

Lumière sur le “ twist ” final du parasite Toxoplasma pour envahir sa cellule hôte nourricière

Isabelle Tardieux

▶ **To cite this version:**

Isabelle Tardieux. Lumière sur le “ twist ” final du parasite Toxoplasma pour envahir sa cellule hôte nourricière. Médecine/Sciences, 2019, 35 (2), pp.109-112. 10.1051/medsci/2019013 . hal-02969895

HAL Id: hal-02969895
https://hal.science/hal-02969895

Submitted on 17 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Soliman M, Srikrishna G, Balagopal A. Mechanisms of HIV-1 control. *Curr HIV/AIDS Rep* 2017 ; 14 : 101-9.
2. Chougui G, Martin M, Matkovic R *et al*. Vpx n'a pas dit son dernier mot : « Hush ! ». *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 9-12.
3. Stremlau M, Perron M, Lee M, *et al.* Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 5514-9.
4. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in old world monkeys. *Nature* 2004 ; 427 : 848-53.
5. Bourke NM, Napoletano S, Bannan C, *et al.* Control of HIV infection by IFN-alpha: implications for latency and a cure. *Cell Mol Life Sci* 2018 ; 75 : 775-83.
6. Cribier A, Descours B, Valadao AL, *et al.* Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *Cell Rep* 2013 ; 3 : 1036-43.
7. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2013 ; 82 : 357-85.
8. Dutrieux J, Portilho DM, Arhel NJ, *et al.* TRIM5alpha is a SUMO substrate. *Retrovirology* 2015 ; 12 : 28.
9. Portilho DM, Fernandez J, Ringeard M, *et al.* Endogenous TRIM5alpha function Is regulated by SUMOylation and nuclear sequestration for efficient innate sensing in dendritic cells. *Cell Rep* 2016 ; 14 : 355-69.
10. Maarifi G, Fernandez J, Portilho DM, *et al.* RanBP2 regulates the anti-retroviral activity of TRIM5α by SUMOylation at a predicted phosphorylated SUMOylation motif. *Commun Biol* 2018 ; 1 : 193.
11. Di Nunzio F, Danckaert A, Fricke T, *et al.* Human nucleoporins promote HIV-1 docking at the nuclear pore, nuclear import and integration. *PloS One* 2012 ; 7 : e46037.
12. Werner A, Flotho A, Melchior F. The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase. *Mol Cell* 2012 ; 46 : 287-98.
13. Arhel NJ, Nisole S, Carthagena L, *et al.* Lack of endogenous TRIM5alpha-mediated restriction in rhesus macaque dendritic cells. *Blood* 2008 ; 112 : 3772-6.

NOUVELLE

Lumière sur le « *twist* » final du parasite *Toxoplasma* pour envahir sa cellule hôte nourricière

Isabelle Tardieux

Institut pour l'avancée des biosciences (IAB), équipe dynamique membranaire des interactions parasite-hôte, CNRS UMR5309, Inserm U1209, Université Grenoble Alpes, allée des Alpes, 38700 Grenoble, France.
isabelle.tardieux@inserm.fr

› Au sein des écosystèmes, les relations trophiques gouvernent une large part des interactions entre microorganismes et autres organismes membres de la biocénose[1]. Dans ce contexte, le parasitisme décrit une association étroite et en équilibre dynamique entre deux organismes, le premier étant qualifié de parasite, et le second, d'hôte. Chez l'hôte, se déploie une série d'interactions bilatérales selon des modalités remarquablement variées pour chaque couple hôte-parasite et soumises à un ajustement continu impulsé par le processus co-évolutif. Dans certaines situations, le parasitisme se traduit par des dommages tissulaires locaux et/ou systémiques chez l'hôte qui menacent alors chacun des partenaires. Ainsi, dans le monde des microorganismes eucaryotes unicellulaires, ceux responsables de parasitoses humaines parfois mortelles, comme le paludisme (*Plasmodium spp.*) et la toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*), sont-ils étudiés à de nombreuses échelles afin de décoder les échanges bilatéraux, dont témoigne la réalisation du programme de développement du parasite au cours des phases symptomatique, mais également asymptomatique du parasitisme.

Les genres *Plasmodium et Toxoplasma* sont génétiquement apparentés et appartiennent au très large phylum des *Apicomplexa*. Ils partagent une capacité « adaptative » de différenciation se traduisant sous la forme de stades biologiques singuliers qui se développent dans des tissus distincts [1]. Chez les hôtes vertébrés homéothermes, les « zoïtes » des Apicomplexes sont les stades mobiles et invasifs qui garantissent au parasite l'accès aux ressources nutritives offertes par la cellule hôte et qui sont nécessaires à l'expansion transitoire intra-hôte de la population invasive. C'est le plus souvent la répétition de la triade « invasion de... - multiplication dans... - évasion hors de... » la cellule hôte qui est la cause première des dommages tissulaires locaux. Ce faisant, toute rupture prolongée des processus physiologiques au sein du système immunitaire de l'hôte qui contrôlent cette triade ou l'absence de thérapies effectives ciblant les parasites invasifs mettent en danger la vie des deux individus partenaires.

C'est parce que le potentiel invasif du zoïte détermine sa chance de survie, mais également l'étendue des perturbations occasionnées chez l'hôte, que les chercheurs se sont intéressés depuis des décennies aux mécanismes mis en jeu lors de l'entrée du parasite dans une cellule hôte, avec l'idée de concevoir des stratégies thérapeutiques et/ou vaccinales anti-invasion. Pour des raisons

[1] Ensemble des êtres vivants coexistant dans un espace écologique donné.

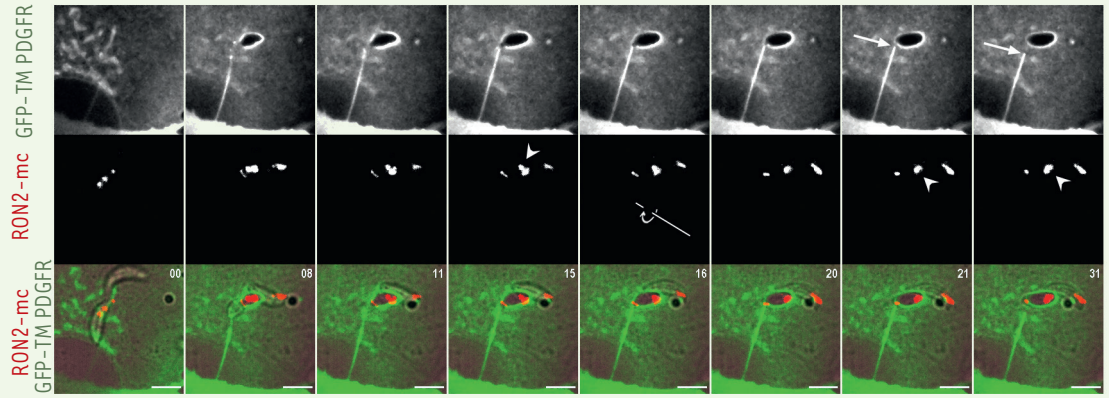


Figure 1. ***Entrée d'un tachyzoïte de Toxoplasma gondii dans une cellule humaine nucléée.*** Un tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* amorce son entrée dans une cellule d'ostéosarcome humain (lignée U2OS) exprimant la protéine naturellement fluorescente verte (GFP) en fusion avec le domaine transmembranaire d'un récepteur du facteur de croissance PDGFR (GFP-TMPDGFR : *green fluorescent protein-trans menbranar platelet-derived growth factor receptor*) ciblée à la membrane plasmique. Le parasite exprime une chimère RON2-mc (fusion de *rhoptry neck protein 2* et de *mCherry-fluorescent protein*), localisée dans les rhoptries. Par vidéomicroscopie de fluorescence, RON2-mc permet de détecter les rhoptries apicales, mais également la jonction circulaire établie entre le zoïte et la cellule (jonction zoïte-cellule : JZC) dans la phase initiale de l'entrée, après la sécrétion du complexe RON hétéro-tétramérique (RON2, 4, 5, 8) et l'insertion de RON2 dans la membrane fluorescente de la cellule cible. Une fois le complexe RON assemblé et ancré à la surface de la cellule cible, la JZC sert de porte au travers de laquelle le parasite se propulse activement en forçant l'invagination de la membrane de la cellule cible sous forme de bourgeon enveloppant. Ce suivi en temps réel présente les images prises à deux longueurs d'onde différentes. Il permet d'apprécier quasi-simultanément la fluorescence de la GFP (représentée en gris puis vert) et celle de la mCherry, ainsi qu'un montage combinant les deux fluorescences avec l'image en lumière transmise. Le matériel fluorescent vert issu de la membrane de la cellule humaine restant fixé au pôle postérieur du parasite s'étire sous la forme d'un tube lorsque ce dernier se déplace pour envahir la future cellule hôte. Le tube se rétracte (indiqué par une flèche) lorsque le parasite effectue une rotation (flèche autour de l'axe) qui a pour effet de fermer la JZC. La concomitance des deux évènements suggère une corrélation fonctionnelle alors que la rétraction du tube membranaire atteste de la fermeture de la JZC. Les changements d'orientation des rhoptries au cours de la séquence qui décrit la rotation sont visualisés par des pointes de flèches. Les temps sont indiqués en secondes. Échelle : 5 µm.

cliniques et expérimentales, le stade tachyzoïte[2] de *T. gondii* est l'un des plus étudiés. Il se caractérise par (1) une forme arquée dont la longueur et le diamètre atteignent respectivement environ 7 et 3 µm ; (2) une polarité à la fois architecturale et fonctionnelle ; et (3) une faculté remarquable à coloniser toute cellule nucléée chez les métazoaires, dont l'homme. Les études pionnières réalisées à l'aide d'une microscopie statique de très haute résolution ont alimenté le modèle selon lequel le tachyzoïte se propulse activement à l'intérieur d'un bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule cible après avoir établi un contact apical avec cette dernière. La perte du potentiel invasif, ensuite corrélée au dysfonctionnement de moteurs acto-myosine parasitaires, a renforcé la pertinence de ce modèle (pour une revue, voir [2]). Pourtant, ce ne sont qu'au cours des dix dernières années, grâce notamment aux progrès technologiques conjoints des analyses « omiques » de petits échantillons biologiques, en génétique moléculaire et en imagerie du vivant, que des avancées significatives sur la compréhension de la stratégie invasive du tachyzoïte ont été obtenues. Tout d'abord, il a été montré qu'un complexe de 4 protéines - le complexe RON (pour *rhoptry neck proteins*) RON2, 4, 5 et 8 - dont la sécrétion à partir d'organelles apicales, appelées rhoptries, précède l'assemblage d'une jonction intime entre l'apex du zoïte et la surface de la cellule cible [3-5] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de K. Frénal et D. Soldati-Favre, m/s n° 5, mai 2013, page 515

Cette interface étroite que nous qualifierons de « jonction zoïte-cellule (JZC) » marque le site d'invagination de la membrane de la cellule hôte qui sous-tend l'entrée du parasite. La construction de lignées de *T. gondii* invalidées pour un gène impliqué dans la réparation de l'ADN (*ku80*) a ensuite permis d'optimiser le remplacement génique au sein du génome parasitaire par des séquences d'intérêt, facilitant d'autant la détection « en direct » de protéines portant une étiquette fluorescente distinctive [6]. Enfin le développement en tandem d'une caméra de haute résolution spatiotemporelle et

[2] Stade invasif caractérisé par une capacité à se multiplier rapidement.

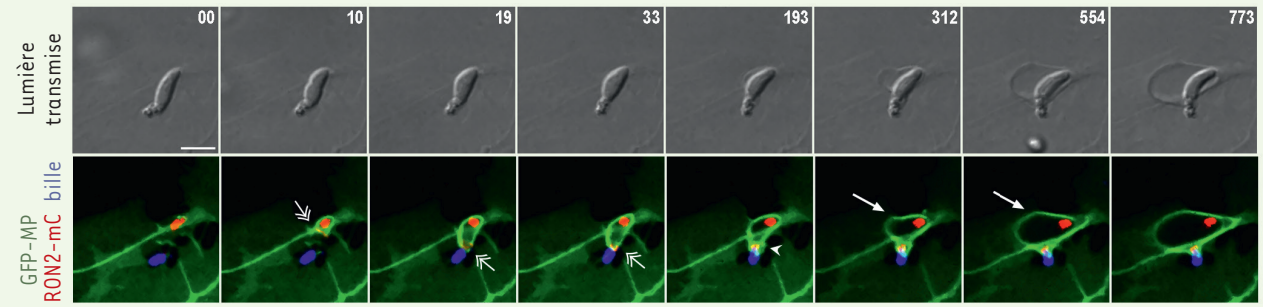


Figure 2. ***Suivi en temps réel des dommages osmotiques induits au niveau du bourgeon membranaire accompagnant l'entrée du tachyzoïte de T. gondii dans une cellule humaine lorsque la rotation finale du parasite est mécaniquement bloquée, empêchant la fermeture du bourgeon sous forme de vacuole parasitophore.*** Un tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* amorce son entrée dans une cellule d'ostéosarcome humain (lignée U2OS) exprimant la chimère GFP-MP (*green fluorescent protein*) ciblée à la membrane plasmique (MP). Le parasite exprime la chimère RON2-mcherry (fusion de *rhoptry neck protein 2* et de *mcherry-fluorescent protein*) qui indique la localisation des rhoptries, mais surtout celle de la jonction circulaire servant de porte d'entrée. Étant artificiellement bloqué par une bille micrométrique fluorescente bleue attachée à son extrémité postérieure, le parasite ne peut pas correctement fermer la jonction zoïte-cellule (JZC), ce qui entraîne un influx d'ions extérieurs et une perturbation osmotique avec comme conséquence le gonflement du bourgeon enveloppant (indiqué par une flèche). Le suivi en temps réel comprend un panneau en lumière transmise et un panneau combinant les trois fluorescences. Les temps sont indiqués en secondes, les protrusions membranaires autour de la bille sont visualisées par des têtes de flèches. Échelle : 5 µm.

de la technologie du « *spinning disk*[3] », comme de logiciels d'analyse d'images intégrant un nombre évolutif d'algorithmes d'analyse pré-établis (ou *plugin)* - en particulier la plateforme Icy [7] – ont offert la possibilité d'une analyse quantitative et résolutive des données pour un gain informatif substantiel dans la caractérisation phénotypique et fonctionnelle du processus invasif.

Bénéficiant de ces avancées, notre équipe a développé des protocoles d'analyse en temps réel des comportements pré-invasif et invasif du tachyzoïte de *T. gondii* afin de caractériser les forces engagées lors de l'entrée du parasite dans une cellule cible. Le défi était réel, considérant l'exceptionnelle rapidité de cette séquence qui, bien que complexe, ne dure que quelques dizaines de secondes. C'est en construisant des tachyzoïtes qui expriment une version fluorescente et fonctionnelle de RON2, la seule protéine du complexe RON dont un domaine est inséré dans la membrane cible, qu'une analyse cinématique résolutive et automatisée de l'invasion a été réalisée [8]. En effet, l'émission de fluorescence par la version chimère RON2-mcherry (fusion de RON2 et de la protéine naturellement fluorescente rouge) autorise une détection fiable des rhoptries à l'apex du zoïte, mais également de la JZC. En imposant expérimentalement une résistance à la progression du tachyzoïte dans la cellule hôte, l'équipe a démontré la contribution centrale d'une force de traction exercée par le tachyzoïte sur la JZC, une force qui co-dirige sa progression et la genèse du bourgeon membranaire enveloppant. La concomitance des deux processus est étayée par l'observation simultanée de protéines chimères fluorescentes chez le tachyzoïte et dans la cellule envahie. Ces approches ont également mis en évidence une stratégie invasive alternative beaucoup moins efficace, mais exploitée par les tachyzoïtes mutants incapables d'exercer une traction sur la JZC car privés d'un système actine/myosine A fonctionnel [9]. Ce sont alors des protrusions émergeant de la membrane de la cellule cible après assemblage de la JZC qui entourent progressivement le tachyzoïte. La force conférée aux protrusions sous le contrôle de la polymérisation d'actine permet d'engager le toxoplasme au travers de la JZC dans un bourgeon membranaire similaire à celui d'un tachyzoïte exprimant un « moteur compétent ». L'ensemble de ces observations suggère que l'acquisition de la capacité invasive du toxoplasme au cours de l'évolution est corrélée à la sélection d'un moteur myosine ultraperformant.

L'introduction récente des approches biophysiques, en partenariat avec le laboratoire interdisciplinaire de physique de Grenoble (LIPhy, CNRS), a affiné l'étude en 3- et 4-dimensions du processus invasif, y compris dans des cellules organisées en sphéroïdes au sein de matrices extracellulaires. Ces démarches expérimentales innovantes ont non seulement permis de préciser l'architecture toroïdale[4] et les

[3] Le *spinning disk* divise l'illumination laser de l'échantillon en plusieurs centaines de points, cette technique permet des acquisitions rapides avec une résolution semblable à celle d'un microscope confocal à balayage laser tout en réduisant le photoblanchiement et la phototoxicité.

[4] Un tore est un solide géométrique représentant un tube courbé refermé sur lui-même.

propriétés élastiques de la JZC, mais aussi de révéler un mécanisme singulier par lequel le bourgeon d'entrée s'individualise en une vacuole cytoplasmique qui abrite le parasite puis sa future descendance [10]. L'analyse spatio-temporelle automatique des trajectoires des différents réservoirs de RON2 comme de l'apicoplaste - un organelle stable et excentré présent chez les *Apicomplexa* - a en effet dévoilé une rotation (ou *twist*) du tachyzoïte selon son axe antéro-postérieur en toute fin du processus invasif.

C'est en examinant comment du matériel exogène fixé à l'arrière du parasite interfère avec le mouvement de rotation et la fermeture de la JZC, qu'a été confirmée la relation fonctionnelle entre les deux événements. Lorsque le zoïte libre est en mouvement, il arrive qu'il tire avec lui une portion de membrane d'une cellule fermement liée à son extrémité postérieure et qui s'étire comme un tube, y compris lorsque le zoïte pénètre dans la cellule. La rétraction du tube coïncide avec le *twist* final du tachyzoïte, illustrant la participation de cette rotation à la fermeture de la JZC, juste derrière le pôle postérieur du zoïte *(Figure 1)*. En revanche, la fixation d'une bille micrométrique au pôle postérieur du zoïte, *via* des liaisons covalentes entre les molécules des deux surfaces, bloque le *twist* final et provoque un défaut d'étanchéité de la JZC perceptible en quelques minutes par l'accumulation des ions sodium extracellulaires dans l'espace confiné du bourgeon et visualisés par une sonde sodium fluorescente (*Corona green*). Le déséquilibre osmotique se traduit par l'élargissement spectaculaire du bourgeon sous la forme d'un ballon intracellulaire au sein duquel l'augmentation de la pression exerce une compression sur le parasite jusqu'à provoquer sa lyse *(Figure 2)*.

Ces résultats innovants soutenus par des avancées technologiques en génétique moléculaire et imagerie dynamique documentent la contribution essentielle fonctionnelle d'une force de rotation – définissant le torque (ou couple de rotation) – de *Toxoplasma* qui coordonne la fermeture de la JZC dans la membrane cible. De plus, ce torque favorise la fission du bourgeon en une vacuole parasitophore (VP) suggérant ainsi une analogie de fonction avec les forces de torsion et constriction exercées par la famille des dynamines lors de la genèse des vésicules intracellulaires [11]. Alors que ces travaux soulèvent des interrogations sur les propriétés biomécaniques de la JZC et la coordination des acteurs du torque, ils constituent indéniablement une preuve supplémentaire de l'ingéniosité de *T. gondii*, avec la mise au point d'un nano-dispositif singulier qui promeut l'ouverture transitoire de la membrane de cellule de l'hôte métazoaire. Le développement des microscopies corrélatives et dynamiques à très haute résolution, couplées aux nouvelles générations de sondes moléculaires, seront les prochains atouts pour explorer à l'échelle sous-nanométrique ce nano-dispositif microbien unique et parfaitement ajusté au contexte des membranes cellulaires cibles. ◊

Illuminating the last twist of the *Toxoplasma* parasite to invade a host-feeding cell

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteure déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 1998 ; 11 : 267-99.
2. Tardieux I and Baum J. Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. *J Cell Biol* 2016 ; 214 : 507-15.
3. Besteiro S, Dubremetz JF, Lebrun M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol* 2011 ; 13 : 797-805.
4. Gonzalez V, Combe A, David V, *et al.* Host cell entry by apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. *Cell Host Microbe* 2009 ; 5 : 259-72.
5. Frénal K, Soldati-Favre D. Un complexe moléculaire unique à l'origine de la motilité et de l'invasion des Apicomplexes. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 515-22.
6. Huynh M-H and Carruthers VB. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryotic Cell* 2009 ; 8 : 530-9.
7. de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, *et al.* Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods* 2012 ; 9 : 690-6.
8. Bichet M, Joly C, Henni AH, *et al.* The toxoplasma-host cell junction is anchored to the cell cortex to sustain parasite invasive force. *BMC Biol* 2014 ; 12 : 773-93.
9. Bichet M, Touquet B, Gonzalez V, *et al.* Genetic impairment of parasite myosin motors uncovers the contribution of host cell membrane dynamics to Toxoplasma invasion forces. *BMC Biol* 2016 ; 14 : 97-115.
10. Pavlou G, Biesaga M, Touquet B, *et al.* Toxoplasma parasite twisting motion mechanically induces host cell membrane fission to complete invasion within a protective vacuole. *Cell Host Microbe* 2018 ; 24 : 81-96.
11. Antonny B, Burd C, De Camilli P, *et al.* Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J* 2016 ; 35 : 2270-84.

Tarifs d'abonnement *m/s* - 2019

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

> Grâce à *m/s*, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 190 dans ce numéro de *m/s*

