.
- Wolfe CL, Warrington JA, Treadwell L, Norcum MT (2005) A threedimensional working model of the multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases based on electron microscopic placements of tRNA and proteins. J Biol Chem 280: 38870–38878. doi:10.1074/jbc.M502759200.

p43 locus (not drawn to scale). Double homologous recombination between the knockout construct and genomic DNA replaces p43with the muted *DHFR* gene, which was used for positive selection. Primers used to confirm a knockout are shown (F1, OL1F, OL1R, R1, F9, R9). (B) After transfection of *T. gondii* in RH Δ Ku80 or Pru Δ Ku80 strains with the p43KO fragment, parasites were cloned by limiting dilution, and genomic DNA was isolated. This genomic DNA was then used as template in a PCR reaction to amplify the p43 locus (F1 and R1 amplify a 6.9 kb fragment in knockout strains and a 9.3 kb fragment in non-mutant strains; F9 and R9 amplify a 1.1 kb fragment only in non-mutant strains). Two bands that are only present in a successful knockout were also amplified (F1 and OL1R amplifies a 2.1 kb fragment; OL1F and R1 amplifies a 2.0 kb fragment).

(TIF)

Figure S2 Deletion of Tgp43 does not alter the lethality of type I or II strains in mice. Virulence of type I RH Δ ku80 Δ p43 (A) and type II Pru Δ ku80 Δ p43 (B) strains were compared to the parental strains RH Δ ku80 and Pru Δ ku80, respectively, in Swiss mice. Mice were inoculated with 10² or 10⁶ (lethal inoculum) tachyzoites of type I and type II strains, respectively, by intraperitoneal injection, and survival was monitored. The number of infected animals is indicated in the legend.

(TIF)

Table S1 Primers and vectors used for genetic manipulation of T. *gondii* and for heterologous recombinant expression of T. *gondii* proteins. (PDF)

Acknowledgments

We thank the Partnership for Structural Biology for access to the electron microscope facilities and biophysical instruments, and Julien Perard for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAH HB JMvR JBM AS HP. Performed the experiments: JMvR JBM SKJ YC PMH. Analyzed the data: MAH HB JMvR JBM SKJ YC. Contributed reagents/materials/analysis tools: MAH HB JMvR JBM AS. Wrote the paper: MAH HB JMvR JBM.

- Kaminska M, Havrylenko S, Decottignies P, Gillet S, Le Maréchal P, et al. (2009) Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. J Biol Chem 284: 6053–6060. doi:10.1074/ jbc.M809636200.
- Rho SB, Kim MJ, Lee JS, Seol W, Motegi H, et al. (1999) Genetic dissection of protein-protein interactions in multi-tRNA synthetase complex. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 4488–4493.
- Havrylenko S, Legouis R, Negrutskii B, Mirande M (2011) Caenorhabditis elegans evolves a new architecture for the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. J Biol Chem 286: 28476–28487. doi:10.1074/jbc.M111.254037.
- Simos G, Segref A, Fasiolo F, Hellmuth K, Shevchenko A, et al. (1996) The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyland glutamyl-tRNA synthetases. EMBO J 15: 5437–5448.
- Grosshans H, Simos G, Hurt E (2000) Review: transport of tRNA out of the nucleus-direct channeling to the ribosome? J Struct Biol 129: 288–294. doi:10.1006/jsbi.2000.4226.
- Galani K, Hurt E, Simos G (2005) The tRNA aminoacylation co-factor Arc1p is excluded from the nucleus by an Xpo1p-dependent mechanism. FEBS Lett 579: 969–975. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.112.
- Karanasios E, Boleti H, Simos G (2008) Incorporation of the Arc1p tRNAbinding domain to the catalytic core of MetRS can functionally replace the yeast Arc1p-MetRS complex. J Mol Biol 381: 763–771. doi:10.1016/ j.jmb.2008.06.044.

PLOS ONE | www.plosone.org

February 2014 | Volume 9 | Issue 2 | e89487

- 16. Simader H, Hothorn M, Suck D (2006) Structures of the interacting domains from yeast glutamyl-tRNA synthetase and tRNA-aminoacylation and nuclearexport cofactor Arc1p reveal a novel function for an old fold. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 62: 1510-1519. doi:10.1107/ S0907444906039850.
- Golinelli-Cohen M-P, Zakrzewska A, Mirande M (2004) Complementation of yeast Arc1p by the p43 component of the human multisynthetase complex does not require its association with yeast MetRS and GluRS. J Mol Biol 340: 15–27. doi:10.1016/j.jmb.2004.04.040.
- Gorio, 1010 (1997) Juno. 2007.07.070.
 Karanasios E, Simos G (2010) Building arks for tRNA: structure and function of the Arc1p family of non-catalytic tRNA-binding proteins. FEBS Lett 584: 3842– 18 3849. doi:10.1016/j.febslet.2010.08.023.
- Crepin T, Schmitt E, Blanquet S, Mechulam Y (2002) Structure and function of 19. the C-terminal domain of methionyl-tRNA synthetase. Biochemistry (Mosc) 41: 13003-13011.
- Karanasios E, Simader H, Panayotou G, Suck D, Simos G (2007) Molecular 20 determinants of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly. J Mol Biol 374: 1077–1090. doi:10.1016/j.jmb.2007.10.010.
- Simader H, Hothorn M, Köhler C, Basquin J, Simos G, et al. (2006) Structural 21.basis of yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex formation revealed by crystal structures of two binary sub-complexes. Nucleic Acids Res 34: 3968-3979. doi:10.1093/nar/gkl560.
- Cornelissen AW, Overdulve JP, Hoenderboom JM (1981) Separation of Isospora 22.(Toxoplasma) gondii cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. Parasitology 83: 103-108.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinforma Oxf Engl 16: 404–405.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004) CD-Search: protein domain annotations 24.
- on the fly. Nucleic Acids Res 32: W327–331. doi:10.1093/nar/gkh454. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. (2004) UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and 25.
- analysis. J Comput Chem 25: 1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084. Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Huang CC, Ferrin TE (2006) Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. BMC Bioinfor-26. matics 7: 339. doi:10.1186/1471-2105-7-339.
- Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DW (1997) GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. EMBNEWNEWS 4: 14. Kozlowski LP, Bujnicki JM (2012) MetaDisorder: a meta-server for the 97
- prediction of intrinsic disorder in proteins. BMC Bioinformatics 13: 111. doi:10.1186/1471-2105-13-111.
- Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart M-P, Ortet P, Barakat M, et al. 29. (2013) Host cell subversion by Toxoplasma GRA16, an exported dense granule

protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. Cell Host Microbe 13: 489–500. doi:10.1016/j.chom.2013.03.002.

- Braun L, Cannella D, Pinheiro AM, Kieffer S, Belrhali H, et al. (2009) The small 30. ubiquitin-like modifier (SUMO)-conjugating system of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 39: 81–90. doi:10.1016/j.ijpara.2008.07.009.
- Braun L, Cannella D, Ortet P, Barakat M, Sautel CF, et al. (2010) A complex 31. small RNA repertoire is generated by a plant/fungal-like machinery and effected by a metazoan-like Argonaute in the single-cell human parasite Toxoplasma gondii. PLoS Pathog 6: e1000920. doi:10.1371/journal.ppat.1000920.
- Chen JZ, Grigorieff N (2007) SIGNATURE: a single-particle selection system 32.for molecular electron microscopy. J Struct Biol 157: 168-173. doi:10.1016/ j.jsb.2006.06.001.
- 33. Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. J Struct Biol 128: 82–97. doi:10.1006/jsbi.1999.4174.
- Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. Biophotonics Int 11: 36-42.
- Gajria B, Bahl A, Brestelli J, Dommer J, Fischer S, et al. (2008) ToxoDB: an integrated Toxoplasma gondii database resource. Nucleic Acids Res 36: D553-556. doi:10.1093/nar/gkm981.
- Quevillon S, Agou F, Robinson JC, Mirande M (1997) The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. J Biol Chem 272: 32573-32579.
- 37. Park SG, Jung KH, Lee JS, Jo YJ, Motegi H, et al. (1999) Precursor of proapoptotic cytokine modulates aminoacylation activity of tRNA synthetase. J Biol Chem 274: 16673-16676.
- Cusack S (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases. Curr Opin Struct Biol 7: 881-38. 889. doi:10.1016/S0959-440X(97)80161-3.
- Bhatt TK, Khan S, Dwivedi VP, Banday MM, Sharma A, et al. (2011) Malaria parasite tyrosyl-tRNA synthetase secretion triggers pro-inflammatory responses. Nat Commun 2: 530. doi:10.1038/ncomms1522.
- Kellermann O, Tonetti H, Brevet A, Mirande M, Pailliez JP, et al. (1982) 40. Macromolecular complexes from sheep and rabbit containing seven aminoacyltRNA synthetases. I. Species specificity of the polypeptide composition. J Biol Chem 257: 11041–11048.
- 41. Dias J, Renault L, Pérez J, Mirande M (2013) Small-angle X-ray solution scattering study of the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals an elongated and multi-armed particle. J Biol Chem 288: 23979-23989. doi:10.1074/jbc.M113.489922.



Figure S1. Generation and confirmation of p43KO in RH\DeltaKu80 and Pru\DeltaKu80 strains. (A) Schematic of the Tg-p43 locus (not drawn to scale). Double homologous recombination between the knockout construct and genomic DNA replaces *p43* **with the muted** *DHFR* **gene, which was used for positive selection. Primers used to confirm a knockout are shown (F1, OL1F, OL1R, R1, F9, R9). (B) After transfection of** *T. gondii* **in RH\DeltaKu80 or Pru\DeltaKu80 strains with the p43KO fragment, parasites were cloned by limiting dilution, and genomic DNA was isolated. This genomic DNA was then used as template in a PCR reaction to amplify the** *p43* **locus (F1 and R1 amplify a 6.9 kb fragment in knockout strains and a 9.3 kb fragment in non-mutant strains; F9 and R9 amplify a 1.1 kb fragment only in non-mutant strains). Two bands that are only present in a successful knockout were also amplified (F1 and OL1R amplifies a 2.1 kb fragment; OL1F and R1 amplifies a 2.0 kb**

Supporting Table 1: Primers and vectors used for genetic manipulation of *T. gondii* and for heterologous recombinant expression of *T. gondii* proteins.

Vector	Amplified region	Primer name	Primer name Primer sequence	
pLIC vectors - expressed in <i>T. gondii</i>	Tgp43	LIC066670-F	tacttccaatccaatttagcccgac gattcgcgccaggacaccctgtg	2299 bp
		LIC066670-R tcctccacttccaatttagcagag		
		LICp43delta-F	tacttccaatccaatttagctccttttt	1687 bp
		LICp43delta-R	tcctccacttccaattttagctccacc	
	TgYRS	LIC103260-F	tacttccaatccaatttagccgcag	2121 bp
		LIC103260-R	tcctccacttccaatttagcttcgtc	
	TgMRS	LIC289300-F	tacttccaatccaatttagcgacttg	1157 bp
		LIC289300-R	tcctccacttccaatttagcaagcg	
	Upstream flanking region of <i>Tqp43</i>	attB1-066670	ggggacaagttgtacaaaaaag caggctctgaagcagctcagccg cagggttgcac	1609 bp
		attB4-066670	ggggacaactttgtatagaaaagtt gggtggcgcaagacaaagatgc atgcttgcg	
	Downstream flanking region of <i>Tqp43</i>	attB2-066670	ggggaccactttgtacaagaaag ctgggtacctcgatgttcacaatgat aatgtgg	1719 bp
		attB3-066670	ggggacaactttgtataataaagtt gcaatggactaacgtgttgcttcca gc	
pETDuet-1 - expressed in <i>E.coli</i>	Tgp43 (TgVEG_053 640 residues 208-679)	TgP43-Fwd-Ncol	catgccatggaactgatttatgatag cacaccgg	n/a
		TgP43-Rev- His-BamHI	cgcggatccttaatgatgatgatgat gatgagcaccagcaccgctgatg gtgccaccaacaatgctatcgcaa aaaac	n/a
pcDNA4 - expressed in HEK293	Tgp43 (TgVEG_053 640 residues 208-679)	p43-pcDNA4-Cter-Fwd	tggctggtgctggtgcccatgaact gatttatgatagcacaccggcagc	n/a
		p43-pcDNA4-Cter-Rev	gctccggctcctgccccagcgctg atggtgccaccaacaatgctatcgc	n/a
		p43-pcDNA4-Rev	gctccggctcctgccccagcttagc tgatggtgccaccaacaatgctatc gc	n/a

III. Résultats additionnels

Les tests de comparaison de moyennes et de comparaison des courbes de survie (test de Mantel-Cox) et les graphiques correspondants ont été réalisés à l'aide de GraphPad Prism version 6.00 pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, <u>www.graphpad.com</u>.

1. Caractérisation des souches présentant une délétion de Tg-p43



a) Expérimentations in vitro

Figure additionnelle 1. Effets du maintien en conditions extracellulaires sur le nombre de parasites viables et fonctionnels

Comparaison des souches Δ Tg-p43 issue de la première transfection (A) et de la deuxième transfection (B) avec leurs souches parentales respectives RH Δ Ku80 et RH Δ Ku80-YRS-HA-FLAG. Après pré-traitement, de l'ordre de 100 parasites ont été inoculés dans chaque boîte. Une plage de lyse observée après 8 à 10 jours est réputée découler du développement d'un unique parasite initial. Le nombre de plages de lyses traduit donc le nombre de parasites capables de mener à terme un cycle complet d'invasion, croissance et lyse cellulaire. Les valeurs sont ramenées à 100 plages de lyses obtenues sans prétraitement.



Figure additionnelle 2. Evaluation *in vivo* de la virulence des souches ∆Tg-p43

La virulence des souches de type I RH Δ Ku 80Δ p43 (A) et type II Pru Δ Ku 80Δ p43 (B) ont été comparées aux souches parentales RH Δ Ku80 et Pru Δ Ku80, respectivement, chez la souris Swiss. Les courbes de survie ont été tracées après inoculations intrapéritonéales de 10^2 ou 10^6 tachyzoïtes de type I et de type II (doses létales), respectivement. Effectifs de souris : 3 pour Pru Δ Ku 80Δ Tg-p43. 2 pour les autres conditions.

Souche	Pru∆Ku80			Pru∆Ku80∆p43		
Souris	1	2	3	4	5	6
Nombre de kystes par cerveau	Infection aiguë mortelle	20 kystes	0 kyste	20 kystes	75 kystes	20 kystes
Sérologie	n/a	Positive 1/4000	Positive 1/4000	Positive 1/4000	Positive 1/4000	Positive 1/4000



Figure additionnelle 3. Evaluation *in vivo* de la kystogénèse de la souche Pru∆Ku80∆Tgp43

A : Les kystes contenus dans les cerveaux ont été comptés au microscope 9 semaines après inoculation intrapéritonéale de 10⁵ parasites. Une souris est morte de l'infection aiguë. Une sérologie a été réalisée chez toutes les souris vivantes afin de vérifier qu'elles avaient bien développé une infection. B : Aucune différence significative du nombre de kystes par cerveau n'a été mise en évidence entre les deux souches.

А

2. Immunomarquage de rQRS



Figure additionnelle 4. Vérification de la spécificité de l'antisérum dirigé contre rQRS

Un lysat de parasite RH∆Ku80 et un éluat d'immunopurification contenant le complexe TgMARS ont été soumis à SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de fluorure de polyvinylidène (Immobilon-P; Millipore). Une dilution 1/4000 de l'antisérum a été appliquée sur la membrane avant marquage secondaire par un anticorps anti-souris conjugué à une phosphatase (Promega). Le signal a été révélé à l'aide du réactif NBT-BCIP (Amresco).



3. Complexe en souche de type II

Figure additionnelle 5. Immunopurification du complexe via Tg-p43-HA-FLAG en souche de type II Pru Δ Ku80

A : Composition du complexe après purification d'affinité anti-FLAG. B : Distribution des espèces immunopurifiées selon leur poids moléculaire globulaire, après séparation par chromatographie d'exclusion-diffusion.

IV. Discussion

1. Tg-p43 : une protéine d'architecture, mais pas une cytokine

Les premiers résultats obtenus par immunofluorescence nous ont montré que le domaine EMAP II-*like* de Tg-p43 n'était pas clivé, et que cette protéine ne pouvait pas jouer un rôle de cytokine sécrétée, différant en cela de son homologue chez les Eucaryotes supérieurs. Par ailleurs, l'immunopurification de Tg-p43-HA-FLAG n'a jamais permis de copurifier la protéine TgAGO, ce qui est un argument à l'encontre des hypothèses initialement formulées autour d'une possible contribution de Tg-p43 aux mécanismes d'ARN interférence du parasite.

Par contre, le rôle de Tg-p43 dans la formation du complexe TgMARS est confirmé dans différentes souches de parasites, avec une interaction directe démontrée avec plusieurs aaRS. Sur le plan structural, Tg-p43 se distingue par son organisation hybride (fusion des équivalents p18 et p43 humains) avec un domaine GST situé en région N-terminale de la protéine. En cela, Tg-p43 est structurellement très proche de la protéine de levure Arc1p.

2. Composition chez *T. gondii* : une nouvelle pierre à l'édifice de la connaissance du complexe MARS

Ce travail fournit pour la première fois la preuve de l'existence et la composition du complexe MARS d'un parasite du phylum Apicomplexe. Les expériences de biochimie conventionnelle et d'affinité nous permettent d'affirmer avec un bon niveau de certitude que le TgMARS se compose de Tg-p43, MRS, QRS, ERS et YRS. Mais afin de déterminer les implications de ces données, il est nécessaire de résumer les connaissances actuelles concernant les différents complexes MARS à ce jour caractérisés.

a) Quelques complexes équivalents chez les Procaryotes

Chez les Procaryotes, les complexes MARS sont habituellement considérés comme inexistants, notamment en raison de l'absence d'extensions typiques des aaRS eucaryotes, impliquées dans les interactions protéines-protéines. Chez les bactéries sont uniquement retrouvées des associations binaires entre une aaRS et un partenaire non aaRS (211). Chez les Archées, certaines associations semblent cependant préfigurer l'évolution vers le complexe MARS de type eucaryote. Ainsi, l'interactome de la protéine Mj1338 de *Methanocaldococcus jannaschii*, une protéine supposément impliquée dans le métabolisme

monocarboné et qui possède une affinité pour l'ARNt, comprend la Prolyl-, la Lysyl- et l'Aspartyl-RS, mais chacune de ces interactions a été démontrée indépendamment, si bien que l'existence du complexe reste encore hypothétique. Au contraire, chez *Methanothermobacter thermautotrophicus*, un complexe pouvant être considéré comme un MARS a été identifié par criblage en double hybride d'une bibliothèque d'ADNc. Les aaRS associées sont la Prolyl-RS, la Lysyl-RS, et la Leucyl-RS (212). En l'absence d'homologue des protéines d'architecture, il semble que la Leucyl-RS joue le rôle d'élément central permettant l'assemblage, avec des interactions localisées à ses deux extrémités (213). Enfin, un autre complexe associant l'Arginyl-RS au type méthanogène (une version spécifique de quelques espèces d'Archées) de la Séryl-RS a été plus récemment révélé (214).

b) Quelles aaRS dans les complexes MARS des Eucaryotes ?

Chez les Eucaryotes, deux assemblages supramoléculaires stables impliquant des aaRS ont été décrits : le complexe VEGA (*Valyl-RS* / *Elongation factor* 1 α / *Guanine exchange factors Assembly*) et le complexe MARS. Le premier associe une seule aaRS, la Valyl-RS, aux quatre sous-unités du facteur d'élongation de la traduction EF1. Sa fonction supposée serait une coordination entre la fonction d'aminoacylation et l'assemblage du complexe EF1 α •GTP•Val-ARNt^{Val} nécessaire à la translocation de l'acide aminé chargé de l'aaRS vers le ribosome (215).

Le complexe MARS regroupe quant à lui plusieurs aaRS, associées à une ou plusieurs protéines non enzymatiques. Celui qui comporte le plus de sous-unités est retrouvé chez les Eucaryotes supérieurs. Isolé pour la première fois en 1971 à partir d'hépatocytes de rat, sa composition fut progressivement élucidée chez différents mammifères (lapin, mouton, hamster) par la combinaison de méthodes chromatographiques (permettant l'isolement du complexe) et enzymatiques (permettant de déterminer les spécificités d'aminoacylation exercées par chaque composant ou sous-ensemble) (216,217). Depuis les années 1980, on sait que, des Arthropodes aux Vertébrés, le MARS associe neuf activités d'aminoacylation portées par des aaRS de classes I (Lysyl-, Méthionyl-, Arginyl-, Leucyl-, Glutamyl-, Isoleucyl-RS) et II (Aspartyl-, Glutaminyl-, Prolyl-RS). Initialement identifiée chez la Drosophile, une même protéine bimodale associe les activités Glutamyl-RS et Prolyl-RS, ramenant le nombre de composants enzymatiques à huit (218), en plus des trois AIMP (186). L'universalité de cette composition, des arthropodes aux mammifères et potentiellement à l'ensemble des

métazoaires (219) a été remise en cause en 2011 par la caractérisation du complexe de *Caenorhabditis elegans*. L'immunoprécipitation de la Méthionyl-RS chez ce nématode fournit en effet une composition sensiblement différente de celle qui semblait faire consensus jusqu'alors chez les Eucaryotes dits supérieurs : p18 et p43 sont absentes, p38 est associée à seulement huit des neuf aaRS décrites chez l'homme (220). La Prolyl-RS est absente – et par conséquent, Prolyl-RS et Glutamyl-RS ne sont pas fusionnées – et l'Asparaginyl-RS est remplacée par la Valyl-RS (qui chez l'homme est retrouvée dans le complexe VEGA). Parallèlement aux assemblages découverts chez les organismes pluricellulaires, le complexe

MARS de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (ScMARS) a été intensément étudié. Il s'organise autour d'une protéine non catalytique Arc1p (<u>a</u>minoacyl-t<u>R</u>NA synthetase <u>co</u>factor <u>1</u> <u>p</u>rotein) associée à deux aaRS de classe I, la Méthionyl- et la Glutamyl-RS (221). En raison de fortes homologies dans leurs parties C-terminales contenant un domaine EMAP IIlike, Arc1p est considérée comme l'analogue chez cette levure de la protéine p43 des Eucaryotes supérieurs (191).

c) Positionnement évolutif du complexe MARS de T. gondii

Le complexe MARS que nous avons identifié chez *T. gondii* présente une composition singulière. D'une part, TgMARS apparaît plus évolué que chez les Procaryotes et chez les Eucaryotes unicellulaires comme *S. cerevisiae*. Il possède en effet deux fois plus d'aaRS que le ScMARS, ainsi qu'une véritable protéine d'architecture dédiée, alors que chez *M. thermautotrophicus* le rôle d'élément central permettant l'assemblage est joué par la Leucyl-RS (203). D'autre part, le nombre restreint d'aaRS et d'AIMP tranche avec celui retrouvé chez les Eucaryotes supérieurs. Le nombre restreint d'AIMP est compensé par la fusion au sein de Tg-p43 des équivalents de la p43 et de la p18 humaines. Il faut cependant noter l'absence d'un homologue de p38 chez *T. gondii*, alors que cette AIMP est essentielle chez les Métazoaires pour l'assemblage du complexe. L'immuno-purification de versions tronquées de p38 a en effet montré que sa partie N-terminale véhicule l'attachement de la Glutamyl-RS, l'Arginyl-RS et p43. De la même manière, la partie C-terminale de p38 se lie aux autres aaRS, directement ou indirectement (y compris à p38 elle-même pour s'homo-dimériser), tandis que la Lysyl-RS semble interagir avec les deux domaines (222).

L'absence de l'aaRS fusionnée EPRS et le nombre restreint d'AIMP pourraient sembler rapprocher le complexe TgMARS de celui de *C. elegans* (CeMARS). Cependant, selon

l'hypothèse d'Havrylenko *et al.*, la fusion des gènes de ces deux aaRS aurait eu lieu avant la diversification des Bilatériens, et certaines évolutions, notamment la fission d'EPRS, seraient postérieures à la différenciation radiale des Bilatériens en Protostomes (parmi lesquels sont classés les Nématodes et les Arthropodes) et Deutérostomes (Figure 11) (220). De plus, la présence dans l'enzyme MRS d'un domaine C-terminal homologue au domaine EMAP II est interprétée comme une fusion entre p43 et MRS. Le complexe du nématode, avec ses huit aaRS et l'équivalent de deux AIMP, apparaît par conséquent et logiquement plus proche de celui des autres Bilatériens. Quant au TgMARS, ses caractéristiques (nombre restreint de sous-unités, AIMP unique associant domaine GST et EMAP II) le rapprochent plutôt du complexe fongique.

De manière frappante, MRS et ERS sont retrouvées dans tous les complexes MARS ; le ScMARS semble ainsi constituer le noyau minimum autour duquel ont pu évoluer les complexes dans d'autres branches des Eucaryotes (Figure 11). Le fait que les aaRS assemblées chez *S. cerevisiae et T. gondii* appartiennent toutes à la classe 1 suggère que les caractéristiques inhérentes à cette classe ont pu induire la nécessité de l'assemblage. On constate d'ailleurs que, dans les complexes plus élaborés, une majorité des sous-unités enzymatiques sont des aaRS de classe I.

TgMARS pourrait ainsi être considéré comme une évolution intermédiaire du complexe, entre la version fongique minimaliste et les complexes des métazoaires. Cependant, *T. gondii* affiche une grande « innovation » sur le plan qualitatif : l'association, constatée pour la première fois, de la Tyrosyl-RS à un complexe MARS. Il semble donc que le complexe MARS ait évolué de manière autonome au sein des Alvéolés, et potentiellement de manière spécifique à *T. gondii*. Très récemment, une approche par ARN interférence systématique des aaRS cytosoliques et mitochondriales de *Trypanosoma brucei* a permis de dessiner les contours du complexe MARS chez ce protozoaire. Détecté dans les deux stades (procyclique et sanguin), il associe au moins six aaRS (Méthionyl-, Prolyl-, Glutaminyl-, Alanyl-, Tryptophanyl- et Aspartyl-RS) et trois protéines accessoires (nommées <u>MARS complexassociated protein</u> (MCP) 1, 2 et 3). D'autres aaRS étaient retrouvées associées (Cystéinyl-, Glutamyl-, Isoleucyl- et Glycyl-RS), mais avec un degré de certitude moindre (223). Ces récentes données semblent confirmer une faible conservation du complexe MARS à travers l'évolution. Les divergences évolutives pourraient même être importantes au sein même du phylum *Apicomplexa*. L'étude bio-informatique menée par Bhatt *et al.* en 2009



Figure 11. Composition des complexe MARS connus chez les Eucaryotes Protéines d'architecture figurées en vert ; aaRS de classe I en bleu ; aaRS de classe II en rouge. Éléments entre parenthèses : association possible mais non prouvée. Inspiré de (220). This research was originally published in The Journal of biological chemistry. Havrylenko S, Legouis R, Negrutskii B, Mirande M. *Caenorhabditis elegans* evolves a new architecture for the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 28476–28487. © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

retrouve une protéine homologue de p43 présentant 24 % d'identité de séquence avec la version humaine (203), mais l'existence d'un MARS plasmodial n'est pas prouvée à l'heure

actuelle, et l'étude comparative des Tyrosyl-RS des deux parasites montre qu'ils peuvent présenter des différences radicales en termes de structure et de mobilisation subcellulaire.

d) Combien de sous-unités ?

Chez les Eucaryotes supérieurs, la détermination des rapports stœchiométriques du complexe a été évaluée à plusieurs reprises, par densitométrie des bandes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) après dissociation du complexe préalablement purifié, ou par titrage des activités enzymatiques associées au MARS (224). Si l'on considère aujourd'hui que les composants du MARS se trouvent à l'état soit de monomères, soit de dimères, la stœchiométrie et le nombre total de composants reste imprécis, notamment en raison d'une forte sensibilité à la protéolyse. Une image claire de la topographie interne du complexe MARS n'est donc toujours pas atteinte et attend de nouvelles études fonctionnelles et structurales (225). Chez T. gondii, la composition quantitative du complexe reste à préciser, car nous nous heurtons à une nette variabilité de composition et d'abondances relatives selon la sous-unité utilisée comme appât pour la purification. Si l'on se réfère au comportement « classique » des aaRS chez d'autres organismes, MRS et YRS pourraient être présentes dans le complexe sous forme dimérique. D'après nos résultats, Tg-p43 présente une tendance à l'oligomérisation en solution, et possiblement au sein du complexe, ce qui pourrait favoriser l'arrimage de ses quatre partenaires. On peut dès lors évoquer une composition théorique basée sur ces trois protéines sous forme dimérique, associées à ERS et QRS monomériques. La forte hétérogénéité de composition et de structure, observée par méthodes hydrodynamiques et par microscopie électronique (ME), semble confirmer les problèmes de stabilité historiquement décrits dans d'autre complexes MARS (216). L'immunoprécipitation du complexe après renforcement des liaisons inter-protéiques (crosslinking) par des agents de réticulation (crosslinking agents) (226) avait alors permis de contourner cet écueil, et cette stratégie pourrait également être appliquée à TgMARS, car nous ne pouvons pas complètement exclure que le complexe que nous avons isolé puisse être incomplet.

90

3. Organisation du complexe

a) Organisation tridimensionnelle et sous-complexes

De manière similaire à ce qui a permis de préciser progressivement l'organisation tridimensionnelle du complexe MARS chez les Eucaryotes supérieurs, nous avons tenté de préciser l'organisation du complexe TgMARS en utilisant la ME à transmission. Nos travaux ont dans un premier temps été contrariés par l'hétérogénéité intrinsèque du complexe lorsqu'il était purifié via Tg-p43 ou MRS. Finalement, une plus grande homogénéité obtenue par l'immunopurification d'YRS a permis d'observer un TgMARS suffisamment stable.

Chez les Mammifères, après quelques tentatives ramenant des images contradictoires en formes d'haltères ou au contraire de particules amorphes, Norcum avait publié en 1989 les images d'un assemblage reproduit dans diverses conditions en forme de U, de Y ou de coupe, parfois disposé en anneau (227). Sa dissociation à l'aide de détergents chaotropiques (228), puis l'utilisation d'agents de réticulation réversibles combinés à une méthode d'électrophorèse bidimensionnelle (229), avaient conduit à la description de modèles à deux puis trois sous-complexes, compatibles avec la structure en U. Le traitement informatique des images de microscopie électronique confirma ensuite le modèle en U et à trois domaines (230), puis révéla une structure triangulaire asymétrique positionnée autour d'un sillon central profond (231), de multiples « fenêtres » et une p43 en position centrale (232) (Figure 12, A et B). Nos observations montrent un TgMARS fondamentalement éloigné de ces descriptions, en raison de sa relative simplicité et de l'absence de sous-domaines clairement objectivables. L'analyse informatique d'une sous-fraction des images suggère une disposition selon une structure centrale annulaire entourée de domaines flexibles, mais ces observations n'ont pas permis de définir une structure tridimensionnelle aussi précisément que pour les MARS des Eucaryotes supérieurs. Cependant, la ME ne semble pas être une méthode absolue de détermination de l'organisation du complexe, puisque de récentes études par l'ARN interférence des AIMP combinée à des purifications d'affinité en tandem des assemblages obtenus in cellulo, ont montré de manière robuste une organisation du MARS en deux sous-complexes portés par des dimères de p18 et p43, reliés par interaction avec un dimère de p38 (233) (Figure 12 C et D).

Il ressort au minimum des données obtenues par notre travail (faible nombre de sous-unités, présence d'une seule AIMP, interactions directes prouvées entre Tg-p43 et trois de ses

91

partenaires) que le complexe de *T. gondii* n'est pas organisé en sous-domaines mais autour de Tg-p43 qui joue un rôle d'ancrage. Ces données sont également trop limitées pour tenter de faire coïncider une hypothétique stœchiométrie avec le modèle fourni par le traitement des images de ME. Le positionnement interne de certains composants pourrait être précisé par immunomicroscopie électronique, cette technique ayant par la passé permis de localiser l'aaRS bifonctionnelle EPRS à la jonction entre la base et un des bras de la structure du complexe MARS mammifère (234).



Figure 12.Différents modèles bi- et tridimensionnels proposés pour représenter le complexe MARS des Eucaryotes supérieurs

A : modèle tridimensionnel montrant un arrangement possible des protéines selon (229) ; B : reconstruction tridimensionnelle du complexe selon (235), [A et B d'après (236)]; C : modèle bidimensionnel à 2 sous-domaines déterminés selon les sites d'ancrage à p38 (QRS, RRS et p43 liés à l'extrémité N-terminale de p38, les autres composants liés à l'extrémité C-terminale) ne reflétant pas forcément les positions relatives dans la structure tridimensionnelle, d'après (237); D : carte des connexions au sein du complexe, déduites par *knock-down* des AIMP, d'après (233).

C: Reprinted from Biochemical and Biophysical Research Communications, 303 Han JM, Kim JY, Kim S. Molecular network and functional implications of macromolecular tRNA synthetase complex. 985-993, Copyright (2003), with permission from Elsevier.

b) Taille, homogénéité

L'observation microscopique de structures flexibles et spatialement bien séparées fournit cependant des informations intéressantes : cette hétérogénéité explique le poids moléculaire apparent du complexe anormalement élevé (rayon hydrodynamique plus élevé qu'attendu pour une structure globulaire compacte). En effet, le poids moléculaire du TgMARS théorique évoqué ci-dessus (constitué de 8 sous-unités) serait d'environ 600 kDa, ce qui contraste avec le poids moléculaire globulaire observé par SEC (aux alentours de 1 MDa).

La nature non globulaire mais partiellement relâchée du TgMARS est cohérente avec des observations très récentes. En effet, l'analyse du MARS des Eucaryotes supérieurs par SEC conduit à attribuer une masse moléculaire apparente de l'ordre de 1,5 MDa, ce qui est confirmé par des mesures spectroscopiques (par MALS, multi-angle laser light scattering). Un volume approximatif de 1,8 Å³ lui est par ailleurs attribué, ce qui en fait le plus gros assemblage supramoléculaire impliqué dans la traduction (taille supérieure aux sous-unités ribosomales) (225). Cependant, l'utilisation de techniques de diffusion des rayons X (SAXS, small angle X-ray scattering) permettant d'obtenir des informations sur la structure du complexe en solution, combinée à des techniques hydrodynamiques (diffusion dynamique de lumière, vitesse et équilibre de sédimentation renseignant sur la taille, la distribution en solution et la masse du complexe) plaide pour un complexe significativement plus allongé que sphérique (225). Ces résultats, qui viennent contredire les modèles tridimensionnels précédemment établis, remettent quelque peu en cause la fidélité de ces derniers, et soulèvent l'hypothèse d'une altération possible du complexe lors de la préparation des échantillons. Comme nos données microscopiques et chromatographiques présentent apparemment la même discordance, nous pouvons faire l'hypothèse, de manière analogue, que la flexibilité de certaines sous-unités ou domaines moléculaires périphériques de notre complexe favorise l'accès des ARNt ou d'autres partenaires (facteurs d'élongations EF1, notamment) aux aaRS du complexe. Par ailleurs, Koehler et al. ont également très récemment mis en évidence que la liaison des ARNt aux aaRS liées à Arc1p induisait un compactage radical du complexe fongique (238) ; la caractérisation de TgMARS en présence des ARNt correspondants pourrait ainsi nous fournir de plus amples informations sur l'organisation du complexe.

4. Interactions protéines-protéines : rôles des domaines conservés et questions sans réponses

L'étude des interactions inter-protéiques, par des méthodes de double hybride permettant de cribler les interactions protéiques deux à deux, a montré que les AIMP sont les principaux facteurs régissant l'assemblage des complexe MARS, secondées par l'association directe entre aaRS (239). Nos travaux montrent de manière similaire une interaction directe de Tgp43 avec au moins deux aaRS toxoplasmiques, MRS et YRS. Une interaction directe de Tgp43 avec ses quatre partenaires est-elle cependant possible ? Des sites distincts de p38 permettent son interaction directe avec 5 aaRS et p43 (comme démontré par troncation progressive de l'extrémité C-terminale de cette AIMP (240)), ce qui rend cette hypothèse plausible pour Tg-p43. Pour l'heure, nous ne l'avons pas complètement établi, car si QRS nécessite Tg-p43 pour être retrouvée au sein des fractions de haut poids moléculaire comprenant le complexe intègre, nous ne pouvons pas exclure que QRS soit recrutée dans le MARS via ERS. Cette démonstration nécessiterait d'immunopurifier QRS en souche Δ Tg-p43, à l'aide d'anticorps anti-rQRS. Cette manipulation est envisageable, et requiert la fixation covalente des anticorps contenus dans notre antisérum à une résine pour chromatographie d'affinité. L'interactome de QRS pourrait ensuite être déterminé de la même manière que pour Tg-p43, MRS et YRS, mais avec l'avantage d'utiliser une protéine native.

En dépit des différences concernant le nombre et la disposition relative des composants des MARS dans différents branches de l'évolution, certaines caractéristiques communes suggèrent qu'ils partagent un même mécanisme d'assemblage, basé sur des interactions entre domaines homologues. Les séquences des aaRS et des AIMP partagent effectivement plusieurs domaines conservés au cours de l'évolution, situés généralement au sein des extensions N- ou C-terminales de ces protéines (168) (Figure 9).

Nous avons montré que le motif GST N-terminal de Tg-p43 suffit à l'assemblage du complexe, suggérant fortement l'intervention de ce motif chez *T. gondii*, comme dans la plupart des MARS actuellement connus. Le fondement moléculaire à la base des interactions dues aux domaines GST a été décrit dans le complexe tri-protéique de *S. cerevisiae*. Une série d'études structurales et biochimiques a montré que le domaine GST situé en position N-terminale de la protéine Arc1p est seul responsable de l'association avec ses deux partenaires (241). Ce motif apparaît par ailleurs fréquemment dans les protéines associées à

la traduction (186). Toutes les aaRS humaines portant un domaine GST sont d'ailleurs associées en complexe (MARS, VEGA, ou association binaire eEF1y•Cystéinyl-RS) (242). On retrouve ainsi le domaine GST comme lien entre p18 et l'extrémité N-terminale de la Méthionyl-RS (243), ce qui permet son arrimage au sous-complexe I (244). Une autre interface du même domaine dans p18 est mise en jeu pour interagir avec un effecteur de fonctions non canoniques, ATM. La suppression du domaine dans p38 entraîne également la dissociation de la Méthionyl-RS et d'EPRS, montrant le rôle du GST dans les interactions centrales de p38 (222). Le domaine GST est donc un moyen majeur d'interactions, conservé des levures aux Mammifères en passant désormais par les Apicomplexes, mais qui semble absent chez les Procaryotes (168). De manière intéressante, il a montré que les interfaces de dimérisation d'Arc1p avec ses deux partenaires sont fournies par des sites indépendants du même motif GST : l'une des aaRS se lie à Arc1p par une interface classique d'homodimérisation, tandis que l'autre interface n'était pas connue jusque-là (245). Par analogie, il est possible que Tg-p43 interagisse via des interfaces distinctes de GST avec MRS, QRS, et ERS.

D'autres domaines sont connus pour leurs interactions dans le cadre du complexe MARS. Le motif Leucine Zipper permet l'interaction entre les AIMP p38 et p43 (246), ainsi que l'attachement de l'Arginyl-RS au MARS des Eucaryotes supérieurs, chacune disposant de ce motif en position N-terminale. Ce motif hélicoïde contient une leucine tous les 7 résidus, formant une crête hydrophobe capable de s'intriquer avec son homologue, pour former une structure surenroulée, à l'image d'une fermeture à glissière (*zipper*). Cependant, ce motif n'a pas été retrouvé par bio-informatique dans les composants de TgMARS. Le domaine WHEP n'a pas non plus été prédit dans la structure d'ERS, alors qu'il en existe trois répétitions dans la séquence non catalytique espaçant les deux aaRS associées au sein de l'enzyme bifonctionnelle EPRS, retrouvée chez les métazoaires, des Cnidaires aux Mammifères (247). Le motif de type hélice-tour-hélice (HTH) contenu dans ce domaine (248) présente une capacité de liaison à l'ARNt mais permet aussi la fixation de l'Aspartyl-RS (249), voire de p38 (233), au MARS. L'absence de ce dernier domaine est un élément de plus rapprochant les aaRS toxoplasmiques de celles de la levure *S. cerevisiae* (250).

Le domaine GST semble donc être l'unique base moléculaire de l'assemblage du complexe MARS chez *T. gondii*. Cependant, la présence d'YRS pose un défi de plus dans la compréhension de son interaction avec le complexe, car il est prédit que cette protéine est

dépourvue de domaine GST (PONE, Figure 8). Les analyses hydrodynamiques du complexe par SEC ont conduit à retrouver YRS uniquement dans les fractions de haut poids moléculaire, et en relative faible abondance, suggérant que cette aaRS est moins solidement fixée au TgMARS que ses partenaires. En effet, dans les fractions SEC de plus faible poids moléculaire coexistent probablement des assemblages incomplets et des homo-oligomères des sous-unités du complexe. L'absence d'YRS de ces fractions suggère que son arrimage nécessite des interactions multiples, à l'image de l'interaction p38•Glutaminyl-RS eucaryote, intrinsèquement faible mais renforcée par le préalable arrimage de p43 et de l'Arginyl-RS à la Glutaminyl-RS (251). Des interactions « latérales » entre aaRS sont donc mises en jeu, en plus des interactions dépendantes des AIMP. L'hypothèse d'un tel mode de fixation pour YRS serait cohérente avec l'absence de domaine GST dans sa structure. D'autres mécanismes d'interactions n'impliquant pas de motifs conservés peuvent également être avancés. Ainsi, l'étude du cristal de la Lysyl-RS a suggéré que sa structure doublement dimérique en solution joue un rôle dans son association au MARS, en créant une nouvelle interface reconnue par p38, permettant la formation d'une structure finale hétérotétramérique (deux sous-unités de p38 et deux de Lysyl-RS) (252).

5. Rôle du complexe TgMARS

Les différences entre TgMARS et les complexes des Eucaryotes supérieurs ne sont pas uniquement structurales, mais aussi fonctionnelles, comme en témoignent les expériences de suppression de Tg-p43 entraînant la désagrégation du complexe. Dans un premier temps, nous pensions avoir détecté une altération phénotypique, mais qui s'est révélée être un artéfact. Tg-p43 n'est pas indispensable à la survie du parasite, et son absence n'altère ni ses capacités de propagation *in vitro*, ni ses facultés à induire une maladie aiguë et/ou chronique chez la souris Swiss. Les effectifs utilisés ici pour établir le maintien de la virulence en modèle murin sont certes faibles, mais probablement suffisants pour détecter une altération majeure. Le contraste est marqué avec la souris, chez qui la suppression de p38 (AIMP garante du maintien du MARS) est létale après quelques jours de vie sans toutefois empêcher le développement embryonnaire (222). Chez *C. elegans*, la suppression de MRS entraîne une baisse de fertilité et une létalité embryonnaire dépendante de son domaine EMAP II-*like* C-terminal assimilé à p43 (220). Cependant, les autres expériences de délétions de gènes codant les protéines d'architecture des MARS n'entraînent pas des conséquences aussi radicales. La suppression de l'expression de p38 en cellules humaines (HeLa) entraîne un retard de croissance (par diminution de la synthèse protéique) sans l'inhiber totalement (253). Par ailleurs, la délétion d'Arc1p chez *S. cerevisiae* n'est pas létale (hormis en cas de délétion conjointe du gène *Los1* qui est responsable du transport des ARNt matures du noyau vers le cytosol) mais diminue sa vitesse de croissance (221). Chez *T. brucei*, la suppression de MCP2 entraîne une perte de valeur sélective *in vitro* (croissance ralentie) et *in vivo* (infection murine retardée) (223). Le rôle du MARS semble ainsi déterminant chez les organismes pluricellulaires, mais moins indispensable à la viabilité de cellules isolées ou des unicellulaires. Nos résultats viennent s'inscrire dans ces constatations, mais il apparaît que l'effet semble encore moindre chez *T. gondii*, comparé aux autres unicellulaires étudiés.

Comme chez les autres organismes, le rôle exact du complexe et les raisons d'élection de certaines aaRS pour le composer restent donc controversées, et plusieurs théories ont été émises concernant la fonction de ces assemblages protéiques.

L'association à des protéines non enzymatiques augmente l'activité catalytique de plusieurs aaRS par l'apport de domaines non spécifiques de liaison à l'ARNt (254), comme montré chez *M. thermautotrophicus* avec la Leucyl-R, la Séryl-RS *et* EF1α (211) (214), *chez S. cerevisiae*, avec Arc1p et ses deux partenaires (221,255), ou encore chez les Eucaryotes supérieurs avec p43 (256) (action dépendante du domaine EMAP II chez ces deux derniers organismes (256–258)). L'étude tridimensionnelle du complexe par Wolfe *et al.* en 2005 retrouvait p43 à proximité des sites de fixation des ARNt portés par les aaRS, ce qui est un argument supplémentaire pour un fonctionnement du MARS comme machine d'aminoacylation (236). La présence dans TgMARS d'aaRS dépourvues de domaines additionnels de liaison à l'ARN (QRS, ERS et YRS, PONE, figure 8) plaide en faveur d'une potentialisation de la réaction par l'adjonction du domaine EMAP II de Tg-p43. Cette hypothèse pourrait être testée chez *T. gondii* par la mesure des activités enzymatiques des trois aaRS en présence ou en l'absence de Tg-p43 ou de sa version tronquée.

Cependant, cela n'expliquerait pas la présence de MRS, qui possède intrinsèquement un tel domaine. La récente étude du MARS de *Trypanosoma brucei* indique certes que la forme complexée de la Méthionyl-RS est plus active que sa forme libre, discordance accrue en présence de l'AIMP MCP2, mais cette aaRS est dépourvue de domaine additionnel de liaison à l'ARNt chez ce parasite (223). Une explication à la présence de MRS pourrait résider dans

l'amélioration de la stabilité des protéines composant le MARS. La suppression de p38 chez la souris entraîne en effet une diminution des niveaux protéiques de plusieurs aaRS (Isoleucyl-, Méthionyl- et Arginyl-RS) et des autres AIMP p18 et p43, consécutive à une moindre stabilité protéique (222). De manière semblable, l'interaction de p18 avec MRS (au sein du MARS) et avec eIF2γ stabilise ces deux protéines impliquées dans l'initiation de la traduction. Par ce biais, p18 sécuriserait ainsi d'une part la synthèse de l'aminoacyl-ARNt_i^{Met}, et d'autre part sa délivrance au complexe d'initiation (259,260). Ces éléments rejoignent l'hypothèse selon laquelle le complexe MARS servirait de navette pour l'ARNt chargé vers le ribosome, hypothèse compatible avec la présence de MRS dans TgMARS.

Nous pouvons également noter qu'EF1α avait été copurifiée à une reprise avec Tg-p43, à partir de parasites au stade intracellulaire (données non montrées), mais ce résultat n'a pas pu être reproduit. EF1α a été retrouvée dans le complexe MARS de *C. elegans* (220), ainsi que chez *M. thermautotrophicus* (261). Comme suggéré pour le nématode, EF1 pourrait être un partenaire transitoire nécessaire lors du processus d'assemblage de TgMARS ou pour le transit des ARNt vers le ribosome. Le fait qu'il ait été identifié en parasites intracellulaires pourrait indiquer une implication traductionnelle du complexe en phase de croissance. Il n'est d'ailleurs pas exclu que l'on n'observe ici qu'une partie d'un complexe plus grand. La copurification de nombreuses molécules ribosomales avec le complexe de *C. elegans* (220), ainsi qu'avec une fraction du MARS humain (262), a déjà conduit à suggérer que la traduction des Eucaryotes pourrait être réalisée au sein d'une machine supramoléculaire et que MARS ne serait que le noyau d'un assemblage impliquant potentiellement toutes les aaRS.

La présence au sein des AIMP de domaines accessoires ne semble cependant pas suffisante à justifier la nécessité d'un complexe, puisque ces domaines pourraient aussi bien être intégrés aux enzymes elles-mêmes, ce qui est le cas pour certaines d'entre elles. D'autres fonctions ont manifestement orienté l'évolution de ces protéines vers cette finalité, y compris chez *T. gondii.* Comme de nombreux autres complexes macromoléculaires (253), le MARS servirait de dépôt ou de réservoir pour les protéines le composant, qui seraient mobilisables pour l'accomplissement de leurs diverses fonctions non canoniques. En effet, les phosphorylations d'EPRS, de la Lysyl-RS et de p38 permettent leurs libérations, suivies respectivement de la formation du complexe GAIT (250,263), d'une translocation nucléaire

avec diminution de l'activité enzymatique canonique au profit de la synthèse d'Ap₄A (264) (175), et d'une translocation nucléaire permettant le contrôle de la réponse apoptotique p53 dépendante (200). L'organisation en complexe MARS permettrait donc le contrôle spatiotemporel des fonctions extra-traductionnelles par libération ou séquestration des aaRS et des AIMP. Celles-ci ayant des rôles de régulation de phénomènes comme l'apoptose et l'inflammation, l'effet de la suppression du MARS serait logiquement plus important chez les pluricellulaires (220). La présence d'YRS dans le complexe peut être un argument en faveur de l'hypothèse d'une fonction non canonique de cette aaRS, qui serait régulée par le biais de son arrimage au complexe. L'analyse bio-informatique prédit que cette protéine est dépourvue de tout domaine additionnel, associant uniquement un domaine catalytique à une extension N-terminale de structure hautement désordonnée. Sauf à envisager l'existence de domaines conservés non détectés, nous ne pouvons exclure que la protéine identifiée comme YRS soit en réalité une aaRS-like protein, famille de molécules habituellement limitées à un domaine catalytique nucléotidyl-transférase et incapables d'aminoacyler un ARNt destiné à la synthèse protéique. Ces protéines sont considérées comme des duplications d'aaRS qui ont subi une spécialisation fonctionnelle leur permettant d'être impliquées dans la biosynthèse des acides aminés, le contrôle qualité de l'aminoacylation, ou d'autres processus parfois mal connus (265). Une autre hypothèse, par analogie avec ce qui a été montré chez P. falciparum, était la nature sécrétoire d'YRS. La sécrétion cytokinique de PfTyrRS dépend de la présence d'un motif ELR (commun à l'IL-8 et à PfYRS) dans la séquence de son domaine catalytique, car la mutation de ce motif abolit cette sécrétion (133). Le motif ELR est également présent dans la séquence protéique de l'YRS toxoplasmique. Ce motif n'est-il pas reconnu chez T. gondii par les processus de sécrétion, ou n'est-il pas exposé à la surface de la protéine ? Ou bien sa mise en action nécessite-t-elle un clivage C-terminal qui aurait « trompé » notre immunofluorescence et ne nous aurait pas permis de « suivre » la partie sécrétée N-terminale hors du parasite ? L'exploration plus détaillée des domaines nécessaires à son arrimage à Tg-p43 serait nécessaire pour répondre à ces questionnements.

Enfin, la coopération d'Arc1p avec l'exportine Los1p impliquée dans le transport d'ARNt (221), et son caractère nécessaire au confinement cytoplasmique de ses aaRS partenaires ainsi que de certains ARNt (266), ont conduit à suggérer que le MARS pourrait servir à

canaliser directement les ARNt chargés depuis le noyau vers les ribosomes actifs. Alors qu'un complexe nucléaire a été retrouvé en cellules humaines (235), nous ne retrouvons pas les composants du TgMARS ailleurs que dans le cytoplasme. Avant d'exclure un tel mode d'intervention du TgMARS, il serait toutefois nécessaire de déterminer la localisation des partenaires de Tg-p43 en l'absence de Tg-p43.

Le choix des aaRS et la fonction exacte de TgMARS restent donc un mystère, d'autant plus au regard du caractère non indispensable à la viabilité ou à la pathogénèse de Tg-p43. Le rôle de Tg-p43 dans le contrôle post-transcriptionnel de ce parasite unicellulaire doit être subtil, et il reste possible que la rupture du complexe soit délétère pour certains processus non explorés dans nos travaux, comme le phénomène d'interconversion de bradyzoïte en tachyzoïte. La vérification de l'infectiosité de kystes de parasites ΔTg-p43 est une perspective qui permettrait de répondre à ces interrogations.

Chapitre II : approche thérapeutique via le complexe MARS

I. Introduction

1. Contexte

Comme exposé en introduction générale, les cibles actuellement utilisées en thérapeutique anti-toxoplasmique sont limitées et les médicaments présentent certains inconvénients majeurs. Le travail présenté en chapitre I constitue une base théorique à l'étude des composants du complexe TgMARS quant à leur potentialité thérapeutique. En parallèle de ce travail, l'équipe du Dr. Amit Sharma (ICGEB, New Delhi) s'intéressait aux relations structures-activité de certains inhibiteurs d'aaRS prometteurs en thérapeutique antipaludique (267). A. Sharma *et coll*. ont ainsi réalisé un criblage in silico par ancrage moléculaire (*docking*) statique de centaines de molécules disponibles sur le marché, vis à vis de la Glutaminyl-RS (QRS) de *P. falciparum* et de celle de *T. gondii*. Un panel de 40 composés sélectionnés pour leur interaction prédite avec TgQRS a alors pu être testé au sein de notre équipe.

2. Justification de l'étude de QRS en tant que cible thérapeutique

Comme montré précédemment, l'expression de Tg-p43 n'est pas indispensable à la viabilité ou la pathogénèse de *T. gondii* ; Tg-p43 n'a par conséquent pas été retenue comme une cible thérapeutique d'intérêt. Cependant, lors des tentatives d'étiquetage des aaRS du complexe TgMARS, nous avions constaté l'impossibilité d'obtenir des souches de toxoplasmes exprimant TgQRS modifiée en C-terminal. Cette donnée était interprétée comme une probable létalité de la modification de cette enzyme.

Par ailleurs, même si peu de leurs inhibiteurs sont aujourd'hui utilisés, il est acquis que la famille des aaRS présente un potentiel certain de cible thérapeutique. La recherche de molécules inhibitrices anti-aaRS s'est essentiellement focalisée ces dernières années sur la thérapie anti-infectieuse. Cependant la frontière avec de la cancérothérapie est assez mince, comme le montre l'exemple de la borrélidine. Ce macrolide a surtout été étudié pour son large spectre anti-infectieux (antibactérien, antiviral, antifongique, antipaludique), mais s'avère également interférer efficacement avec la prolifération des cellules de leucémies

aiguës lymphoblastiques, en entraînant une accumulation d'ARNt et diverses conséquences bénéfiques (apoptose, arrêt du cycle cellulaire, différenciation) (268).

a) Composés antibactériens

La difficulté principale dans la mise au point de molécules anti-infectieuses réside dans la nécessité d'une action ciblant une aaRS du pathogène, sans affecter son équivalent humain. Initialement, la recherche d'applications anti-infectieuses des aaRS s'est concentrée sur le monde bactérien, en raison de la stagnation de l'offre de molécules antibactériennes, doublée de l'émergence et l'accentuation de résistances à la plupart des familles thérapeutiques.

En raison des différences de séquences et de structures entres formes bactériennes et eucaryotes des aaRS, de nombreuses pistes ont été explorées depuis les années 1990 (166). Par ailleurs, les Procaryotes disposent généralement d'une seule aaRS pour chaque acide aminé, ce qui élimine les problèmes liés aux isotypes enzymatiques décrits chez les Eucaryotes. Ceux-ci contiennent en effet de légères variations dans leurs séquences, susceptibles de conférer une résistance d'un isotype à l'inhibiteur dessiné contre un autre isotype (269). A l'heure actuelle, la mupirocine est le seul inhibiteur anti-aaRS commercialisé en tant que médicament (270). Il s'agit d'un antibiotique naturel extrait de Pseudomonas fluorescens, qui est très largement utilisé par voie topique, notamment pour la décontamination du portage nasal de Staphylococcus aureus, y compris les isolats résistants à la méticilline. Découvert dans les années 1960 (271), sa cible a été élucidée dès 1978 : il agit par inhibition sélective et puissante de l'Isoleucyl-RS bactérienne (272). Plus récemment, l'apport de la cristallographie a permis d'approfondir la connaissance de son mécanisme d'action : étudiée chez Thermus thermophilus, la mupirocine est un analogue structural de l'Isoleucyl-AMP qui inhibe de manière compétitive la fixation de l'ATP et celle de l'acide aminé à cette aaRS (273) avec une sélectivité très élevée (index de 8000) (274).

D'autres composés biosynthétiques ont été découverts depuis la mupirocine, certains ciblant la prolyl-RS et testés avec succès en modèle murin (atténuation de la virulence d'une infection par *E. coli*) (275). Parmi ceux qui associent activité antibactérienne et sélectivité de la cible bactérienne se trouve l'indolmycine (271), un inhibiteur de la Tryptophanyl-RS et candidat sérieux au traitement de l'ulcère gastro-duodénal à *Helicobacter pylori*. Les premières études ont montré une efficacité dans l'éradication de l'infection expérimentale

chez la gerbille (276). *In vitro*, l'indolmycine a été testée avec succès sur *S. aureus*, avec une activité maintenue sur des souches résistantes à la mupirocine ou l'acide fusidique (277). L'apparition de souches résistantes a été constatée, avec toutefois une perte significative de valeur sélective (*fitness*).

b) Composés antiparasitaire et antifongiques

Il est maintenant démontré que les aaRS peuvent constituer d'intéressantes cibles dans le domaine des infections dues aux pathogènes eucaryotes. Le domaine de relecture de la Leucyl-RS a été identifié comme la cible thérapeutique des molécules de la famille des benzoxaboroles, des dérivés borés au large spectre antifongique (278). Impulsée par l'OMS, la lutte contre les filarioses lymphatiques a permis de découvrir des molécules de la famille des tirandamycines, inhibiteurs de l'Asparaginyl-RS de la filaire Brugia malayi. Parmi cellesci, un composé qui s'est avéré filaricide de manière spectaculairement rapide (24 heures) avec une CE₅₀ de 1 µM (279). Cette aaRS est une cible privilégiée, car fortement exprimée chez la femelle de *B. malayi*, et dotée d'une activité chimiotactique vis-à-vis des leucocytes, contribuant ainsi à la réponse inflammatoire chronique au cours de la maladie (280). D'autres molécules, dérivées semi-synthétiques de l'acide 3,5-dicafféoylquinique extrait de l'armoise chinoise Artemisia argyi, sont des inhibiteurs de la Leucyl-RS de Giardia intestinalis (281). Plusieurs composés isoprénoïdes d'origine végétale s'avèrent quant à eux actifs chez les Trypanosomatidés, et des études d'ancrage in silico a abouti à identifier la Méthionyl-RS de ces parasites comme l'une des cibles de monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes préalablement sélectionnés pour leur effet chez des espèces du genre Leishmania (282). Enfin, chez T. brucei, le parasite responsable de la Trypanosomiase Humaine Africaine, six aaRS (une de chaque classe) ont été validées comme des cibles potentielles (223,283).

Les aaRS sont également considérés comme des cibles chez les Apicomplexes. D'une part, les aaRS apicoplastiques, structuralement proches de leurs homologues procaryotes et significativement différentes des versions humaines, sont des cibles toutes désignées (207). D'autre part, l'analyse bio-informatique systématique du génome *P. falciparum* indique que la fraction du génome consacrée aux aaRS est particulièrement élevée (0,7 %), par rapport à d'autres espèces dont l'Homme (0,2 %), avec dans leur architecture la présence de plusieurs modules peptidiques inhabituels (juxtaposition de domaines Ybak, GST, Sérine-thréonine

kinase et domaines de liaison à l'ADN) (203). Cette étude *in silico* révèle également des divergences de séquence protéiques dans des motifs-clés des sites catalytiques, ainsi que des différences structurales importantes dans les domaines de liaison à l'anticodon de plusieurs aaRS.

Il est par ailleurs connu que certains médicaments inhibiteurs de la traduction des Procaryotes (clindamycine, macrolides) présentent une activité sur les Apicomplexes en interférant avec la traduction apicoplastique (284), et les inhibiteurs d'aaRS auraient probablement leur place à côté de médicaments actuellement utilisés comme les tétracyclines, dont l'effet parasiticide retardé sur *Plasmodium* est consécutif à un blocage de l'expression du génome de l'apicoplaste (285). L'efficacité chez *P. falciparum* de la mupirocine par inhibition de l'Isoleucyl-RS apicoplastique a d'ailleurs été démontrée par l'induction de souches résistantes (286).

Utilisant une banque de souches de levures haplo-insuffisantes, Hoepfner *et al.* ont montré en 2012 que la cible de la cladosporine est la Lysyl-RS plasmodiale cytosolique(287). Cette molécule est connue pour ses propriétés antifongiques, et son activité inhibitrice sur *Plasmodium* a été détectée au cours d'un criblage phénotypique d'une bibliothèque de produits non synthétiques (288). L'étude chez *P. falciparum* mettait en évidence une activité inhibitrice d'efficacité équivalente sur les stades hépatique et intra-érythrocytaire. A la suite de ces travaux, Hoen *et al.* s'attachèrent à construire une banque virtuelle de ligands sélectifs de la version apicoplastique de la Lysyl-RS, dont cinq nouveaux composés furent au final synthétisés ; l'inhibition était sélective de cette enzyme, et l'activité sur les enzymes homologues cytosolique et humaine était négligeable (274).

Enfin, une équipe strasbourgeoise a souligné en 2009 la présence de singularités dans la séquence de l'Aspartyl-RS cytosolique de *Plasmodium* spp, avec une extension N-terminale et une insertion dans le domaine de liaison à l'anticodon absents de leur homologue humaine, et déterminantes pour l'activité enzymatique (289). La même année, l'équipe d'A. Sharma détectait par analyses bio-informatiques des différences structurales clés dans diverses aaRS plasmodiales par rapport à leurs homologues humaines (203), ce qui était conforté par la publication de la structure tridimensionnelle de la Lysyl-RS cytosolique de *P. falciparum* (290). Ces données récentes identifient les aaRS apicomplexes en tant que cibles d'intérêt, et justifient leur étude dans une perspective thérapeutique.

II. Travail personnel

1. Matériels et méthodes

a) Criblage de candidats-médicaments

Le criblage initial des composés a été réalisé in vitro en flacons de culture cellulaire de 25 cm². Les parasites étaient cultivés à 37°C en atmosphère contenant 5 % de CO₂, sur un tapis confluent de fibroblastes humains (HFF). Le milieu de culture DMEM était additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (Invitrogen), 4 mM de glutamine, 500 U/mL de pénicilline, et 250 μ g/mL de streptomycine. Environ 10⁶ tachyzoïtes fraîchement sortis de leurs cellules hôtes étaient utilisés pour inoculer le tapis cellulaire. Six heures plus tard, les milieux étaient remplacés par un milieu identique additionné du solvant (DMSO) ou du composé testé pour une concentration finale de 100 µM (concentration finale en DMSO inférieure à 0,1 %). Les cultures étaient observées quotidiennement pendant 10 jours ou jusqu'à lyse du tapis cellulaire. Les composés présentant un effet à cette concentration étaient testés de la même manière à 1 et 10 µM ; seuls les composés présentant un effet à 10 µM étaient retenus. Pour les évaluations ultérieures, le composé 73 a été utilisé à la concentration de 5 µM, sauf mention contraire. Pour réaliser les expérimentations de cytométrie en images, une nouvelle aliquote du composé 73 a été commandée auprès de Pharmeks (référence : PHAR255288, Pharmeks Ltd., Moscou), société ayant précédemment fourni l'échantillon initial à l'équipe du Dr. Amit Sharma.

b) Détermination des concentrations efficaces

Les concentrations efficaces et toxiques induisant 50 % de l'effet maximum (CE_{50}) ou de la toxicité maximum (CT_{50}), respectivement, ont été déterminées par mesure de la prolifération de parasites (incorporation d'uracile tritié) ou de fibroblastes humains (trousse *Cell Titer Aqueous One Solution,* Promega) comme décrit précédemment (57).

Ces paramètres ont été également déterminés par une méthode de cytométrie en images. Pour la détermination de la CE_{50} , des plaques de culture à 96 puits recouvertes d'un tapis confluent de HFF étaient infectées par les souches RH Δ Ku80 ou Pru Δ Ku80 (40000 tachyzoïtes par puits). Après 2 h d'incubation permettant l'invasion des cellules, les milieux de culture étaient remplacés par un milieu identique contenant la molécule à tester, selon une gamme de concentrations finales de 125 nM à 8000 nM (concentration finale en DMSO inférieure à 0,1 %), puis remis en incubation pendant 24 h. Pour la détermination de la CT₅₀, 5000 HFF étaient déposées dans chaque puits d'une plaque de culture à 96 puits et laissés 36 h en culture. Le milieu était alors remplacé par un milieu identique contenant le composé 73, selon une gamme de concentrations finales de 0,5 à 128 μ M, et l'incubation était poursuivie pendant 30 h en présence du composé. Dans tous les cas, chaque condition était testée en trois exemplaires. Les noyaux cellulaires fibroblastiques et parasitaires étaient marqués par l'intercalant de l'ADN fluorescent Hoechst 33258 à 5 µg/mL. Ce marquage permettait, après fixation par le formaldéhyde, la numération automatique des cellules et des parasites dans chaque puits à l'aide d'une plateforme d'imagerie équipée d'un microscope de criblage à haut débit Scan^R (Olympus). Ce système pilotait l'acquisition d'images à l'objectif 20× à raison de 20 champs par puits dans la longueur d'onde d'émission du marqueur fluorescent (420-460 nm). Un système d'autofocus intégré au logiciel permettait d'obtenir la netteté sur tous les champs d'observation. Le flux d'images était réalisé à l'aide du logiciel d'analyse scan^R. Le traitement automatisé des images consistait à soustraire le bruit de fond de chaque image, puis identifier les noyaux des cellules et de parasites par un algorithme permettant la détection des contours d'objets. Les données extraites de cette analyse ont permis d'obtenir un nombre total de cellules et de parasites par puits. La prolifération parasitaire (évaluation de l'efficacité) était définie par le rapport nombre de cellules / nombres de parasites ; la prolifération cellulaire (évaluation de la toxicité) était définie par le nombre de HFF par puits.

Les valeurs de CE₅₀ et CT₅₀ étaient déterminées par régression non linéaire à l'aide du programme HN-NonLin (version 1.1) (<u>http://www.who.int/malaria/rbm/Attachment/2004</u> <u>1108/Non-Lin- V1.1.xls</u>), en fixant à 100 % l'effet maximal observé et 0 % la valeur du signal obtenu avec le témoin négatif.

c) Immunofluorescence

Les toxoplasmes de type I (RH Δ Ku80), II (Pru Δ Ku80 et ME49) ainsi que le parasite animal *Neospora caninum* étaient cultivés pendant 8 h avant remplacement du milieu par un milieu contenant le composé 73 (5 μ M), l'inhibiteur d'histone déacétylase FR235222 (50 ng/mL) ou le solvant (0,04 % DMSO). Après 24 h de culture sous traitement, les parasites étaient fixés et préparés pour immunofluorescence comme décrit précédemment (57), avec des anticorps primaires dirigés contre SUMO (57), SAG1, HDAC3 (56) et rQRS (291).

d) Bio-informatique

La recherche de domaines conservés, la prédiction *in silico* de désordre, les alignements et mesures d'identité de séquences protéiques de la Glutaminyl-RS humaine (GenBank : AAH29739.1) et de *T. gondii* (ToxoDB *: TGVEG_217460*) ont été réalisés comme décrit précédemment (291).

2. Résultats

a) Criblage in vitro

Parmi les 40 molécules testées *in vitro* pour leurs capacités à inhiber la croissance parasitaire à la concentration de 100 μ M, quatre composés furent sélectionnés et testés à concentrations inférieures. Un seul composé, le n°73 (Figure 13), montra la capacité d'arrêter totalement la croissance des parasites de types I (souches RH Δ Ku80) et II (Pru Δ Ku80) à une concentration approximative de 5 μ M. Testé à concentrations inférieures, la présence de ce composé entraînait un ralentissement du cycle à 2 μ M, et la poursuite d'un cycle normal à 1 μ M.



Figure 13. Formule semi-développée du composé 73, ou N'-[(1Z)-amino(pyridin-2-yl)méthylidène]-2-hydroxybenzohydrazide.

b) Caractérisation qualitative de l'effet du composé 73

L'aspect microscopique des parasites en présence du composé 73 ne présentait pas d'altération morphologique évidente, hormis une taille de vacuole parasitophore anormalement augmentée pour les parasites de type II (Figure 15C, Figure 17 B, Figure 18C). L'arrêt de la division était complet et durable tant que le composé n'était pas retiré du milieu de culture. Lorsqu'il était retiré après 24, 48, 72 ou 96 heures, le cycle parasitaire reprenait et conduisait à la lyse totale du tapis cellulaire, montrant la nature parasitostatique de l'effet (Figure 14 C, D).



Figure 14. Evaluation de la rémanence et de la parasiticidie du composé 73. Le prétraitement du tapis cellulaire (A) ou des parasites (B) avant inoculation, de même que l'arrêt de la multiplication parasitaire par maintien en présence du composé 73 pendant 24 à 96 heures (C, D), n'empêchent pas l'infection et l'aboutissement du processus complet du cycle *in vitro* jusqu'à la lyse cellulaire.

Cette observation était confirmée par l'absence d'effet lorsque les parasites étaient prétraités avant une mise en culture en conditions classiques (Figure 14 B). Le composé 73 n'agit apparemment pas via une action rémanente sur la cellule hôte, puisque le
prétraitement du milieu de culture n'empêche pas l'infection normale de celui-ci après avoir retiré le composé (Figure 14 A).

Les expérimentations d'immunofluorescence n'ont pas mis en évidence de modification de la distribution ou de l'expression de protéines de surface (SAG1, Figure 15), nucléaires (SUMO, HDAC3, Figure 16 et Figure 17), ou cytosolique (QRS, Figure 18). Contrairement au composé FR235222 préalablement caractérisé par notre équipe, aucune anomalie de la cytocinèse n'a été observée. Quelques protrusions de la membrane, également observées avec le composé FR235222, sont visibles en marquage anti-SAG1 (Figure 15).



Anti-SAG1 Hoechst

Figure 15. Aspect des parasites sous traitement. Le marquage anti-SAG1 ne révèle pas de modification majeure, hormis quelques protrusions de la membrane également observées avec le composé FR235222. Souches testées : RHΔKu80 (A), PruΔKu80 (B), ME49 (C). Barre d'échelle : 10 µm.



Anti-SUMO

Figure 16. Aspect des parasites sous traitement. Le marquage anti-SUMO ne révèle pas de modification de la cytocinèse, contrairement à ce qui est observé avec le composé FR235222. Souches testées : RHΔKu80 (A), PruΔKu80 (B), ME49 (C), *Neospora caninum* (D). Barre d'échelle : 10 µm.



Anti-HDAC3 Hoechst

Figure 17. Aspect des parasites sous traitement. Le marquage anti-HDAC3 ne révèle pas de modification de la cytocinèse, contrairement à ce qui est observé avec le composé FR235222. Souches testées : RHΔKu80 (A), ME49 (B), Neospora caninum (C). Barre d'échelle : 10 µm.



Anti-rQRS Hoechst

Figure 18. Aspect des parasites sous traitement. Le marquage anti-QRS ne révèle pas de modification de la distribution subcellulaire, d'extinction ou d'hyperexpression de QRS. Souches testées : RHΔKu80 (A), PruΔKu80 (B), ME49 (C), *Neospora caninum* (D). Barre d'échelle : 10 µm.

c) Quantification de l'effet antiparasitaire

Afin d'évaluer la puissance de l'effet du composé 73, la CE_{50} sur souches RH Δ Ku80 et Pru Δ Ku80 a été déterminée par deux méthodes. Les valeurs obtenues par cytométrie en image (Figure 19, B, D) étaient du même ordre que la valeur déduite de l'observation en flasques de culture (environ 2 μ M) avec un effet toutefois plus puissant sur la souche de type I. Par mesure de l'incorporation d'uracile tritié (qui est une fonction directe de la quantité de toxoplasmes en cours de division présents dans le puits testé), des valeurs plus faibles étaient observées, particulièrement pour la souche de type I qui affiche alors une CE₅₀ de l'ordre de 250 nM (Figure 19 C).



Figure 19. Evaluation de l'efficacité sur souches de type I RH Δ Ku80 (C, D) et de type II Pru Δ Ku80 (A, B). Les valeurs de CE₅₀ sont obtenues par cytométrie en images (B, D) et par mesure de l'incorporation d'uracile tritié (A, C). Les données expérimentales sont traitées par régression non linéaire suivant un polynôme d'ordre 3 (A) ou 2 (B, C, D).

d) Toxicité

Une approche sur fibroblastes humains de la toxicité du composé 73 a été menée par deux méthodes, avec des résultats significativement discordants. La méthode initialement mise en œuvre utilise la trousse de réactif *Cell Titer Aqueous One Solution* qui mesure l'intégrité de l'activité enzymatique mitochondriale. Cette méthode fournit une valeur relativement basse de CT₅₀, de l'ordre de 1200 nM (Figure 20 A). La méthode par cytométrie en images fournit une valeur nettement plus élevée de 17552 nM (Figure 20 B).



Figure 20. Evaluation de la toxicité sur fibroblastes. Les valeurs de CT_{50} sont obtenues par mesures de l'activité mitochondriale (A) et par cytométrie en images (B). Les données expérimentales sont traitées par régression non linéaire suivant un polynôme d'ordre 2 (A) ou 3 (B).

III. Conclusion

Le criblage simple des 40 composés disponibles nous a permis de mettre en évidence un composé dont les caractéristiques semblent prometteuses.

L'évaluation relativement sommaire de son efficacité anti-toxoplasmique et de sa toxicité sont encourageantes mais incitent cependant à la prudence. Les discordances observées entre les valeurs de CT₅₀ en fonction des méthodes utilisées restent effectivement problématiques. La toxicité sur fibroblastes s'est avérée nettement moindre lors de l'évaluation par cytométrie en image. Une explication possible réside dans la nature de la mesure. En effet, le kit *Cell Titer*, dont le principe est basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium, mesure l'intégrité de l'activité enzymatique mitochondriale. Cette activité pourrait être inhibée par la molécule testée, sans que le signal mesuré reflète le nombre de

cellules au moment de la mesure. Mais il est également possible que le nouvel échantillon de ce composé, commandé et utilisé pour la réalisation des manipulations de cytométrie en images, ait présenté un degré de pureté supérieur à l'échantillon initial, ou qu'un sous-produit de synthèse toxique ait été présent en moindre quantité. A l'inverse, il se pourrait que le nouvel échantillon ait été moins pur, présentant une moindre toxicité liée au principe actif ; dans ce cas, l'efficacité serait également amoindrie, expliquant les valeurs de CE₅₀ plus élevées.

Les valeurs de CE₅₀ obtenues avec le composé 73, bien que variables, restent d'un ordre de grandeur acceptable. A titre de comparaison, on peut notamment constater que certains dérivés semi-synthétiques de l'artémisinine récemment testés avec succès *in vitro* sur *T. gondii* présentaient des CE₅₀ dans la même gamme de concentrations (de 0,7 à 8 μ M) (66). Sur le plan qualitatif, bien que le comportement des parasites sous traitement suggère fortement un effet principalement centré sur la réplication, il conviendrait d'évaluer si les processus d'invasion cellulaire et de sortie active sont affectés. De même, l'évaluation de l'effet spécifique sur souches kystogènes (impact sur la kystogénèse et l'infectiosité de bradyzoïtes traités *ex-vivo*), de manière analogue à l'évaluation du composé FR235222 préalablement réalisée au sein de notre équipe, serait un apport important à ce travail.

L'évaluation de l'index de sélectivité constitue bien-sûr un paramètre essentiel à prendre en compte dans l'appréciation de l'intérêt du candidat-médicament. Sur le plan théorique, la comparaison des versions humaine et toxoplasmique de QRS indique une divergence limitée, permettant de douter de la sélectivité d'un inhibiteur potentiel. Si la comparaison des domaines conservés montre une composition modale nettement divergente (Figure 21), avec une portion N-terminale composée soit d'un domaine de liaison additionnel à l'ARNt (enzyme humaine), soit d'un domaine GST (enzyme parasitaire), la comparaison des séquences protéiques des sites actif et de liaison à l'anticodon montre une identité relativement forte (Figure 22). Malgré cette réserve, l'exemple de la cladosporine appliquée à l'inhibition de la Lysyl-RS de *Plasmodium* montre qu'un pourcentage d'identité de plus de 50 % n'empêche pas forcément une sélectivité importante. Les études d'Hoepfner *et al.* ont en effet révélé une puissance vis-à-vis de l'enzyme parasitaire plus de 100 fois supérieure à celle vis-à-vis de l'enzyme humaine (287). Ces tests enzymatiques confirmaient l'effet observé en culture cellulaire sur les stades parasitaires hépatiques et intraérythrocytaires

(CE₅₀ de 40 à 90 nM) et différentes cellules de mammifères (CT₅₀ de 9000 à plus de 100000 nM). Deux acides aminés au sein de la poche de liaison à l'ATP du site actif de l'enzyme parasitaire étaient prédits *in silico* comme responsables de cette haute sélectivité, puis confirmés par l'expression chez *S. cerevisiae* d'une version mutée de la Lysyl-RS. La CT₅₀ du composé 73 mérite donc d'être évaluée de manière plus précise. Il serait notamment nécessaire d'évaluer d'autres marqueurs de toxicité (condensation nucléaire, altération du cycle cellulaire) dans des types cellulaires représentatifs de la toxicité spécifique d'organe (cultures de cellules primaires issues d'organes ou de lignées cellulaires immortalisées).



Figure 21. Représentation schématique des domaines conservés et du niveau de désordre prédits dans la structure des Glutaminyl-RS toxoplasmique (A) et humaine (B).

Ces considérations ne peuvent cependant être pertinentes que si TgQRS est bien la cible réelle du composé 73. En effet, si les molécules criblées ont été choisies pour leurs capacités potentielles à interagir avec le site actif de TgQRS, il n'est pas certain que le composé 73 soit effectivement un ligand de cette enzyme, d'autant plus que le pré-criblage *in silico* a été réalisé sur un modèle dérivé de la structure cristalline de QRS d'autres espèces, et non à partir de la structure de TgQRS, non connue à ce jour. Une façon de répondre à cette question est l'induction de mutants résistants à la molécule 73, suivie du séquençage du gène *TgQRS* permettant de détecter si des mutations dans ce gène sont responsables de la

résistance acquise. Une autre méthode consiste à simplement tester l'inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme en présence du composé. L'obtention d'une version recombinante de TgQRS par Jason van Rooyen laisse entrevoir cette possibilité. Des expérimentations préliminaires de cinétique enzymatique ont été réalisées avec cette protéine exprimée en *E. coli*, mais n'ont pas mis en évidence de modification de l'activité d'aminoacylation. Ces résultats nécessitent cependant confirmation, puisqu'une seule concentration de l'inhibiteur supposé a été testée, et qu'il n'est pas certain que la quantité d'ARNt^{GIm} de synthèse utilisé ait été en quantité suffisante pour que la réaction se déroule en conditions saturantes.



Figure 22. Alignement des séquences protéiques des domaines catalytiques (A) et de liaison à l'anticodon (B) des Glutaminyl-RS humaine et toxoplasmique. Les domaines catalytiques présentent 50 % d'identité de séquence et 64 % de résidus similaires. Les domaines de liaison à l'anticodon présentent 36 % d'identité et 52 % de résidus similaires.

Au final, malgré ces incertitudes, le composé 73 présente *in vitro* une efficacité antitoxoplasmique peu contestable, et constitue un « hit », une molécule prometteuse, qui incite à s'intéresser plus avant à cette molécule et ses proches dérivés. Une sélection de 91 analogues du composé 73 a été réalisée par l'équipe du Dr. Amit Sharma; le criblage de l'efficacité de ces molécules constituerait la suite logique de ce travail, permettant peut-être d'atteindre le stade de l'expérimentation *in vivo* en modèle murin d'infection toxoplasmique aiguë ou chronique. Par ailleurs, nous avons montré au cours des travaux exposés dans le chapitre I qu'il nous était possible d'immunopurifier plusieurs aaRS natives (MRS-HA-FLAG, YRS-HA-FLAG) à partir des souches Δp43 ; de même, nous avons pu étiqueter la triptophanyl-RS, aaRS cytosolique fortement exprimée et sans interactome (données non montrées). Ces possibilités techniques, combinées au caractère prometteur des aaRS en tant que cibles thérapeutiques anti-Apicomplexes (et plus largement anti-infectieuses), ouvrent des perspectives favorables en matière de criblage de candidats-médicaments inhibiteurs enzymatiques, sans nécessiter le recours à la production de protéines recombinantes.

Conclusion générale

Ce travail décrit pour la première fois la composition du complexe MARS d'un Apicomplexe et fournit certains éléments concernant son organisation. Certaines des propriétés observées, telles son instabilité et son hétérogénéité, sont expliquées en termes de flexibilité de sa structure, et viennent conforter certaines observations récentes du MARS des Eucaryotes supérieurs. Si la fonction du complexe reste partiellement mystérieuse, la composition singulière mise au jour et ses implications en matière de relations protéinesprotéines soulèvent des perspectives intéressantes pour la compréhension des fonctions non canoniques des aaRS. Ces résultats pourraient ainsi avoir d'importantes conséquences pour de futures études structurales visant à élucider les bases moléculaires de l'assemblage et du fonctionnement du complexe MARS des Eucaryotes supérieurs.

Le travail préliminaire de recherche thérapeutique constitue une base et, on peut l'espérer, un point de départ dans la recherche de médicaments anti-toxoplasmiques ciblant les aaRS, qui constituent assurément des cibles thérapeutiques intéressantes.

Bibliographie

- 1. Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health*. 2010; 57:1-7.
- 2. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 1948; 108:660-663.
- 3. Smith ID. Ovine Fœtal Resorption caused by *Toxoplasma gondii* Infection. *Nature*. 1961; 189:939-939.
- 4. Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii. J Parasitol.* 1960; 46:11-21.
- 5. Hutchison WM. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 1965; 206:961-962.
- 6. Dubey JP, Frenkel JK. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J Parasitol*. 1973; 59:505-512.
- 7. Dubey JP. Toxoplasmosis a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol*. 2004; 126:57-72.
- 8. Vaudaux JD, Muccioli C, James ER, Silveira C, Magargal SL, Jung C, et al. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivai, Brazil. *J Infect Dis.* 2010; 202:1226-1233.
- 9. De Moura L, Bahia-Oliveira LMG, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12:326-329.
- 10. Kasper LH, Ware PL. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J Clin Invest*. 1985; 75:1570-1577.
- 11. Hill D, Coss C, Dubey JP, Wroblewski K, Sautter M, Hosten T, et al. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 2011; 97:328-337.
- 12. VanWormer E, Fritz H, Shapiro K, Mazet JAK, Conrad PA. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human-animal-environment interface. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013; 36:217-231.
- 13. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25:264-296.
- 14. Francia ME, Striepen B. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol*. 2014; 12:125-136.
- 15. Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool*. 1976; 23:537-546.
- 16. Henriquez SA, Brett R, Alexander J, Pratt J, Roberts CW. Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation*. 2009; 16:122-133.

- 17. Pedersen MG, Mortensen PB, Norgaard-Pedersen B, Postolache TT. *Toxoplasma gondii* infection and self-directed violence in mothers. *Arch Gen Psychiatry*. 2012; 69:1123-1130.
- 18. Fond G, Capdevielle D, Macgregor A, Attal J, Larue A, Brittner M, et al. [*Toxoplasma gondii*: a potential role in the genesis of psychiatric disorders]. *L'Encéphale*. 2013; 39:38-43.
- 19. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* The first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*. 2008; 55:467-475.
- 20. Sibley LD, Ajioka JW. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu Rev Microbiol*. 2008; 62:329-351.
- 21. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol*. 2009; 39:895-901.
- 22. Delair E, Latkany P, Noble AG, Rabiah P, McLeod R, Brézin A. Clinical manifestations of ocular toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2011; 19:91-102.
- 23. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 1999; 353:1829-1833.
- 24. Desmonts G, Couvreur J. Congenital Toxoplasmosis A Prospective Study of 378 Pregnancies. *N Engl J Med*. 1974; 290:1110-1116.
- 25. Delair E, Monnet D, Grabar S, Dupouy-Camet J, Yera H, Brézin AP. Respective roles of acquired and congenital infections in presumed ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 2008; 146:851-855.
- 26. Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull World Health Organ*. 2013; 91:501-508.
- 27. Murat J-B, Fricker Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013; 11:943-956.
- 28. Schmidt M, Sonneville R, Schnell D, Bigé N, Hamidfar R, Mongardon N, et al. Clinical features and outcomes in patients with disseminated toxoplasmosis admitted to intensive care: a multicenter study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013; 57:1535-1541.
- 29. Moncada PA, Montoya JG. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012; 10:815-828.
- 30. Villena I, Ancelle T, Delmas C, Garcia P, Brezin AP, Thulliez P, et al. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2010; 15:pii=19600.
- 31. McLeod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:320-344.
- 32. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363:1965-1976.

- 33. Robert-Gangneux F, Kieffer F. Prise en charge diagnostique et thérapeutique de la toxoplasmose congénitale. *Lett Gynécologue*. 2001; 27-34.
- 34. Kaplan JE, Benson C, Holmes KH, Brooks JT, Pau A, Masur H. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep Cent Dis Control*. 2009; 58:1-207.
- 35. Rodriguez JB, Szajnman SH. New antibacterials for the treatment of toxoplasmosis; a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2012; 22:311-333.
- 36. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2009; 15:1143-1238.
- 37. Butler NJ, Furtado JM, Winthrop KL, Smith JR. Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2013; 41:95-108.
- 38. Dardé ML. *Toxoplasma gondii*, « new » genotypes and virulence. *Parasite Paris Fr*. 2008; 15:366-371.
- 39. Harris C, Salgo MP, Tanowitz HB, Wittner M. In vitro assessment of antimicrobial agents against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis*. 1988; 157:14-22.
- 40. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008; 47:554-566.
- 41. Olariu TR, Remington JS, McLeod R, Alam A, Montoya JG. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30:1056-1061.
- 42. Jones JL, Parise ME, Fiore AE. Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 90:794-799.
- 43. Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ*. 1999; 318:1511-1514.
- 44. Gilbert RE, Gras L, Wallon M, Peyron F, Ades AE, Dunn DT. Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France. *Int J Epidemiol*. 2001; 30:1303-1308.
- 45. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon JM, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180:410-415.
- 46. Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, et al. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr Oslo Nor 1992*. 2005; 94:1721-1731.
- 47. Mandelbrot L. Prévention de la transmission mère-enfant de la toxoplasmose : perspectives. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 2012; 40:591-598.

- 48. Wiesner J, Reichenberg A, Heinrich S, Schlitzer M, Jomaa H. The plastid-like organelle of apicomplexan parasites as drug target. *Curr Pharm Des*. 2008; 14:855-871.
- 49. Allegra CJ, Boarman D, Kovacs JA, Morrison P, Beaver J, Chabner BA, et al. Interaction of sulfonamide and sulfone compounds with *Toxoplasma gondii* dihydropteroate synthase. *J Clin Invest*. 1990; 85:371-379.
- 50. Répertoire des médicaments [Internet]. ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [consulté le 30/07/2014]. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/Services/Repertoire-des-medicaments.
- 51. SYROCOT (Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis) study group, Thiébaut R, Leproust S, Chêne G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet*. 2007; 369:115-122.
- 52. Cortina-Borja M, Tan HK, Wallon M, Paul M, Prusa A, Buffolano W, et al. Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. *PLoS Med*. 2010; 7.
- 53. Gras L, Gilbert RE, Ades AE, Dunn DT. Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis. *Int J Epidemiol.* 2001; 30:1309-1313.
- 54. Bessières MH, Berrebi A, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S, et al. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001; 94:37-45.
- 55. Wallon M, Peyron F, Cornu C, Vinault S, Abrahamowicz M, Kopp CB, et al. Congenital *Toxoplasma* infection: monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013; 56:1223-1231.
- 56. Bougdour A, Maubon D, Baldacci P, Ortet P, Bastien O, Bouillon A, et al. Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. *J Exp Med*. 2009; 206:953-966.
- 57. Maubon D, Bougdour A, Wong Y-S, Brenier-Pinchart M-P, Curt A, Hakimi M-A, et al. Activity of the histone deacetylase inhibitor FR235222 on *Toxoplasma gondii*: inhibition of stage conversion of the parasite cyst form and study of new derivative compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:4843-4850.
- 58. Dorosz P, Vital Durand D, Le Jeunne C. Guide pratique des médicaments. Paris: Maloine; 2014; 1908 p.
- 59. Gomes TC, de Andrade Júnior HF, Lescano SAZ, Amato-Neto V. *In vitro* action of antiparasitic drugs, especially artesunate, against *Toxoplasma gondii*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012; 45:485-490.
- 60. Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*. 2004; 34:423-432.

- 61. Pradines B, Dormoi J, Briolant S, Bogreau H, Rogier C. La résistance aux antipaludiques. *Rev Francoph Lab.* 2010; 2010:51-62.
- 62. Travassos MA, Laufer MK. Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacologic, and clinical considerations. *Pediatr Res.* 2009; 65:64R-70R.
- 63. World Health Organization, Tuschman M, World Health Organization, Global Malaria Programme. World malaria report: 2013. Geneva; 2013; 256 p.
- 64. Gangjee A, Lin X, Queener SF. Design, synthesis, and biological evaluation of 2,4diamino-5-methyl-6-substituted-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as dihydrofolate reductase inhibitors. *J Med Chem*. 2004; 47:3689-3692.
- 65. Rosowsky A, Forsch RA, Queener SF. Further studies on 2,4-diamino-5-(2',5'disubstituted benzyl)pyrimidines as potent and selective inhibitors of dihydrofolate reductases from three major opportunistic pathogens of AIDS. *J Med Chem.* 2003; 46:1726-1736.
- 66. Jones-Brando L, D'Angelo J, Posner GH, Yolken R. *In vitro* inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of artemisinin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:4206-4208.
- 67. Liñares GEG, Ravaschino EL, Rodriguez JB. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr Med Chem*. 2006; 13:335-360.
- 68. Dantas-Leite L, Urbina JA, de Souza W, Vommaro RC. Antiproliferative synergism of azasterols and antifolates against *Toxoplasma gondii*. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 25:130-135.
- 69. Johnson SM, Murphy RC, Geiger JA, DeRocher AE, Zhang Z, Ojo KK, et al. Development of *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) inhibitors with potent anti-*Toxoplasma* activity. *J Med Chem.* 2012; 55:2416-2426.
- 70. Kim YA, Sharon A, Chu CK, Rais RH, Al Safarjalani ON, Naguib FNM, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of N6-benzyladenosine analogues as potential anti-*Toxoplasma* agents. *Biochem Pharmacol*. 2007; 73:1558-1572.
- Alomar ML, Rasse-Suriani FAO, Ganuza A, Cóceres VM, Cabrerizo FM, Angel SO. In vitro evaluation of β-carboline alkaloids as potential anti-*Toxoplasma* agents. *BMC Res Notes*. 2013; 6:193.
- 72. Hyde JE. Targeting purine and pyrimidine metabolism in human apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets*. 2007; 8:31-47.
- 73. Zaware N, Sharma H, Yang J, Devambatla RKV, Queener SF, Anderson KS, et al. Discovery of potent and selective inhibitors of *Toxoplasma gondii* thymidylate synthase for opportunistic infections. *ACS Med Chem Lett*. 2013; 4:1148-1151.
- 74. Cheng G, Muench SP, Zhou Y, Afanador GA, Mui EJ, Fomovska A, et al. Design, synthesis, and biological activity of diaryl ether inhibitors of *Toxoplasma gondii* enoyl reductase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23:2035-2043.

- 75. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*. 2005; 52:399-451.
- 76. Morrison DA. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends Parasitol*. 2009; 25:375-382.
- 77. Keeling PJ. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2010; 365:729-748.
- 78. McFadden GI. The apicoplast. *Protoplasma*. 2011; 248:641-650.
- 79. Bargieri D, Lagal V, Tardieux I, Ménard R. Host cell invasion by apicomplexans: what do we know? *Trends Parasitol*. 2012; 28:131-135.
- Klinger CM, Nisbet RE, Ouologuem DT, Roos DS, Dacks JB. Cryptic organelle homology in apicomplexan parasites: insights from evolutionary cell biology. *Curr Opin Microbiol*. 2013; 16:424-431.
- 81. Sheiner L, Soldati-Favre D. Protein trafficking inside *Toxoplasma gondii*. *Traffic Cph Den*. 2008; 9:636-646.
- Nam H-W. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J Parasitol*. 2009; 47 Suppl:S29-37.
- 83. Mercier C, Adjogble KDZ, Däubener W, Delauw M-F-C. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol*. 2005; 35:829-849.
- 84. Bougdour A, Durandau E, Brenier-Pinchart M-P, Ortet P, Barakat M, Kieffer S, et al. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell Host Microbe*. 2013; 13:489-500.
- 85. Braun L, Brenier-Pinchart M-P, Yogavel M, Curt-Varesano A, Curt-Bertini R-L, Hussain T, et al. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *J Exp Med*. 2013; 210:2071-2086.
- 86. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995; 172:1561-1566.
- 87. Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol*. 2011; 41:645-655.
- 88. Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*. 2003; 299:414-416.
- 89. Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières M-H, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis.* 2002; 186:684-689.

- 90. Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J, et al. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis.* 2009; 199:1155-1167.
- 91. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé M-L, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:5844-5849.
- 92. Cannella D, Brenier-Pinchart M-P, Braun L, van Rooyen JM, Bougdour A, Bastien O, et al. miR-146a and miR-155 delineate a MicroRNA fingerprint associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell Rep.* 2014; 6:928-937.
- 93. Demar M, Hommel D, Djossou F, Peneau C, Boukhari R, Louvel D, et al. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 18:E221-231.
- 94. Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé ML. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15:656-658.
- 95. Delhaes L, Ajzenberg D, Sicot B, Bourgeot P, Dardé M-L, Dei-Cas E, et al. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenat Diagn*. 2010; 30:902-905.
- 96. De Salvador-Guillouët F, Ajzenberg D, Chaillou-Opitz S, Saint-Paul M-C, Dunais B, Dellamonica P, et al. Severe pneumonia during primary infection with an atypical strain of *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man. *J Infect.* 2006; 53:e47-50.
- 97. Sobanski V, Ajzenberg D, Delhaes L, Bautin N, Just N. Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 187:1143-1145.
- 98. Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, et al. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007; 45:e88-95.
- 99. Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart M-P, Dardé M-L, Pelloux H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol*. 2008; 24:299-303.
- 100. Radke JR, Behnke MS, Mackey AJ, Radke JB, Roos DS, White MW. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol*. 2005; 3:26.
- 101. Fritz HM, Buchholz KR, Chen X, Durbin-Johnson B, Rocke DM, Conrad PA, et al. Transcriptomic analysis of *Toxoplasma* development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. *PloS One*. 2012; 7:e29998.
- 102. Cleary MD, Singh U, Blader IJ, Brewer JL, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell*. 2002; 1:329-340.

- 103. Singh U, Brewer JL, Boothroyd JC. Genetic analysis of tachyzoite to bradyzoite differentiation mutants in *Toxoplasma gondii* reveals a hierarchy of gene induction. *Mol Microbiol*. 2002; 44:721-733.
- 104. Iyer LM, Anantharaman V, Wolf MY, Aravind L. Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *Int J Parasitol.* 2008; 38:1-31.
- 105. Balaji S, Babu MM, Iyer LM, Aravind L. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33:3994-4006.
- 106. Painter HJ, Campbell TL, Llinás M. The Apicomplexan AP2 family: integral factors regulating *Plasmodium* development. *Mol Biochem Parasitol*. 2011; 176:1-7.
- 107. Behnke MS, Wootton JC, Lehmann MM, Radke JB, Lucas O, Nawas J, et al. Coordinated progression through two subtranscriptomes underlies the tachyzoite cycle of *Toxoplasma gondii*. *PloS One*. 2010; 5:e12354.
- 108. Van Noort V, Huynen MA. Combinatorial gene regulation in *Plasmodium falciparum*. *Trends Genet TIG*. 2006; 22:73-78.
- 109. Kafsack BFC, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, Campino SG, et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature*. 2014; 507:248-252.
- 110. Sinha A, Hughes KR, Modrzynska KK, Otto TD, Pfander C, Dickens NJ, et al. A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature*. 2014; 507:253-257.
- 111. Sautel CF, Cannella D, Bastien O, Kieffer S, Aldebert D, Garin J, et al. SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. *Mol Cell Biol*. 2007; 27:5711-5724.
- 112. Bougdour A, Braun L, Cannella D, Hakimi M-A. Chromatin modifications: implications in the regulation of gene expression in *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol*. 2010; 12:413-423.
- 113. Sullivan WJ, Hakimi M-A. Histone mediated gene activation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006; 148:109-116.
- 114. Saksouk N, Bhatti MM, Kieffer S, Smith AT, Musset K, Garin J, et al. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol*. 2005; 25:10301-10314.
- 115. Wang J, Dixon SE, Ting L-M, Liu T-K, Jeffers V, Croken MM, et al. Lysine acetyltransferase GCN5b interacts with AP2 factors and is required for *Toxoplasma gondii* proliferation. *PLoS Pathog*. 2014; 10:e1003830.
- 116. Le Roch KG, Johnson JR, Florens L, Zhou Y, Santrosyan A, Grainger M, et al. Global analysis of transcript and protein levels across the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Genome Res.* 2004; 14:2308-2318.

- 117. Xia D, Sanderson SJ, Jones AR, Prieto JH, Yates JR, Bromley E, et al. The proteome of *Toxoplasma gondii*: integration with the genome provides novel insights into gene expression and annotation. *Genome Biol*. 2008; 9:R116.
- 118. Wastling JM, Xia D, Sohal A, Chaussepied M, Pain A, Langsley G. Proteomes and transcriptomes of the Apicomplexa Where's the message? *Int J Parasitol*. 2009; 39:135-143.
- 119. Mair GR, Braks JAM, Garver LS, Wiegant JCAG, Hall N, Dirks RW, et al. Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science*. 2006; 313:667-669.
- 120. Fennell C, Babbitt S, Russo I, Wilkes J, Ranford-Cartwright L, Goldberg DE, et al. PfeIK1, a eukaryotic initiation factor 2alpha kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, regulates stress-response to amino-acid starvation. *Malar J*. 2009; 8:99.
- 121. Zhang M, Fennell C, Ranford-Cartwright L, Sakthivel R, Gueirard P, Meister S, et al. The *Plasmodium* eukaryotic initiation factor-2alpha kinase IK2 controls the latency of sporozoites in the mosquito salivary glands. *J Exp Med*. 2010; 207:1465-1474.
- 122. Joyce BR, Queener SF, Wek RC, Sullivan WJ. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2{alpha} promotes the extracellular survival of obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:17200-17205.
- 123. Zhang M, Joyce BR, Sullivan WJ Jr, Nussenzweig V. Translational control in *Plasmodium* and *Toxoplasma* parasites. *Eukaryot Cell*. 2013; 12:161-167.
- 124. Joyce BR, Tampaki Z, Kim K, Wek RC, Sullivan WJ Jr. The unfolded protein response in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* features translational and transcriptional control. *Eukaryot Cell*. 2013; 12:979-989.
- 125. Joyce BR, Konrad C, Wek RC, Sullivan WJ Jr. Translation control is critical during acute and chronic stages of toxoplasmosis infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011; 9:1-3.
- 126. Lirussi D, Matrajt M. RNA granules present only in extracellular *Toxoplasma gondii* increase parasite viability. *Int J Biol Sci.* 2011; 7:960-967.
- 127. Braun L, Cannella D, Ortet P, Barakat M, Sautel CF, Kieffer S, et al. A complex small RNA repertoire is generated by a plant/fungal-*like* machinery and effected by a metazoan-*like* Argonaute in the single-cell human parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*. 2010; 6:e1000920.
- 128. Galizi R, Spano F, Giubilei MA, Capuccini B, Magini A, Urbanelli L, et al. Evidence of tRNA cleavage in apicomplexan parasites: Half-tRNAs as new potential regulatory molecules of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2013; 188:99-108.
- 129. Elbarbary RA, Takaku H, Uchiumi N, Tamiya H, Abe M, Takahashi M, et al. Modulation of gene expression by human cytosolic tRNase Z(L) through 5'-half-tRNA. *PloS One*. 2009; 4:e5908.
- 130. Baum J, Papenfuss AT, Mair GR, Janse CJ, Vlachou D, Waters AP, et al. Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37:3788-3798.

- 131. Dang Y, Yang Q, Xue Z, Liu Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryot Cell*. 2011; 10:1148-1155.
- 132. Bougdour A, Tardieux I, Hakimi M-A. *Toxoplasma* exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewires the host genome expression. *Cell Microbiol*. 2014; 16:334-343.
- 133. Bhatt TK, Khan S, Dwivedi VP, Banday MM, Sharma A, Chandele A, et al. Malaria parasite tyrosyl-tRNA synthetase secretion triggers pro-inflammatory responses. *Nat Commun*. 2011; 2:530.
- 134. Shalak V, Kaminska M, Mitnacht-Kraus R, Vandenabeele P, Clauss M, Mirande M. The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. *J Biol Chem*. 2001; 276:23769-23776.
- 135. Kao J, Ryan J, Brett G, Chen J, Shen H, Fan YG, et al. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem*. 1992; 267:20239-20247.
- 136. Tandle AT, Calvani M, Uranchimeg B, Zahavi D, Melillo G, Libutti SK. Endothelial monocyte activating polypeptide-II modulates endothelial cell responses by degrading hypoxia-inducible factor-1alpha through interaction with PSMA7, a component of the proteasome. *Exp Cell Res.* 2009; 315:1850-1859.
- 137. Berger AC, Alexander HR, Tang G, Wu PS, Hewitt SM, Turner E, et al. Endothelial monocyte activating polypeptide II induces endothelial cell apoptosis and may inhibit tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 2000; 60:70-80.
- 138. Gnant MF, Berger AC, Huang J, Puhlmann M, Wu PC, Merino MJ, et al. Sensitization of tumor necrosis factor alpha-resistant human melanoma by tumor-specific in vivo transfer of the gene encoding endothelial monocyte-activating polypeptide II using recombinant vaccinia virus. *Cancer Res.* 1999; 59:4668-4674.
- 139. Mirande M. Multi-Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes. The Aminoacyl-tRNA Synthetases. 1 edition. Georgetown, Tex., U.S.A.: Eurekah.Com Inc; 2005; p. 298-308.
- 140. Ibba M, Söll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. Annu Rev Biochem. 2000; 69:617-650.
- 141. Schimmel P, Söll D. The World of Aminoacyl-tRNASynthetases. The Aminoacyl-tRNA Synthetases. 1 edition. Georgetown, Tex., U.S.A.: Eurekah.Com Inc; 2005; p. 1-2.
- 142. Szymański M, Deniziak M, Barciszewski J. The new aspects of aminoacyl-tRNA synthetases. *Acta Biochim Pol.* 2000; 47:821-834.
- 143. Sankaranarayanan R, Moras D. The fidelity of the translation of the genetic code. *Acta Biochim Pol.* 2001; 48:323-335.
- 144. Ling J, So BR, Yadavalli SS, Roy H, Shoji S, Fredrick K, et al. Resampling and editing of mischarged tRNA prior to translation elongation. *Mol Cell*. 2009; 33:654-660.
- 145. Cusack S. Aminoacyl-tRNA synthetases. Curr Opin Struct Biol. 1997; 7:881-889.
- 146. Cooper GM. La cellule. Une approche moléculaire. De Boeck Université; 1999; 710 p.

- 147. Mascarenhas AP, An S, Rosen AE, Martinis SA, Musier-Forsyth K. Fidelity mechanisms of the aminoacyl-tRNA synthetases. In: Köhrer C, RajBhandary UL, éditeurs. Protein Engineering. Springer Berlin Heidelberg; 2009; p. 155-203.
- 148. Rogers HH, Griffiths-Jones S. tRNA anticodon shifts in eukaryotic genomes. *RNA N Y N*. 2014; 20:269-281.
- 149. Martinis SA, Boniecki MT. The balance between pre- and post-transfer editing in tRNA synthetases. *FEBS Lett*. 2010; 584:455-459.
- 150. Perona JJ, Hadd A. Structural diversity and protein engineering of the aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry (Mosc)*. 2012; 51:8705-8729.
- 151. Stathopoulos C, Li T, Longman R, Vothknecht UC, Becker HD, Ibba M, et al. One polypeptide with two aminoacyl-tRNA synthetase activities. *Science*. 2000; 287:479-482.
- 152. Duchêne A-M, Pujol C, Maréchal-Drouard L. Import of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases into mitochondria. *Curr Genet*. 2009; 55:1-18.
- 153. Brindefalk B, Viklund J, Larsson D, Thollesson M, Andersson SGE. Origin and evolution of the mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Biol Evol*. 2007; 24:743-756.
- 154. Sissler M, Pütz J, Fasiolo F, Florentz C. Mitochondrial Aminoacyl-tRNA Synthetases. The Aminoacyl-tRNA Synthetases. 1 edition. Georgetown, Tex., U.S.A.: Eurekah.Com Inc; 2005; p. 271-284.
- 155. Shiba K, Schimmel P, Motegi H, Noda T. Human glycyl-tRNA synthetase. Wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation. *J Biol Chem.* 1994; 269:30049-30055.
- 156. Tolkunova E, Park H, Xia J, King MP, Davidson E. The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. *J Biol Chem*. 2000; 275:35063-35069.
- 157. Rettig J, Wang Y, Schneider A, Ochsenreiter T. Dual targeting of isoleucyl-tRNA synthetase in Trypanosoma brucei is mediated through alternative trans-splicing. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40:1299-1306.
- 158. Ruan B, Ahel I, Ambrogelly A, Becker HD, Bunjun S, Feng L, et al. Genomics and the evolution of aminoacyl-tRNA synthesis. *Acta Biochim Pol*. 2001; 48:313-321.
- 159. Eriani G, Cavarelli J, Martin F, Ador L, Rees B, Thierry JC, et al. The class II aminoacyltRNA synthetases and their active site: evolutionary conservation of an ATP binding site. *J Mol Evol*. 1995; 40:499-508.
- Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J, Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*. 1990; 347:203-206.
- 161. Yadavalli SS, Ibba M. Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis its role in translational fidelity. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2012; 86:1-43.

- 162. Datt M, Sharma A. Conformational landscapes for KMSKS loop in tyrosyl-tRNA synthetases. *J Struct Funct Genomics*. 2014; 15:45-61.
- 163. Kleiman L, Cen S. The tRNALys packaging complex in HIV-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36:1776-1786.
- 164. O'Donoghue P, Luthey-Schulten Z. On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2003; 67:550-573.
- 165. Francklyn C, Musier-Forsyth K, Martinis SA. Aminoacyl-tRNA synthetases in biology and disease: new evidence for structural and functional diversity in an ancient family of enzymes. *RNA N Y N*. 1997; 3:954-960.
- 166. Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I. Prospects for Aminoacyl-tRNA Synthetase Inhibitors as New Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:4821-4833.
- 167. Ibba M, Francklyn C, Cusack S. The Aminoacyl-tRNA Synthetases. 1 edition. Georgetown, Tex., U.S.A.: Eurekah.Com Inc; 2005; 420 p.
- 168. Guo M, Schimmel P, Yang X-L. Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions. *FEBS Lett*. 2010; 584:434-442.
- 169. Mahapatra A, Srinivasan G, Richter KB, Meyer A, Lienard T, Zhang JK, et al. Class I and class II lysyl-tRNA synthetase mutants and the genetic encoding of pyrrolysine in *Methanosarcina* spp. *Mol Microbiol*. 2007; 64:1306-1318.
- 170. Smirnova EV, Lakunina VA, Tarassov I, Krasheninnikov IA, Kamenski PA. Noncanonical functions of aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochem Biokhimiia*. 2012; 77:15-25.
- 171. Brown MV, Reader JS, Tzima E. Mammalian aminoacyl-tRNA synthetases: cell signaling functions of the protein translation machinery. *Vascul Pharmacol.* 2010; 52:21-26.
- 172. Huberts DHEW, van der Klei IJ. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803:520-525.
- 173. Jeffery CJ. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet TIG*. 2003; 19:415-417.
- 174. Blanquet S, Plateau P, Onesti S. Class II Lysyl-tRNA Synthetases. The Aminoacyl-tRNA Synthetases. Eurekah.Com Inc; 2005; p. 227-240.
- Ofir-Birin Y, Fang P, Bennett SP, Zhang H-M, Wang J, Rachmin I, et al. Structural switch of lysyl-tRNA synthetase between translation and transcription. *Mol Cell*. 2013; 49:30-42.
- 176. Varshavsky A. Diadenosine 5', 5"'-P1, P4-tetraphosphate: a pleiotropically acting alarmone? *Cell*. 1983; 34:711-712.
- 177. Sampath P, Mazumder B, Seshadri V, Gerber CA, Chavatte L, Kinter M, et al. Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell*. 2004; 119:195-208.
- 178. Arif A, Chatterjee P, Moodt RA, Fox PL. Heterotrimeric GAIT complex drives transcriptselective translation inhibition in murine macrophages. *Mol Cell Biol*. 2012; 32:5046-5055.

- 179. Ivakhno SS, Kornelyuk AI. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis. *Exp Oncol.* 2004; 26:250-255.
- 180. Ewalt KL, Schimmel P. Activation of angiogenic signaling pathways by two human tRNA synthetases. *Biochemistry (Mosc)*. 2002; 41:13344-13349.
- 181. Wakasugi K, Schimmel P. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. *J Biol Chem*. 1999; 274:23155-23159.
- 182. Wakasugi K, Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyltRNA synthetase. *Science*. 1999; 284:147-151.
- 183. Wakasugi K, Slike BM, Hood J, Ewalt KL, Cheresh DA, Schimmel P. Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem*. 2002; 277:20124-20126.
- 184. Wakasugi K, Slike BM, Hood J, Otani A, Ewalt KL, Friedlander M, et al. A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:173-177.
- 185. Zeng R, Chen Y, Zeng Z, Liu X, Liu R, Qiang O, et al. Inhibition of mini-TyrRS-induced angiogenesis response in endothelial cells by VE-cadherin-dependent mini-TrpRS. *Heart Vessels*. 2012; 27:193-201.
- 186. Lee SW, Cho BH, Park SG, Kim S. Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J Cell Sci*. 2004; 117:3725-3734.
- 187. Van Horssen R, Eggermont AMM, ten Hagen TLM. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho)physiological processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17:339-348.
- Ko YG, Park H, Kim T, Lee JW, Park SG, Seol W, et al. A cofactor of tRNA synthetase, p43, is secreted to up-regulate proinflammatory genes. *J Biol Chem*. 2001; 276:23028-23033.
- 189. Chang SY, Park SG, Kim S, Kang C-Y. Interaction of the C-terminal domain of p43 and the alpha subunit of ATP synthase. Its functional implication in endothelial cell proliferation. *J Biol Chem.* 2002; 277:8388-8394.
- 190. Lee YS, Han JM, Son SH, Choi JW, Jeon EJ, Bae S-C, et al. AIMP1/p43 downregulates TGF-beta signaling via stabilization of smurf2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 371:395-400.
- 191. Quevillon S, Agou F, Robinson JC, Mirande M. The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyteactivating polypeptide II cytokine. *J Biol Chem*. 1997; 272:32573-32579.
- 192. Morales AJ, Swairjo MA, Schimmel P. Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus*. *EMBO J*. 1999; 18:3475-3483.
- 193. Park SG, Shin H, Shin YK, Lee Y, Choi E-C, Park B-J, et al. The novel cytokine p43 stimulates dermal fibroblast proliferation and wound repair. *Am J Pathol.* 2005; 166:387-398.

- 194. Park SG, Kang Y-S, Ahn YH, Lee SH, Kim K-R, Kim K-W, et al. Dose-dependent biphasic activity of tRNA synthetase-associating factor, p43, in angiogenesis. *J Biol Chem*. 2002; 277:45243-45248.
- 195. Park SG, Kang YS, Kim JY, Lee CS, Ko YG, Lee WJ, et al. Hormonal activity of AIMP1/p43 for glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:14913-14918.
- 196. Han JM, Park SG, Liu B, Park B-J, Kim JY, Jin CH, et al. Aminoacyl-tRNA synthetaseinteracting multifunctional protein 1/p43 controls endoplasmic reticulum retention of heat shock protein gp96: its pathological implications in lupus-like autoimmune diseases. *Am J Pathol.* 2007; 170:2042-2054.
- 197. Zhu X, Liu Y, Yin Y, Shao A, Zhang B, Kim S, et al. MSC p43 required for axonal development in motor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:15944-15949.
- 198. Kim MJ, Park B-J, Kang Y-S, Kim HJ, Park J-H, Kang JW, et al. Downregulation of FUSEbinding protein and c-myc by tRNA synthetase cofactor p38 is required for lung cell differentiation. *Nat Genet*. 2003; 34:330-336.
- 199. Ko HS, von Coelln R, Sriram SR, Kim SW, Chung KKK, Pletnikova O, et al. Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2005; 25:7968-7978.
- 200. Han JM, Park B-J, Park SG, Oh YS, Choi SJ, Lee SW, et al. AIMP2/p38, the scaffold for the multi-tRNA synthetase complex, responds to genotoxic stresses via p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:11206-11211.
- Park B-J, Kang JW, Lee SW, Choi S-J, Shin YK, Ahn YH, et al. The haploinsufficient tumor suppressor p18 upregulates p53 via interactions with ATM/ATR. *Cell*. 2005; 120:209-221.
- 202. Yao P, Fox PL. Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. *EMBO Mol Med*. 2013; 5:332-343.
- 203. Bhatt TK, Kapil C, Khan S, Jairajpuri MA, Sharma V, Santoni D, et al. A genomic glimpse of aminoacyl-tRNA synthetases in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*. 2009; 10:644.
- 204. Mailu BM, Ramasamay G, Mudeppa DG, Li L, Lindner SE, Peterson MJ, et al. A nondiscriminating glutamyl-tRNA synthetase in the plasmodium apicoplast: the first enzyme in an indirect aminoacylation pathway. *J Biol Chem*. 2013; 288:32539-32552.
- 205. Pino P, Aeby E, Foth BJ, Sheiner L, Soldati T, Schneider A, et al. Mitochondrial translation in absence of local tRNA aminoacylation and methionyl tRNA Met formylation in Apicomplexa. *Mol Microbiol*. 2010; 76:706-718.
- 206. Jackson KE, Pham JS, Kwek M, De Silva NS, Allen SM, Goodman CD, et al. Dual targeting of aminoacyl-tRNA synthetases to the apicoplast and cytosol in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*. 2012; 42:177-186.
- 207. Jackson KE, Habib S, Frugier M, Hoen R, Khan S, Pham JS, et al. Protein translation in *Plasmodium* parasites. *Trends Parasitol*. 2011; 27:467-476.

- 208. Frugier M, Bour T, Ayach M, Santos MAS, Rudinger-Thirion J, Théobald-Dietrich A, et al. Low Complexity Regions behave as tRNA sponges to help co-translational folding of plasmodial proteins. *FEBS Lett.* 2010; 584:448-454.
- 209. Pedroni MJ, Luu TNK, Lau AOT. Babesia bovis: a bipartite signal directs the glutamyltRNA synthetase to the apicoplast. *Exp Parasitol*. 2012; 131:261-266.
- 210. Pham JS, Sakaguchi R, Yeoh LM, De Silva NS, McFadden GI, Hou Y-M, et al. A dualtargeted aminoacyl-tRNA synthetase in *Plasmodium falciparum* charges cytosolic and apicoplast tRNACys. *Biochem J*. 2014; 458:513-523.
- 211. Hausmann CD, Ibba M. Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32:705-721.
- 212. Praetorius-Ibba M, Hausmann CD, Paras M, Rogers TE, Ibba M. Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem*. 2007; 282:3680-3687.
- 213. Hausmann CD, Ibba M. Structural and functional mapping of the archaeal multiaminoacyl-tRNA synthetase complex. *FEBS Lett*. 2008; 582:2178-2182.
- 214. Godinic-Mikulcic V, Jaric J, Hausmann CD, Ibba M, Weygand-Durasevic I. An archaeal tRNA-synthetase complex that enhances aminoacylation under extreme conditions. *J Biol Chem.* 2011; 286:3396-3404.
- 215. Negrutskii BS, Shalak VF, Kerjan P, El'skaya AV, Mirande M. Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1alpha in the complex with EF-1H. *J Biol Chem*. 1999; 274:4545-4550.
- Kellermann O, Tonetti H, Brevet A, Mirande M, Pailliez JP, Waller JP. Macromolecular complexes from sheep and rabbit containing seven aminoacyl-tRNA synthetases. I. Species specificity of the polypeptide composition. J Biol Chem. 1982; 257:11041-11048.
- 217. Mirande M, Le Corre D, Waller JP. A complex from cultured Chinese hamster ovary cells containing nine aminoacyl-tRNA synthetases. Thermolabile leucyl-tRNA synthetase from the tsH1 mutant cell line is an integral component of this complex. *Eur J Biochem FEBS*. 1985; 147:281-289.
- 218. Cerini C, Kerjan P, Astier M, Gratecos D, Mirande M, Sémériva M. A component of the multisynthetase complex is a multifunctional aminoacyl-tRNA synthetase. *EMBO J*. 1991; 10:4267-4277.
- 219. Kerjan P, Cerini C, Sémériva M, Mirande M. The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from *Drosophila* to mammals. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1199:293-297.
- 220. Havrylenko S, Legouis R, Negrutskii B, Mirande M. *Caenorhabditis elegans* evolves a new architecture for the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J Biol Chem*. 2011; 286:28476-28487.
- 221. Simos G, Segref A, Fasiolo F, Hellmuth K, Shevchenko A, Mann M, et al. The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J*. 1996; 15:5437-5448.

- 222. Kim JY, Kang Y-S, Lee J-W, Kim HJ, Ahn YH, Park H, et al. p38 is essential for the assembly and stability of macromolecular tRNA synthetase complex: implications for its physiological significance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:7912-7916.
- 223. Cestari I, Kalidas S, Monnerat S, Anupama A, Phillips MA, Stuart K. A multiple aminoacyl-tRNA synthetase complex that enhances tRNA-aminoacylation in African trypanosomes. *Mol Cell Biol*. 2013; 33:4872-4888.
- 224. Johnson DL, Yang DC. Stoichiometry and composition of an aminoacyl-tRNA synthetase complex from rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78:4059-4062.
- 225. Dias J, Renault L, Pérez J, Mirande M. Small-angle X-ray solution scattering study of the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals an elongated and multi-armed particle. *J Biol Chem*. 2013; 288:23979-23989.
- 226. Filonenko VV, Deutscher MP. Evidence for similar structural organization of the multienzyme aminoacyl-tRNA synthetase complex *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem*. 1994; 269:17375-17378.
- 227. Norcum MT. Isolation and electron microscopic characterization of the high molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complex from murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem.* 1989; 264:15043-15051.
- 228. Norcum MT. Structural analysis of the high molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complex. Effects of neutral salts and detergents. *J Biol Chem.* 1991; 266:15398-15405.
- 229. Norcum MT, Warrington JA. Structural analysis of the multienzyme aminoacyl-tRNA synthetase complex: a three-domain model based on reversible chemical crosslinking. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 1998; 7:79-87.
- 230. Norcum MT. Ultrastructure of the eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex derived from two dimensional averaging and classification of negatively stained electron microscopic images. *FEBS Lett*. 1999; 447:217-222.
- 231. Norcum MT, Boisset N. Three-dimensional architecture of the eukaryotic multisynthetase complex determined from negatively stained and cryoelectron micrographs. *FEBS Lett.* 2002; 512:298-302.
- 232. Norcum MT, Warrington JA. The cytokine portion of p43 occupies a central position within the eukaryotic multisynthetase complex. *J Biol Chem*. 2000; 275:17921-17924.
- 233. Kaminska M, Havrylenko S, Decottignies P, Gillet S, Le Maréchal P, Negrutskii B, et al. Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J Biol Chem.* 2009; 284:6053-6060.
- 234. Norcum MT, Dignam JD. Immunoelectron microscopic localization of glutamyl-/ prolyltRNA synthetase within the eukaryotic multisynthetase complex. *J Biol Chem*. 1999; 274:12205-12208.
- 235. Wolfe CL, Warrington JA, Davis S, Green S, Norcum MT. Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2003; 12:2282-2290.

- 236. Wolfe CL, Warrington JA, Treadwell L, Norcum MT. A three-dimensional working model of the multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases based on electron microscopic placements of tRNA and proteins. *J Biol Chem*. 2005; 280:38870-38878.
- 237. Han JM, Kim JY, Kim S. Molecular network and functional implications of macromolecular tRNA synthetase complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 303:985-993.
- 238. Koehler C, Round A, Simader H, Suck D, Svergun D. Quaternary structure of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex in solution and its compaction upon binding of tRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:667-676.
- 239. Rho SB, Kim MJ, Lee JS, Seol W, Motegi H, Kim S, et al. Genetic dissection of proteinprotein interactions in multi-tRNA synthetase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:4488-4493.
- 240. Quevillon S, Robinson JC, Berthonneau E, Siatecka M, Mirande M. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J Mol Biol*. 1999; 285:183-195.
- 241. Karanasios E, Simader H, Panayotou G, Suck D, Simos G. Molecular determinants of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly. *J Mol Biol*. 2007; 374:1077-1090.
- 242. Kim JE, Kim KH, Lee SW, Seol W, Shiba K, Kim S. An elongation factor-associating domain is inserted into human cysteinyl-tRNA synthetase by alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:2866-2872.
- 243. Kwon NH, Kang T, Lee JY, Kim HH, Kim HR, Hong J, et al. Dual role of methionyl-tRNA synthetase in the regulation of translation and tumor suppressor activity of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:19635-19640.
- 244. Kim K-J, Park MC, Choi SJ, Oh YS, Choi E-C, Cho HJ, et al. Determination of threedimensional structure and residues of the novel tumor suppressor AIMP3/p18 required for the interaction with ATM. *J Biol Chem*. 2008; 283:14032-14040.
- 245. Simader H, Hothorn M, Köhler C, Basquin J, Simos G, Suck D. Structural basis of yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex formation revealed by crystal structures of two binary sub-complexes. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34:3968-3979.
- 246. Ahn HC, Kim S, Lee BJ. Solution structure and p43 binding of the p38 leucine zipper motif: coiled-coil interactions mediate the association between p38 and p43. *FEBS Lett.* 2003; 542:119-124.
- 247. Ray PS, Sullivan JC, Jia J, Francis J, Finnerty JR, Fox PL. Evolution of function of a fused metazoan tRNA synthetase. *Mol Biol Evol*. 2011; 28:437-447.
- 248. Cahuzac B, Berthonneau E, Birlirakis N, Guittet E, Mirande M. A recurrent RNA-binding domain is appended to eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases. *EMBO J*. 2000; 19:445-452.
- 249. Rho SB, Lee JS, Jeong EJ, Kim KS, Kim YG, Kim S. A multifunctional repeated motif is present in human bifunctional tRNA synthetase. *J Biol Chem*. 1998; 273:11267-11273.

- 250. Mukhopadhyay R, Jia J, Arif A, Ray PS, Fox PL. The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends Biochem Sci.* 2009; 34:324-331.
- 251. Robinson JC, Kerjan P, Mirande M. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J Mol Biol.* 2000; 304:983-994.
- 252. Fang P, Zhang H-M, Shapiro R, Marshall AG, Schimmel P, Yang X-L, et al. Structural context for mobilization of a human tRNA synthetase from its cytoplasmic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:8239-8244.
- 253. Ray PS, Arif A, Fox PL. Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32:158-164.
- 254. Karanasios E, Boleti H, Simos G. Incorporation of the Arc1p tRNA-binding domain to the catalytic core of MetRS can functionally replace the yeast Arc1p-MetRS complex. *J Mol Biol*. 2008; 381:763-771.
- 255. Graindorge J-S, Senger B, Tritch D, Simos G, Fasiolo F. Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry (Mosc)*. 2005; 44:1344-1352.
- 256. Park SG, Jung KH, Lee JS, Jo YJ, Motegi H, Kim S, et al. Precursor of pro-apoptotic cytokine modulates aminoacylation activity of tRNA synthetase. *J Biol Chem*. 1999; 274:16673-16676.
- 257. Simos G, Sauer A, Fasiolo F, Hurt EC. A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell*. 1998; 1:235-242.
- 258. Deinert K, Fasiolo F, Hurt EC, Simos G. Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *J Biol Chem*. 2001; 276:6000-6008.
- 259. Ku MJ, Lee SY. Contributions of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-3 to mammalian translation initiation. *Amino Acids*. 2013; 44:1241-1245.
- 260. Kang T, Kwon NH, Lee JY, Park MC, Kang E, Kim HH, et al. AIMP3/p18 controls translational initiation by mediating the delivery of charged initiator tRNA to initiation complex. *J Mol Biol*. 2012; 423:475-481.
- 261. Hausmann CD, Praetorius-Ibba M, Ibba M. An aminoacyl-tRNA synthetase:elongation factor complex for substrate channeling in archaeal translation. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:6094-6102.
- 262. Kaminska M, Havrylenko S, Decottignies P, Le Maréchal P, Negrutskii B, Mirande M. Dynamic organization of aminoacyl-tRNA synthetase complexes in the cytoplasm of human cells. *J Biol Chem*. 2009; 284:13746-13754.
- 263. Arif A, Jia J, Mukhopadhyay R, Willard B, Kinter M, Fox PL. Two-site phosphorylation of EPRS coordinates multimodal regulation of noncanonical translational control activity. *Mol Cell*. 2009; 35:164-180.
- 264. Yannay-Cohen N, Carmi-Levy I, Kay G, Yang CM, Han JM, Kemeny DM, et al. LysRS serves as a key signaling molecule in the immune response by regulating gene expression. *Mol Cell*. 2009; 34:603-611.

- 265. Ibba M, Francklyn C. Turning tRNA upside down: When aminoacylation is not a prerequisite to protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:7493-7494.
- 266. Golinelli-Cohen M-P, Mirande M. Arc1p is required for cytoplasmic confinement of synthetases and tRNA. *Mol Cell Biochem*. 2007; 300:47-59.
- 267. Khan S, Sharma A, Belrhali H, Yogavel M, Sharma A. Structural basis of malaria parasite lysyl-tRNA synthetase inhibition by cladosporin. *J Struct Funct Genomics*. 2014; 15:63-71.
- 268. Habibi D, Ogloff N, Jalili RB, Yost A, Weng AP, Ghahary A, et al. Borrelidin, a small molecule nitrile-containing macrolide inhibitor of threonyl-tRNA synthetase, is a potent inducer of apoptosis in acute lymphoblastic leukemia. *Invest New Drugs*. 2012; 30:1361-1370.
- 269. Schimmel P, Tao J, Hill J. Aminoacyl tRNA synthetases as targets for new antiinfectives. *FASEB J.* 1998; 12:1599-609.
- 270. Gadakh B, Van Aerschot A. Aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as antimicrobial agents: a patent review from 2006 till present. *Expert Opin Ther Pat.* 2012; 22:1453-1465.
- 271. Chopra I, Hesse L, O'Neill AJ. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *J Appl Microbiol*. 2002; 92 Suppl:4S-15S.
- 272. Hughes J, Mellows G. Inhibition of isoleucyl-transfer ribonucleic acid synthetase in *Escherichia coli* by pseudomonic acid. *Biochem J*. 1978; 176:305-318.
- 273. Nakama T, Nureki O, Yokoyama S. Structural basis for the recognition of isoleucyladenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem*. 2001; 276:47387-47393.
- 274. Hoen R, Novoa EM, López A, Camacho N, Cubells L, Vieira P, et al. Selective inhibition of an apicoplastic aminoacyl-tRNA synthetase from *Plasmodium falciparum*. *Chembiochem Eur J Chem Biol*. 2013; 14:499-509.
- 275. Tao J, Wendler P, Connelly G, Lim A, Zhang J, King M, et al. Drug target validation: lethal infection blocked by inducible peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:783-786.
- 276. Kanamaru T, Nakano Y, Toyoda Y, Miyagawa KI, Tada M, Kaisho T, et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of TAK-083, an agent for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45:2455-2459.
- 277. Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I. Anti-staphylococcal activity of indolmycin, a potential topical agent for control of staphylococcal infections. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54:549-552.
- 278. Seiradake E, Mao W, Hernandez V, Baker SJ, Plattner JJ, Alley MRK, et al. Crystal structures of the human and fungal cytosolic Leucyl-tRNA synthetase editing domains: A structural basis for the rational design of antifungal benzoxaboroles. J Mol Biol. 2009; 390:196-207.

- 279. Yu Z, Vodanovic-Jankovic S, Ledeboer N, Huang S-X, Rajski SR, Kron M, et al. Tirandamycins from *Streptomyces* sp. 17944 inhibiting the parasite *Brugia malayi* asparagine tRNA synthetase. *Org Lett*. 2011; 13:2034-2037.
- 280. Sukuru SCK, Crepin T, Milev Y, Marsh LC, Hill JB, Anderson RJ, et al. Discovering new classes of *Brugia malayi* asparaginyl-tRNA synthetase inhibitors and relating specificity to conformational change. *J Comput Aided Mol Des*. 2006; 20:159-178.
- 281. Zhang Y-H, Xue M-Q, Bai Y-C, Yuan H-H, Zhao H-L, Lan M-B. 3,5-Dicaffeoylquinic acid isolated from Artemisia argyi and its ester derivatives exert anti-leucyl-tRNA synthetase of Giardia lamblia (GILeuRS) and potential anti-giardial effects. Fitoterapia. 2012; 83:1281-1285.
- 282. Ogungbe IV, Setzer WN. In-silico Leishmania target selectivity of antiparasitic terpenoids. *Mol Basel Switz*. 2013; 18:7761-7847.
- 283. Kalidas S, Cestari I, Monnerat S, Li Q, Regmi S, Hasle N, et al. Genetic validation of aminoacyl-tRNA synthetases as drug targets in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. 2014; 13:504-516.
- 284. Dahl EL, Rosenthal PJ. Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. *Trends Parasitol*. 2008; 24:279-284.
- 285. Dahl EL, Shock JL, Shenai BR, Gut J, DeRisi JL, Rosenthal PJ. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50:3124-3131.
- 286. Istvan ES, Dharia NV, Bopp SE, Gluzman I, Winzeler EA, Goldberg DE. Validation of isoleucine utilization targets in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:1627-1632.
- 287. Hoepfner D, McNamara CW, Lim CS, Studer C, Riedl R, Aust T, et al. Selective and specific inhibition of the *Plasmodium falciparum* lysyl-tRNA synthetase by the fungal secondary metabolite cladosporin. *Cell Host Microbe*. 2012; 11:654-663.
- 288. Plouffe D, Brinker A, McNamara C, Henson K, Kato N, Kuhen K, et al. *In silico* activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:9059-9064.
- 289. Bour T, Akaddar A, Lorber B, Blais S, Balg C, Candolfi E, et al. Plasmodial aspartyl-tRNA synthetases and peculiarities in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2009; 284:18893-18903.
- 290. Khan S, Garg A, Camacho N, Van Rooyen J, Kumar Pole A, Belrhali H, et al. Structural analysis of malaria-parasite lysyl-tRNA synthetase provides a platform for drug development. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2013; 69:785-795.
- 291. Van Rooyen JM, Murat J-B, Hammoudi P-M, Kieffer-Jaquinod S, Coute Y, Sharma A, et al. Assembly of the novel five-component apicomplexan multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex is driven by the hybrid scaffold protein Tg-p43. *PLoS ONE*. 2014; 9:e89487.

- 292. Robert-Gangneux F, Murat J-B, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Gangneux J-P, Pelloux H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends Parasitol*. 2011; 27:530-536.
- 293. Murat J-B, L'Ollivier C, Fricker Hidalgo H, Franck J, Pelloux H, Piarroux R. Evaluation of the new Elecsys[®] Toxo IgG Avidity assay for toxoplasmosis and new insights into the interpretation of avidity results. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2012; 19:1838-1843.
- 294. Murat J-B, Dard C, Fricker Hidalgo H, Dardé M-L, Brenier-Pinchart M-P, Pelloux H. Comparison of the Vidas system and two recent fully automated assays for diagnosis and follow-up of toxoplasmosis in pregnant women and newborns. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2013; 20:1203-1212.

Annexes

Au cours de ma période d'Assistanat Hospitalier Universitaire (concomitante de mes années de Thèse), le versant hospitalier et translationnel de mes activités de recherche m'a amené à publier plusieurs articles, dont quatre portant sur le diagnostic de la toxoplasmose ; les premières pages de ces articles sont reproduites ci-après.

En 2011, une collaboration de notre équipe du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble et de celle du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rennes nous a conduits à publier un article de synthèse discutant le rôle du placenta et du traitement materne, ainsi que l'intérêt du traitement et de l'examen parasitaire du placenta lors de la toxoplasmose chez la femme enceinte (292).

En 2012, j'ai signé en premier auteur l'évaluation bicentrique (Grenoble et Marseille) du nouveau test d'avidité des IgG anti-toxoplasmiques de la gamme Elecsys[®] (Roche). Cette étude avait d'une part permis la mise sur le marché de la trousse, et d'autre part mis en évidence des potentialités novatrices quant à l'utilisation des valeurs basses fournies par certains tests d'avidité (293). L'année suivante, une évaluation comparative de la gamme de tests VIDAS[®] (bioMérieux) nous a permis de réactualiser les performances de ces trousses diagnostiques, en montrant qu'elles gardent leur intérêt malgré l'apparition ces dernières années de tests concurrents hautement automatisés et performants (294).

Enfin, l'expérience acquise dans le domaine du diagnostic de la toxoplasmose nous a conduits à être sollicités pour rédiger un article de synthèse sur cette thématique, publié en 2013 (27).



The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis?

Florence Robert-Gangneux^{1,2}, Jean-Benjamin Murat^{3,4}, Hélène Fricker-Hidalgo^{3,4}, Marie-Pierre Brenier-Pinchart^{3,4}, Jean-Pierre Gangneux^{1,2} and Hervé Pelloux^{3,4}

¹ Laboratoire de Parasitologie–Mycologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Rennes, Rennes, France

² EA4427-SERAIC, IRSET (Institut de Recherche en Santé Environnement Travail), Université Rennes 1, Rennes, France

³Laboratoire de Parasitologie–Mycologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble, Grenoble, France

⁴ Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, UMR 5163 CNRS-UJF, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Systemic infections, such as toxoplasmosis, acquired during pregnancy can lead to placental infection and have profound effects on the mother-to-child relationship and the success of pregnancy. Placental permeability to *Toxoplasma gondii* is a main parameter that determines parasite transmission to the foetus, and the use of antibiotics to decrease placental parasite load and prevent congenital toxoplasmosis has been suggested for decades. Although parasitological examination of the placenta at birth is commonly used to diagnose neonatal congenital toxoplasmosis, this approach can be controversial. Here we argue in favour of placental examination for both diagnostic and epidemiological purposes.

The consequences of *Toxoplasma* infection during pregnancy

Infection with the intracellular protozoan parasite Toxoplasma gondii is one of the most frequent worldwide parasitic infections. Its widespread distribution in warm-blooded animals, as an intermediate host for its asexual replicating stages, offers a range of opportunities for human infection through undercooked meat or raw vegetables contaminated with oocysts spread by definitive hosts, i.e. cats or other Felidae in some parts of the world. Infection is usually asymptomatic when it occurs in an immunocompetent subject. However, the pathophysiology of toxoplasmosis in humans is far more complex when primary infection is acquired during pregnancy; it then results in congenital infection of the foetus in ${\sim}30\%$ of cases, which can result in brain or eye damage, with the degree of severity dependent on gestational age and the use, or not, of preventive protocols.

The placenta prevents the passage of infectious agents towards the foetal compartment more effectively at the beginning of pregnancy than at the end. It is a key tissue in the mother-to-foetus relationship, not only because of its trophic role but also because it provides the tolerant immune microenvironment necessary for gestation [1]. During primary infection, parasites cross the intestinal barrier and invade monocyte cells in contact with the lamina propria, which allow them to disseminate through the blood flow towards virtually all organs, including placenta [2]. Infection of the placental tissue can result in a placentitis and can lead to subsequent infection of trophoblast cells, which are at the interface with the foetal compartment and may let the parasites proceed [3]. This important process has two main consequences: (i) placental infection may adversely affect this tenuous equilibrium between maternal and foetal compartments; and (ii) the placenta is directly involved in parasite transmission to the foetus, making it a main therapeutic and diagnostic target. This opinion paper focuses on these different aspects and places emphasis on the recovery of the placenta to diagnose congenital toxoplasmosis.

What is the role of the placenta in *T. gondii* transmission and pathophysiology?

T. gondii can invade and multiply within trophoblast cells [3], but the mechanisms by which this otherwise effective barrier can fail to protect the foetus, allowing some pathogens to enter, remain unclear although some hypotheses have been suggested. Whereas an efficient immune response against Toxoplasma requires a T helper (Th)-1 cytokine pathway response involving interferon γ (IFN- γ) [4.5], the placental microenvironment is rich in interleukin 10 (IL-10) and promotes a Th-2 immune response to ensure maternal-foetal tolerance [1], which could facilitate infection of placental tissue [6]. The interplay between immune effectors of successful pregnancy and of anti-infectious response has been extensively described elsewhere [1,7]. The pivotal cytokine in this complex process is IFN- γ , as shown in a mouse model where IFN-y synthesis following T. gondii infection led to abortion in pregnant wild type mice, but not in pregnant IFN-y knockout (KO) mice [8]. Such a deleterious effect of IFN- γ is also described in preeclampsia in humans [9]. Thus, a delicate balance exists between the anti-T. gondii effector functions of IFN-y and its abortogenic effects, and both maternal and foetal environments contribute to this complex equilibrium (Figure 1) [10]. However, the role of IFN- γ could be more ambiguous, as it was shown in vitro that it upregulates the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 adhesin at the trophoblast cell surface and thereby contributes to enhanced adhesion of infected monocytes [11]. In addition, ICAM-1 is induced during placentitis [12] and could directly support transepithelial migration of the

1471-4922/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.pt.2011.09.005 Trends in Parasitology, December 2011, Vol. 27, No. 12

Corresponding author: Robert-Gangneux, F. (florence.robert-gangneux@univ-rennes1.fr)



Evaluation of the New Elecsys Toxo IgG Avidity Assay for Toxoplasmosis and New Insights into the Interpretation of Avidity Results

Jean-Benjamin Murat,^{a,b} Coralie L'Ollivier,^{c,d} Hélène Fricker Hidalgo,^a Jacqueline Franck,^c Hervé Pelloux,^{a,b} and Renaud Piarroux^{c,d}

Laboratory of Parasitology and Mycology, Grenoble University Hospital, Grenoble, France^a; UMR 5163 CNRS—Joseph Fourier University Grenoble I, Grenoble, France^b; Laboratory of Parasitology and Mycology, La Timone University Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM), Marseille, France^c; and UMR MD3, Aix-Marseille University, Marseille, France^d

Detection and treatment of acute toxoplasmosis during pregnancy can avoid severe disease of the fetus. In this context, assessment of anti-*Toxoplasma* IgG avidity has been shown to exclude recent infection. The Elecsys Toxo IgG and IgM assays (Roche Diagnostics) have been validated for screening pregnant women and a new assay, Elecsys Toxo IgG Avidity, was recently developed. Our aims were to investigate the performance characteristics of this new avidity assay and explore whether additional information can be provided by avidity assays. The Elecsys assay was compared with the Vidas (bioMérieux) and Architect (Abbott) Avidity assays using two sets of serum samples (n = 291 and n = 255). The rate of general agreement between the Elecsys and Vidas assays was 74%, and that between the Elecsys and Architect assays was 83%. For 11% of the serum samples, avidity was high with the Vidas assay and within the gray zone with the Elecsys assay. None of the assays detected high-avidity antibodies in serum taken <4 months after infection. Avidity values of >90% were exclusively reported in sera taken >9 months after infection by the Elecsys and Architect assays. Almost all avidities of <19% with the Elecsys IgG Avidity assay can be used to exclude recent infection. New ways of interpreting the avidity result are also suggested: very high or low values could exclude infections within the last 9 months or help to confirm a recent infection, respectively. However, these potential interpretations require further investigation.

Primary infection by the apicomplexan parasite *Toxoplasma* gondii during pregnancy can result in severe disease of the fetus, such as neurologic or ocular lesions (15, 23, 24). As infection by *T. gondii* is generally asymptomatic, the diagnosis of infection in pregnant women relies on serologic assays. These tests are mandatory or highly recommended in several European countries (13, 21) and are also performed worldwide at the discretion of the physician. Suspicion or detection of toxoplasmosis acquired during pregnancy can be followed by measures intended to prevent fetal infection, such as maternal treatment with spiramycin or pyrimethamine-sulfadiazine, and fetal infection can be detected using fetal ultrasound and/or amniotic fluid PCR (15). More severe cases of congenital toxoplasmosis have been observed in countries where a standardized approach to diagnosis and treatment is not generally applied (13, 15, 16).

If a seronegative pregnant woman receives systematic monthly follow-up, assessment of *T. gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies allows the date of seroconversion (and, hence, infection) to be estimated. The interpretation is, however, more difficult when a single sample is submitted for testing, for instance, when IgG and IgM are both found in the first serum sample submitted for testing during the pregnancy. These results may reflect a recently acquired infection—and, thus, a risk of transmission of the parasite to the fetus—or an infection acquired before the pregnancy, as *T. gondii* IgM antibodies may be detected for an extended period after seroconversion (4, 12, 18). In this situation, measurement of IgG antibody avidity has been shown to be useful; notably, a high IgG avidity excludes the possibility that the *T. gondii* infection occurred within the last 4 months (3 months for some assays) (1, 3, 6, 8, 14, 19, 22). A high avidity value can, therefore, allow the physician to avoid (or stop) unnecessary treatment, reassure the patient, and in some cases provide evidence that excludes the need to consider termination of pregnancy.

The Elecsys Toxo IgG and IgM assays (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) have been validated for screening and monitoring of immune status in pregnant women (18, 20). Recently, a new additional assay, the Elecsys Toxo IgG Avidity assay, has been developed. This assay is based on the Toxo IgG assay and is an *in vitro* diagnostic assay for the qualitative determination of the avidity of IgG antibodies against *T. gondii* in human serum and plasma. The aim of this study was to assess the reliability of the Elecsys Toxo IgG Avidity assay for estimating the time of onset of *T. gondii* infection in samples from pregnant women at various stages of infection and compare the results with those obtained using two other commercially available Toxo IgG Avidity assays.

MATERIALS AND METHODS

Study design. This study was conducted in the parasitology-mycology laboratories of two different teaching hospitals. The Elecsys Toxo IgG

Received 28 May 2012 Returned for modification 13 July 2012 Accepted 10 September 2012 Published ahead of print 19 September 2012 Address correspondence to Jean-Benjamin Murat, jbmurat@chu-grenoble.fr. Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/CVI.00333-12

1838 cvi.asm.org

Clinical and Vaccine Immunology p. 1838–1843


Comparison of the Vidas System and Two Recent Fully Automated Assays for Diagnosis and Follow-Up of Toxoplasmosis in Pregnant Women and Newborns

Jean-Benjamin Murat,^{a,b} Céline Dard,^a Hélène Fricker Hidalgo,^a Marie-Laure Dardé,^{c,d} Marie-Pierre Brenier-Pinchart,^{a,b} Hervé Pelloux^{a,b}

Laboratory of Parasitology and Mycology, Grenoble University Hospital, Grenoble, France^b; UMR 5163 CNRS—Joseph Fourier University Grenoble I, Grenoble, France^b; Laboratory of Parasitology and Mycology, National Reference Center and Biological Resource Center for Toxoplasmosis, CHU Dupuytren, Limoges, France^c; UMR 1094 INSERM, Faculty of Medicine, University of Limoges, Limoges, France^d

Serological testing to detect toxoplasmosis is of major importance to avoid the possible effects of the disease in newborns. This study assessed anti-*Toxoplasma* IgG and IgM with the Vidas (bioMérieux), Architect (Abbott), and Liaison (DiaSorin) systems in 631 sera from pregnant women and newborns as well as anti-*Toxoplasma* IgG avidity with these three systems on 54 sera from pregnant women with positive IgG and IgM. The IgG and IgM results were in agreement in, respectively, 95.2% and 98.3% (Vidas versus Architect) and 96.9% and 95.3% (Vidas versus Liaison) of the samples. Specificities were excellent for all the assays, while Vidas sensitivities ranged (depending on the classification of gray zone results) from 93.8 to 98.4% for IgG (Architect, 84.4 to 93.8%; Liaison, 93.8%) and from 81.8 to 90.9% for IgM (Architect, 63.6%; Liaison, 81.8 to 90.9%). In seroconversion sequences, IgMs were generally detected simultaneously by the three assays, while Architect than with the other systems. IgMs were positive in only one infected child with the Vidas and Liaison systems. Significantly more sera were classified in the high-avidity category with Vidas than with Architect. This evaluation shows similar performances for Vidas and more recent systems. The Vidas system adequately detects toxoplasmosis in pregnant women and newborns. This system fits the needs of laboratories working on small routine series for first-line testing as well as expert laboratories, due to a high specificity and a powerful avidity test.

Due to transmission of the apicomplexan protozoan *Toxoplasma gondii* from a mother with acute infection to her fetus, congenital toxoplasmosis can cause severe diseases or sequelae, mainly concerning the eye (retinochoroiditis) and the brain (1). The severity of congenital toxoplasmosis ranges from asymptomatic or mild infection to severe symptoms (hydrocephalus, microcephaly, or encephalitis) or sequelae (visual impairment, intracranial calcifications, or psychomotor or mental retardation), and even *in utero* abortion or fetal death (especially when maternal infection occurs early in the pregnancy) (2, 3).

Antibiotic treatment—usually spiramycin, or pyrimethamine associated with a sulfonamide-can be started in several situations: acute infection in a pregnant woman and positive prenatal or postnatal diagnosis of congenital infection. Such treatments have been shown to decrease the risk of infection for the fetus and to avoid critical symptomatology (4, 5). Since this infection is often asymptomatic or with unspecific symptoms in adult patients, serologic tests are useful, especially for the prevention of transmission to the fetus (6). The detection of an acute infection can be made by detecting antibodies in a pregnant woman who was previously seronegative. Presence or absence of immunoglobulin M (IgM) antibodies, titers of IgG antibodies, and antibody kinetics may then help date the infection (7). When a woman presents with anti-T. gondii IgG and IgM at the first serological testing during pregnancy, assessing the avidity of the IgG antibodies may help exclude a recent infection (i.e., an infection in the past 4 months, generally) (7, 8). These serologic tests are also important for the follow-up of newborns from mothers infected during pregnancy, because they allow detection of neosynthesized IgM or

IgG antibodies, in addition to highly sensitive, qualitative serologic tests (Western blots) (7, 9–11).

Since the 1940s, serologic tests have evolved from manual to completely automated techniques (12, 13). Evaluations of the Vidas system (bioMérieux) for detection of toxoplasmosis IgG and IgM were first published in the 1990s and involved comparisons with techniques that are, for the most part, no longer commercialized today (14–17). Since then, the system has been poorly evaluated (18) and has been used in studies mainly as a comparator (19-22). Vidas was also the first system allowing the automated assessment of anti-T. gondii IgG avidity (23). Vidas assays are still used today, either as first-line techniques in routine testing for small-volume testing laboratories or as second-line techniques for confirmation and expertise. However, more recently, competitor systems with highly sensitive and specific techniques have emerged (19, 22, 24-26). An updated evaluation of the accuracy and usefulness of the Vidas system compared with more recent techniques is therefore necessary.

The aim of this study was to determine the current performance of the Vidas system for diagnosing toxoplasmosis in pregnant women and newborns. To do this, we compared the results of

Received 20 February 2013 Returned for modification 3 April 2013 Accepted 3 June 2013 Published ahead of print 5 June 2013 Address correspondence to Jean-Benjamin Murat, jbmurat@chu-grenoble.fr. Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/CVI.00089-13

August 2013 Volume 20 Number 8

Clinical and Vaccine Immunology p. 1203–1212



Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations?

Expert Rev. Anti Infect. Ther. 9(11), 943–956 (2013)

Jean-Benjamin Murat^{*1,2}, Hélène Fricker Hidalgo¹, Marie-Pierre Brenier-Pinchart^{1,2} and Hervé Pelloux^{1,2}

¹Laboratory of Parasitology and Mycology, Grenoble University Hospital, BP 217, 38043 Grenoble, France ²UMR 5163 CNRS – Joseph Fourier University Grenoble I, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France *Author for correspondence: Tel.: +33 4 76 76 54 90 Fax: +33 4 76 76 52 28 jbmurat@chu-grenoble.fr The *Toxoplasma gondii* parasite is a worldwide threat most particularly in fetal life and immunosuppression. In most clinical situations (except in some ocular cases), correct detection or identification of toxoplasmosis requires biological analysis. This article considers the laboratory tools that have been developed in this field since the discovery of the pathogen, with emphasis on the most recent tests and how they can or should be used in different clinical situations. The authors also discuss the requirements and pitfalls that one should be aware of when biologically investigating this intriguing parasitosis.

Keywords: confirmatory test • congenital • diagnosis • immunosuppression • screening • Toxoplasma gondii • uveitis

Methodology

Computerized literature searches of the PubMed database were performed. The searches of the English and French language used the terms 'toxoplasmosis', '*Toxoplasma*' and the keywords mentioned above. The authors focused on the most recent articles but also included a few articles published several decades ago which were thought to be of technical or historical interest. Recommendations provided in this article are based upon critical analysis of the literature when available and upon the authors' own experience in other cases.

Introduction

Toxoplasma gondii is a protozoan distributed throughout the world. This intracellular parasite achieves its sexual reproduction in the intestine of *Felidae* (definitive host), which allows dissemination of infective oocysts. In any warmblooded animal that has ingested matured oocysts, *T. gondii* can induce acute disease (caused by the tachyzoite form of the parasite), and the reaction of the intermediate host immune system will lead to formation of bradyzoite-containing cysts (latency form), with lifelong persistence. Ingestion of cysts, mainly from neural (i.e., brain, retina) and muscle tissues, is the other route of contamination, for both definitive and intermediate hosts [1].

In humans, primary infection by T. gondii is generally asymptomatic or does not require medical treatment. However, in a number of clinical situations where the immune response is lowered (fetal life, immunosuppressed patients, intraocular infection), it can cause severe symptoms or sequelae, or have fatal consequences [2]. In these situations, the diagnosis of an active infection (i.e., primary infection or reactivation due to cyst lysis and subsequent conversion of bradyzoites to tachyzoites) must be made: effective treatments are available and can help prevent i) transmission of the parasite to the fetus (congenital toxoplasmosis), ii) reactivation of a latent infection in people whose immune response is altered or iii) the harmful consequences of the acute infection [3-5].

Overview of available methods Indirect methods: detection of antibodies

The following serological methods are most often designed for IgG and IgM antibodies, which remain the most widely used isotypes in the field of toxoplasmosis diagnosis. Typically, IgM are considered as the earliest antibodies in acute infection, since they are produced during the first week after infection; they are usually

www.expert-reviews.com

10.1586/14787210.2013.825441

© 2013 Informa UK Ltd



Résumé

Études biochimiques, structurales et fonctionnelles du complexe MARS de *Toxoplasma gondii*, une nouvelle cible thérapeutique

Toxoplasma gondii, parasite digestif des Félidés, est l'agent de la toxoplasmose, maladie pouvant être grave voire mortelle en cas d'infection fœtale ou chez l'immunodéprimé. Les traitements actuellement disponibles permettent de prévenir ou traiter la plupart des cas, mais peuvent présenter un risque d'effets indésirables relativement sévères et ne permettent pas de détruire les kystes responsables de l'infection chronique et du risque de réactivation chez l'immunodéprimé. Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) sont des enzymes essentielles au mécanisme de traduction, où elles participent au chargement d'un acide aminé sur une molécule dédiée d'ARN de transfert, une étape initiale du processus de synthèse protéique.

Un gène codant une protéine homologue de p43, un partenaire protéique de certaines aaRS chez les Eucaryotes supérieurs, a été identifié dans le génome de *T. gondii*. La localisation subcellulaire post-invasion de Tg-p43 montre qu'il ne s'agit pas d'une cytokine sécrétée, contrairement à son homologue humaine ; au contraire, son immunopurification a révélé son association à quatre aaRS, les Méthionyl-, Glutamyl-, Glutamyl- et Tyrosyl-ARNt synthétases, qui constituent donc le premier complexe multi-aaRS (MARS) décrit chez les parasites Apicomplexes, de localisation exclusivement cytoplasmique. La présence inattendue de la Tyrosyl-ARNt synthétase soulève plusieurs questions sur le plan de l'organisation et de l'assemblage du complexe. Des images de microscopie électronique et des analyses biochimiques soulignent l'hétérogénéité et la structure relâchée du complexe et confirment les récentes données issues des complexes MARS purifiés chez d'autres organismes. L'inactivation du gène Tg-p43 n'induit pas de modifications phénotypiques majeures (capacité d'invasion, prolifération) ni de diminution de la virulence ou de la kystogénèse en modèle murin.

Les résultats sur la caractérisation du MARS ont été complétés par une approche thérapeutique. Un criblage in vitro de candidatsmédicaments présélectionnés in silico pour inhiber la Glutaminyl-ARNt synthétase toxoplasmique a permis de mettre en évidence un composé parasitostatique, inhibiteur de la croissance des tachyzoïtes, avec une toxicité sur les cellules hôtes in vitro relativement faible.

Ce travail de thèse pose les bases moléculaires et structurales du complexe MARS chez *T. gondii*. Il permet également d'aborder dans une certaine mesure l'histoire évolutive de ce complexe. Sa fonction biologique reste cependant un mystère ; le rôle de Tg-p43 dans le contrôle post-transcriptionnel, voire d'autres fonctions biologiques, est probablement trop subtil pour être mesuré dans nos conditions expérimentales. Le versant thérapeutique de ce travail constitue une étude préliminaire pouvant servir de point de départ pour la recherche de médicaments anti-toxoplasmiques ciblant les aaRS, qui constituent assurément des cibles thérapeutiques intéressantes.

Mots clés

Toxoplasma gondii, aminoacyl-ARNt synthétases, complexe moléculaire, génétique moléculaire, chromatographie d'exclusiondiffusion, chromatographie d'affinité, microscopie électronique, criblage de candidat-médicaments

Summary

Biochemical, structural and functional studies of the Toxoplasma gondii MARS complex, a novel therapeutic target

Toxoplasma gondii, a parasite of felids gut, is responsible for toxoplasmosis, a disease that can induce severe sequelae or death in the foetus or immune-depressed patients. Currently available treatments can prevent or cure most of the cases, but are at risk for side effects and cannot suppress cysts, which cause the chronic disease and are responsible for disease when the immune status is altered. Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are essential for translation, by charging tRNA with cognate aminoacids, a preliminary step of the protein synthesis process.

A gene coding for protein homologous to p43 (which interacts with a subset of aaRSs in higher eukaryotes) was identified in the genome of *T. gondii*. Following its epitope tagging, we show that Tg-p43 is not secreted nor exported beyond the vacuole as a cytokine, as it is for its human counterpart; however, biochemical analysis of the Tg-p43 interactome reveals four aaRSs as interacting partners, namely Methionyl-, Glutamyl-, Glutaminyl- and Tyrosyl-tRNA synthetases. This is the first description of the multi-aaRS (MARS) complex in the *Apicomplexa* phylum; it is strictly localized in the parasite cytoplasm. The unexpected presence of the Tyrosyl-tRNA synthetase in the complex raises several questions about how the complex is organised and assembled, and also evolved. Electronic microscopy along with size exclusion chromatography shows heterogeneity and loose structure of the complex, similarly to recent data characterizing higher eukaryotic complexes. Disruption of the complex by knocking-out of the gene *Tg-p43* does not induce detectable phenotypic modification, nor alterations of the virulence and cystogenesis in a murine model.

Alongside the study on the MARS complex, we used an *in silico* approach to screen for new compounds to inhibit *T. gondii* Glutaminyl-tRNA synthetase. We thus identified one parasitostatic compound that was able to significantly slow down parasite growth while having a relatively low *in vitro* toxicity against the human host cell.

The function of the MARS in *T. gondii* still remains unknown; the role of Tg-p43 in the post-transcriptional control or any other biological function is probably too subtle to be measured under our experimental conditions. However, our data help to some extent to better measure the evolutionary history of the MARS family. The therapeutic side of this work, although preliminary, may serve as a base for anti-*T. gondii* drug discovery focusing on aaRS inhibitors, which are obviously good candidate targets.

Key words

Toxoplasma gondii, aminoacyl-tRNA synthetases, molecular complex, molecular genetics, size exclusion chromatography, affinity chromatography, electronic microscopy, drug screening