



Etude de la synthèse des centres fer-soufre à l'apicoplaste et la mitochondrie de *Toxoplasma gondii*

Sarah Pamukcu

► To cite this version:

Sarah Pamukcu. Etude de la synthèse des centres fer-soufre à l'apicoplaste et la mitochondrie de *Toxoplasma gondii*. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT029 . tel-03401909

HAL Id: tel-03401909

<https://theses.hal.science/tel-03401909>

Submitted on 25 Oct 2021

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie cellulaire et moléculaire

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

**Etude de la synthèse des centres fer-soufre dans
l'apicoplaste et la mitochondrie de *Toxoplasma gondii*.**

Présentée par Sarah PAMUKÇU

Le 16 Septembre 2021

Sous la direction de Sébastien BESTEIRO

Devant le jury composé de

Rachel CERDAN, PR, Université de Montpellier, France

Sabrina MARION, MCU, Université de Lille, France

Jérémy COUTURIER, MCU, Université de Lorraine, France

Marie-France CESBRON, DR, Université de Grenoble, France

Jean-François DUBREMETZ, DR, Université de Montpellier, France

Sébastien BESTEIRO, CR – INSERM, Université de Montpellier, France

Présidente de jury

Rapporteur n°1

Rapporteur n°2

Examineur n°1

Examineur n°2

Directeur de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Summary:

Toxoplasma gondii is a member of the phylum of Apicomplexa that includes many parasites responsible for zoonoses. *T. gondii* is an obligate intracellular parasite with a complex cycle involving various hosts. It harbors two organelles of endosymbiotic origin: the mitochondrion and the apicoplast (originated from secondary endosymbiosis). Both contain metabolic pathways important to the parasites. Among the pathways present in the apicoplast are the FASII fatty acid pathway and the isoprenoid biosynthesis pathway. The proper functioning of these pathways as well as many other cellular functions, such as the mitochondrial respiratory chain, require the use of proteins containing Iron-Sulfur (Fe-S) centers. The biosynthesis pathways for generating Fe-S proteins is largely understudied in Apicomplexa, although some investigations have shown some are essential in the malaria-causing parasite *Plasmodium*.

Within the other branches of the tree of life, different Fe-S biosynthetic pathways have been described: the ISC mitochondrial pathway, the CIA cytoplasmic pathway, the SUF plastidic pathway. As *T. gondii* contains two organelles of endosymbiotic origin (the mitochondrion and the apicoplast), it has these three biosynthetic pathways. During my PhD project, I focused on components of the ISC and SUF pathways and sought to evaluate how they contribute to parasite fitness.

I have discovered that impacting the expression of the SufS cysteine desulfurase leads to a defect in the lytic cycle of *T. gondii*, which is likely linked to a defect in apicoplast-related function. We observed defects in the synthesis of apicoplast-derived fatty acids, which could be linked to a loss of function of the LipA Fe-S protein (which is important for the synthesis of acetyl-CoA, a precursor of the FASII pathway). Impairing the SUF pathway leads to abnormal formation of daughter cells during parasite replication, followed by delayed but irreversible death of the parasites. It thus appears that the SUF pathway is necessary for the survival of *T. gondii*.

On the other hand, impacting the mitochondrial ISC pathway by targeting the IscU scaffold protein, induces stress and metabolic changes (to adapt to the demise of Fe-S-dependent electron transport chain) that did not kill the parasites, but instead allowed its differentiation into an encysted resistance form.

Therefore, our characterization in *T. gondii* of the plastidic and mitochondrial Fe-S cluster synthesis pathways has shown that their function has been conserved during evolution, and that they contribute differently, yet importantly, to the fitness of the parasite. These pathways should then be investigated further to look for new potential therapeutic drug targets.

Key word: *Toxoplasma gondii*, Iron-Sulfur cluster, apicoplast, metabolism, differentiation.

Résumé :

Toxoplasma gondii est un membre du phylum Apicomplexa qui comprend de nombreux parasites responsables de zoonoses. *T. gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire dont le cycle complexe implique différents hôtes. Il abrite deux organelles d'origine endosymbiotique : la mitochondrie et l'apicoplaste (issus d'une endosymbiose secondaire). Tous deux contiennent des voies métaboliques importantes pour les parasites. Parmi les voies essentielles présentes dans l'apicoplaste figurent les voies de biosynthèse des acides gras FASII et des isoprénoïdes. Le bon fonctionnement de ces voies, ainsi que de nombreuses autres dans la cellule, comme la chaîne respiratoire mitochondriale, nécessite l'utilisation de protéines contenant des centres fer-soufre (Fe-S). Les voies de biosynthèse permettant de générer des protéines Fe-S sont largement sous-étudiées chez les Apicomplexes, bien que des recherches aient montré que certaines sont essentielles chez *Plasmodium*.

Dans les autres branches de l'arbre de vie, différentes voies de biosynthèse des clusters Fe-S ont été décrites : la voie mitochondriale ISC, la voie cytoplasmique CIA et la voie plastidique SUF. Comme *T. gondii* contient deux organelles d'origine endosymbiotique, il possède ces trois voies de biosynthèse. Au cours de mon projet de thèse, je me suis concentrée sur les composants des voies ISC et SUF et j'ai cherché à évaluer comment ils contribuent à la survie du parasite.

J'ai mis en évidence qu'interférer avec la fonction de la cystéine désulfurase SufS ou la fonction d'ATPase de SufC, entraîne un défaut dans le cycle lytique de *T. gondii*, probablement lié à un défaut dans des fonctions liées à l'apicoplaste. Nous observons des défauts dans la synthèse des acides gras dérivés de l'apicoplaste, qui pourraient être liés à une perte de fonction de la protéine Fe-S LipA (qui est importante pour la synthèse de l'acétyl-CoA, un précurseur de la voie FASII). L'altération de la voie SUF entraîne une malformation des cellules filles lors de la réplication du parasite, suivie d'une mort retardée, mais irréversible, des parasites. Il semble donc que la voie SUF soit nécessaire à la survie de *T. gondii*. D'autre part, lorsque l'on interfère avec la voie mitochondriale ISC en ciblant la protéine d'échafaudage IscU, cela induit un stress et des changements métaboliques (afin de s'adapter à la disparition de la chaîne de transport d'électrons dépendante de protéines Fe-S) qui ne tuent pas les parasites, mais permettent sa différenciation en une forme de résistance enkystée.

Notre caractérisation, chez *T. gondii*, des voies de synthèse des centres Fe-S plastidiques et mitochondriales a montré que leur fonction semble conservée au cours de l'évolution, et qu'elles contribuent différemment, mais de manière importante, à la survie du parasite. Ces voies devraient être plus étudiées afin de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Mots-clés : *Toxoplasma gondii*, centres Fer-Soufre, apicoplaste, métabolisme, différenciation.

Remerciements :

Voilà la partie la plus personnelle, celle où l'on est censé parler avec son cœur et dire tout le bien des personnes qui nous ont entouré. Je vais donc la faire à mon image c'est-à-dire plutôt incompréhensible pour quiconque n'aurait pas les références (d'ailleurs merci A. Astier pour cette sublime série qui m'a de nombreuses fois remontée le moral). Pour ceux qui auraient appris à lire (même si vous ne souhaitez ça à personne) et pour tous les autres munis d'un interprète (« interprète ? interprète ? Cuillère ! ») profitez de ces quelques lignes.

Tout d'abord je tiens à m'excuser et à préciser que, pour les non-initiés, concernant ce sujet « le premier truc qui frappe c'est la langue ». En fait c'est quand on entend parler que là, là on se dit « je ne suis pas chez moi ». Vous m'direz : et le but dans tout ça si on ne le comprend pas ? je dirai en tout simplicité, que c'est de répondre à la question : « Si la mémoire est à la tête ce que le passé, peut-on y accéder à six ? : Oui/non/ zbradaraldjan ».

Débute alors un combat psychologique (« non psychologique c'est tout ce qui est à la campagne non ? »). Avec l'aide très précieuse de mes acolytes, il apparait très vite que ce sujet s'apparente à décrypter la machine Enigma pour moi avec pour code possible « les framboises sont perchés sur le tabouret de mon grand-père ».

C'est donc pour m'avoir aidé à surmonter les différentes épreuves que je tiens à remercier avant tout mes précieuses collègues : Ksénia toujours présente pour les précieuses pauses café ainsi que Rania toujours partante pour une petite excursion touristique (non pardon pour un shooting photo).

Diana, merci à toi qui a une patiente (qui se mange sans sauce) et une bienveillance à toute épreuve. Tu es devenue bien plus qu'une collègue et je suis reconnaissante de te compter dans mes amies.

Aude, je ne saurai où commencer mais mille fois merci pour ton support, tes conseils et toutes nos après-midi jeux si importantes au moral. Margarida, merci pour ton sourire et ta bonne humeur si communicatifs. Justine, que dire à part que j'espère ne pas te mettre en rogne comme une enseignante en disant que tu es une de mes plus précieuses rencontres et que tu mérites réellement d'être considéré en tant que tel. Enfin à toi Cora, sans qui les journées semblaient bien longues et ternes, ne t'arrête jamais de rire c'est ta force alors fait tous les jours comme si Mr Michel était au drive avec nous ! Pour tous les collègues non cités, je tiens à vous dire que vous êtes tout aussi indispensables que peuvent l'être Berléwenn, Jazbaltrine, mais aussi Patanouk et Gerciflet ainsi que Kijou (ou Quichou).

Vous le verrez par la suite de ce manuscrit mais l'objet de mes études pouvant être qualifié d'objet redondant, il m'a fallu beaucoup de support de mon entourage pour l'aborder par la partie sporadique (ou boulière) dans le but de le transmettre aux altruistes.

Cela peut paraître futile mais merci à tous mes acolytes à 4 pattes qui m'ont fait comprendre que le plus important est d'apporter du bonheur pour mieux en connaître la valeur et l'apprécier : Musly, Haribo, Maïs, Starbuck, Bill, Lucky, Félicie, Mimousse, Luna, Macadamia.

A vous mes chers amis, je tiens à grandement remercier pour leur support infaîble et surtout pour les nombreuses soirées déjantées : la team Saghira Panuklu.

Clément merci pour ton soutien toujours en décalé de plus ou moins quelques semaines mais précieux. Par ce que tout le monde le sait, je ne serai rien sans mon autre moitié de cerveau, un incroyable merci et encore plus à toi Léa !!! Je crois que ça y est maintenant je suis prête pour encore plus de voyages, encore plus de bêtises et surtout encore plus de mojitos !! Merci pour ton soutien et ta joie de vivre sans faille.

Merci à tous mes amis de par le monde, qui m'ont soutenu par des messages - des photos- des visios et à qui j'ai un jour promis de venir ou revenir les voir, préparez-vous je vais bientôt arriver !

Evidement la partie remerciements ne serai rien sans un mot à la famille (de sang ou de cœur). Alors par où commencer ? Merci à toute la famille Polder sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Vous le savez déjà, mais merci pour nous avoir soutenus dans les moments les plus durs de notre vie. Encore maintenant, je sais que je peux compter sur vous en toute circonstance.

Merci aussi à Marie toujours partante pour une sortie/soirée et qui humainement me comprend si facilement et sait comment retranscrire tout cela .

Evidement merci à toi Jean-Louis (#JLS #Mrrépartout) qui ma redonner l'espoir et la motivation sur tellement de choses et fait tellement rire avec tes blagues plus ou moins bonnes mais toujours les bienvenues !

Rémy, tu sais très bien que je ne suis pas douée pour parler sentiments mais tu mérites un énorme merci pour tout ce que tu as enduré pendant ces 3 ans mais qui n'a jamais fait faiblir ton soutien et toutes les paroles réconfortantes que tu as pu me dire lors des nombreux, o si nombreux, moments de doutes et désespoirs.

Enfin, les plus proches et plus importantes personnes pour moi, ma mère et mes grands-parents, avec qui et grâce à qui j'ai surmonté tant d'épreuves. Je vous adresse un merci infini et bien plus encore car

vous êtes la raison pour laquelle je dépose et soutient cette thèse. Je ne serai pas moi, je ne serai pas forte ni courageuse ou persévérante si je n'avais pas eu vos exemples.

Tout ça pour dire qu'à chaque avancée, chaque petite victoire ou je pouvais dire « Et toc ! remonte ton slibard Lothar ! », se cache un pignouf cher à mon cœur.

En dernier lieu je tiens à préciser qu'à force de se saigner aux quatre fromages jusqu'à souffrir d'hypolipémie, j'en suis venue à la conclusion que la joie de vivre et le jambon, il n'y a pas trente-six recette du bonheur.

Quelques citations importantes à mes yeux.

« Vis aujourd'hui, comme si c'était le dernier jour
et fais des projets comme si tu étais là pour
l'éternité. »

Dix petits nègres, Agatha Christie

« Je n'ai plus de patience pour certaines choses.
Non pas car je suis devenue arrogante mais tout
simplement par ce que je suis arrivée à un point
dans ma vie où je ne veux pas perdre plus de temps
avec ce qui me blesse ou avec ce qui me déplaît. »

Meryl Streep

« Le fait bien réel que les animaux, par la peine qu'ils
endurent dans les expériences, contribuent
tellement à diminuer la souffrance de l'humanité,
indique que nous devrions forger une nouvelle et
unique solidarité entre eux et nous. Pour cette seule
raison, il incombe à chacun d'entre nous de faire le
bien pour toute forme de vie non-humaine. »

Albert Schweitzer Prix Nobel de la paix en 1952.

« De tous nos actes, seuls ceux que nous
accomplissons pour les autres en valent
véritablement la peine. »

Lewis Carroll

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des abréviations	3
Introduction.....	7
Chapitre I : La toxoplasmose dans le monde	7
A. Historique et classification	7
B. Prévalence et génotypes.....	8
Chapitre II : <i>Toxoplasma gondii</i> responsable d'une zoonose.....	11
A. Cycle de vie de <i>T. gondii</i>	11
1) La phase sexuée.....	11
2) La phase asexuée.....	12
B. Voies de transmission.....	13
C. Manifestations cliniques	13
1) En cas d'immunocompétence chez l'Homme	13
2) En cas d'immunodéficience chez l'Homme	14
3) La toxoplasmose animale	15
D. Immunité et efficacité de traitements contre <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1) Dynamique de l'immunité de l'Homme après infection par <i>T. gondii</i>	15
2) Les stratégies de lutte existantes	17
Chapitre III : Ultrastructure du tachyzoïte.....	21
A. Complexe apical et cytosquelette	21
1) Le conoïde	21
2) La pellicule	22
3) Les organelles sécrétrices.....	23
a) Les micronèmes.....	23
b) Les rhoptries	23
c) Les granules denses	24
B. Apicoplaste et mitochondrie : une origine endosymbiotique.....	24
1) La mitochondrie.....	25
2) L'apicoplaste.....	25
3) Maturation et export de protéines vers les organelles endosymbiotiques	26
a) Adressage à la mitochondrie	26
b) Adressage à l'apicoplaste	27
Chapitre IV : cycle lytique du tachyzoïte	29

A. Invasion de la cellule hôte	29
B. Réplication intracellulaire.....	29
1) La phase de croissance et réplication du génome	30
2) Mitose et cytokinèse	30
C. Sortie	31
Chapitre V : métabolisme au sein de l'apicoplaste de <i>T. gondii</i>	33
A. Apicoplaste et mort retardée	33
B. Voie de synthèse des acides gras	34
C. Voie de synthèse des isoprénoides	35
D. Voie de synthèse de l'Hème	36
E. Biosynthèse des protéines à centre Fer-soufre.....	39
Chapitre VI : voies de synthèse des protéines à centre Fer-Soufre	41
A. Les centres [Fe-S].....	41
B. Transfert d'électron et rôle des centres [Fe-S]	42
C. Biochimie de la synthèse des centres [Fe-S]	43
1) Les cystéines désulfurases.....	44
2) Les protéines d'assemblage et protéines chaperonnes	44
3) Les protéines de transport	45
4) Les apoprotéines cibles des centres [Fe-S].....	46
D. Organisation et régulation de la voie de synthèse des protéines à centres [Fe-S]	47
1) Au sein des bactéries	47
2) Importance des protéines à centre [Fe-S] pour les cellules humaines	48
3) Importance des centres [Fe-S] chez les plantes	49
4) Ce qui est connu chez les apicomplexes	51
Résultats	55
Chapitre I : identification et caractérisation de deux protéines putatives des voies de biosynthèse Fe-S chez <i>T. gondii</i>	55
A. Introduction.....	55
B. Differential contribution of two organelles of endosymbiotic origin to iron- sulfur cluster synthesis and overall, in <i>Toxoplasma</i>	56
C. Conclusions et perspectives	115
Chapitre II : Caractérisation de l'ATPase SufC	117
A. Conservation de la fonction ATPase au cours de l'évolution.....	117
B. Localisation et impact sur le cycle lytique de <i>T. gondii</i>	118
1) Localisation de la protéine TgSufC	118
2) Genèse d'un mutant conditionnel de TgSufC.....	119

C. La perturbation de l'expression de SufC impacte la réplication du parasite.	121
1) Impact de la perte de TgSufC sur la croissance et la réplication.....	121
2) TgSufC est importante pour l'intégrité de l'apicoplaste.	123
D. SufS et SufC : un impact sur les lipides et les membranes ?	124
1) La dérégulation de la voie SUF entraîne une perturbation de lipoylation de la sous-unité E2 de la PDH apicoplastique.....	124
2) Analyse morphologique et lipidomique et de <i>T. gondii</i>	125
a) Intégrité membranaire des mutants TgSufS et TgSufC.	125
b) Biosynthèse des acides gras et analyse lipidomique pour le mutant TgSufC.	127
E. Production d'un nouvel anticorps dirigé contre l'apicoplaste de <i>T. gondii</i>	128
2) Production et purification de protéines recombinantes de la machinerie [Fe-S].....	128
3) Activité de TgSufC.....	131
4) Un nouvel anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'apicoplaste.	132
F. Conclusion	133
Matériels et méthodes	135
Discussion	141
Machinerie des protéines à centre fer-soufre, métabolisme mitochondrial et différenciation.....	143
La voie SUF est importante pour l'homéostasie lipidique.	145
La voie SUF, au carrefour de plusieurs voies métaboliques importantes dans l'apicoplaste ?	147
Conclusion	149
Annexes :	147
Références.....	162

Liste des figures

Figure 1: Arbre phylogénétique hypothétique des apicomplexes ⁶	8
Figure 2: Distribution géographique des souches de <i>T. gondii</i> dans le monde ⁸	10
Figure 3: Le cycle de vie de <i>Toxoplasma gondii</i> ²⁰	11
Figure 4: Cycle lytique de <i>T. gondii</i> ^{23,24}	12
Figure 5: Arbre de transmission des oocystes de <i>Toxoplasma gondii</i> ²⁶	13
Figure 6: Réponse immunitaire de l'hôte à une infection par <i>T. gondii</i> ⁴⁰	16
Figure 7: Récapitulatif des antigènes impliqués dans un, deux ou trois stades de <i>T. gondii</i> ⁴³	17
Figure 8: Voies parasitaires ciblées par les médicaments anti <i>T. gondii</i> en usage clinique ⁴⁸	18
Figure 9: Ultrastructure d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i> ⁵²	21
Figure 10: Représentation du complexe apical d'un tachyzoïte de <i>T. gondii</i> ⁶⁰	22
Figure 11: Cytosquelette et mécanisme de glissement d'un tachyzoïte ^{59,64}	23
Figure 12: Schéma de l'endosymbiose secondaire à l'origine de l'apicoplaste présent dans le phylum des Apicomplexes ⁸¹	25
Figure 13: Modèle d'importation des protéines d'apicoplastes via un possible système de sécrétion et la machinerie ERAD ¹¹¹	28
Figure 14: Chronologie des phases du cycle lytique de <i>T. gondii</i> ⁸⁹	30
Figure 15: Réplication des organelles durant le cycle cellulaire de <i>T. gondii</i> ¹¹⁵	31
Figure 16: Activation de la sortie de la cellule hôte par <i>T. gondii</i> ¹¹⁷	32
Figure 17: Fonctions biologiques principales hébergées par l'apicoplaste ¹²⁷	33
Figure 18: Mécanisme de synthèse des acides gras commun aux trois voies de biosynthèse ¹³⁶	35
Figure 19: Voie de biosynthèse des isoprénoides ¹³¹	36
Figure 20: Synthèse de l'hème et métabolisme de <i>T. gondii</i> ^{123,147}	38
Figure 21: Structures et fonctions des principaux centres fer-soufre dans la nature ¹⁵⁷	39
Figure 22: Schéma général de la voie de biosynthèse des centres [Fe-S] ¹⁷³	43
Figure 23: Régulation des opérons gouvernant les voies ISC et SUF présents chez <i>E. coli</i> ^{172,174}	48
Figure 24: Régulation de l'homéostasie du fer des cellules eucaryotes ^{186,188}	49
Figure 25: Exemples d'impacts liés à l'expression de protéines à centres [Fe-S] chez les plantes.....	51
Figure 26: Alignement de séquences codant pour l'ATPase SufC de <i>E. coli</i> ainsi que son homologue putatif chez <i>T. gondii</i>	117
Figure 27: Cinétique de croissance des bactéries <i>E. coli</i> mutantes et complémentées.....	118
Figure 28: Génération d'un mutant TgSufC étiqueté triple HA.....	119
Figure 29: Génération d'une lignée de parasites mutants conditionnels cKD TgSufC-HA.....	120
Figure 30: Génération de la lignée complémentée de TgSufC.....	121
Figure 31: Régulation de l'expression de SufC et impact sur le cycle lytique de <i>T. gondii</i>	122
Figure 32: Test de réplication et décompte de parasites par vacuoles.....	122
Figure 33: La perte de SufC entraîne un défaut d'intégrité de l'apicoplaste.....	123
Figure 34: Immunoblot attestant de l'état de lipoylation de la sous unité E2 de la pyruvate déhydrogénase (PDH) chez <i>T. gondii</i>	124
Figure 35: Analyses morphologiques des membranes de <i>T. gondii</i> : déplétion de TgSufC/SufS et défauts membranaires.....	127
Figure 36: analyse du répertoire lipidique de TgSufC.....	128
Figure 37: Expression des protéines recombinantes TgSufS/C/E.....	129
Figure 38: Gels de coomassie post- purification et dialyse de TgSufC.....	130
Figure 39: courbes d'activité de TgSufC d'après un test colorimétrique au vert de malachite.....	131
Figure 40: Vérification par IFA de l'action de l'anticorps anti-TgSufC.....	132

Figure 41: schéma résumant les phénomènes observés lors de l'absence des protéines TglscU (mitochondrie), TgSufS ou TgSufC (apicoplaste).	134
Figure 42: Protéines homologues putatives d'IspG et IspH de E. coli chez différents organismes végétaux et apicomplexes.	147

Liste des abréviations

A	Apicoplaste
ABA	Acide abscissique
AID	Système de dégradation inductible par l'auxine
AMA1	Antigène 1 de la membrane apicale
APR	Anneau polaire apical
ATG8	Protéine 8 liée à l'autophagie
ATM	Transporteurs mitochondriaux de type ABC
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Cytokinèse
c	Conoïde
cAMP	Cyclic adenosine 3'5'-monophosphat
Cas9	CRISPR associated protein 9
Cdk	Kinase dépendante de la cycline
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CIA	Assemblage cytosolique de centres fer-soufre
CPA	Cellule présentative d'antigène
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cys	Cysteine
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Cellule dendritique
DG	Granule dense
DMAPP	Diphosphate de diméthylallyle
DMEM	Milieu Eagle modifié de Dulbecco
DNA	Acide désoxyribonucléique

ER	Réticulum endoplasmique
ERAD	Dégradation associée au reticulum endoplasmique
FACS	Triage cellulaire activé par fluorescence
FBS	Sérum de veau fetal
Fe-S	Centres fer-soufre
FH	Homologue de la frataxine
FPNs	Ferroportines
FPP	Farnésyl-pyrophosphate
FRTs	Ferritines
FYVE	Domaine Fab, 1YOTB, Vac 1 EEA1
Fxn	Frataxine
G	Phase Gap
GAP	Protéine associée au glideosome
GBPs	Protéine de liaison au guanylate
GFP	Protéine de fluorescence verte
GGPP	Géranylgéranyl-pyrophosphate
GPI	Glycosylphosphatidyl inositol
GRAs	Protéines de granules denses
GTPase	Guanosine triphosphatase
HA	Hémagglutinine de la grippe humaine
HFF	Fibroblastes de prépuce humain
His	Histidine
IB	Immunoblot
IFA	Immunofluorescence
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine

IM	Membranes internes
IMC	Complexe membranaire interne
IP3	Inositol triphosphate
IPP	Isopentényl-pyrophosphate
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRGs	GTPases liées à l'immunité
IRP1/2	Protéines régulatrices du fer 1 et 2
ISC	Iron-Sulfur Cluster
IscR	Répresseur d'ISC
LipA	Lipoate synthase
M	Mitochondrie
m	Micronèmes
M Φ	Macrophage
MACPF	Domaine d'attaque membrane/perforine
MEP/DOXP	Voie indépendante du mévalonate
MIC	Protéine de micronème
MIC	Protéine de micronèmes
MJ	Jonction mobile
MTOC	Centre d'organisation des microtubules
N	Noyau
NIF	Fixation du nitrogène
NK	Lymphocytes natural killer
NTA	Acide nitrilotriacétique
O ₂	Oxygène
OM	Membranes externes
PDH	Pyruvate déshydrogénase

PKG	Protéine kinase G
PLP1	Protéine de type perforine 1
PM	Membrane plasmique
PNN	Neutrophiles polynucléaires
PPC	Compartiment périplastidien
PV	Vacuole parasitophore
R	Rhoptries
RONs	Protéines du col des rhoptries
ROPs	Protéines du bulbe des rhoptries
ROS	Réactifs à l'oxygène
SAGs	Antigènes de surface
SNP	Protéines du réseau sous pelliculaire
SOD	Superoxyde dismutase
SUF	Facteur d'utilisation du soufre
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique
Tet-OFF	Système tetracycline-off
Tg	Toxoplasma gondii
TIC	Translocon des membranes internes de chloroplaste
TIM	Translocase de la membrane interne
TLR	Toll like receptor
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale
TOC	Translocon des membranes externes de chloroplaste
TOM	Translocase de la membrane externe
TP	Peptide de transit
YFP	Protéine de fluorescence jaune

Introduction

Chapitre I : La toxoplasmose dans le monde

A. Historique et classification

La première description de *T. gondii* fut faite il y a plus d'un siècle, en 1908, à Tunis par Nicolle et Manceaux¹. Au même moment, une observation similaire est faite au Brésil par Splendore². Tout d'abord associé au genre *Leishmania sp*, ce protozoaire parasite est nommé par la suite *Toxoplasma* de par sa forme arquée (du grec *toxos*= arc ; *plasma*= forme). Quant au nom d'espèce, il se rapporte à l'hôte dans lequel le parasite a été observé en Afrique : le gondii (un petit rongeur de la famille des Ctenodactylidae), donnant alors *Toxoplasma gondii*³. Ce n'est qu'en 1939 qu'il est identifié comme agent de la toxoplasmose par Wolf, Cowen et Paige⁴.

Dans les années 1970, *T. gondii* est reconnu comme faisant partie de la classe des Coccidies, il est désormais établi qu'il fait partie du phylum des apicomplexes et rejoint alors environ 6000 espèces de protistes parasites. Ce phylum comprend plusieurs classes : Coccidies, Cryptosporidies, Grégarines, et Hématozoaires⁵ (**Figure 1**).

La plupart des espèces au sein du phylum des apicomplexes, sont des parasites intracellulaires obligatoires. Cette généralité ne s'applique cependant pas pour la classe des Grégarines. Le réservoir d'hôtes pouvant être infecté par ces différentes classes de parasites est très diversifié puisque l'on retrouve aussi bien des vertébrés et invertébrés qu'ils soient terrestres ou marins. La grande majorité de ces parasites a un cycle de vie complexe faisant intervenir plusieurs hôtes⁶. Mais ils sont différents en ce qui concerne les modes d'invasions et de transmission ainsi que pour leur tropisme cellulaire.

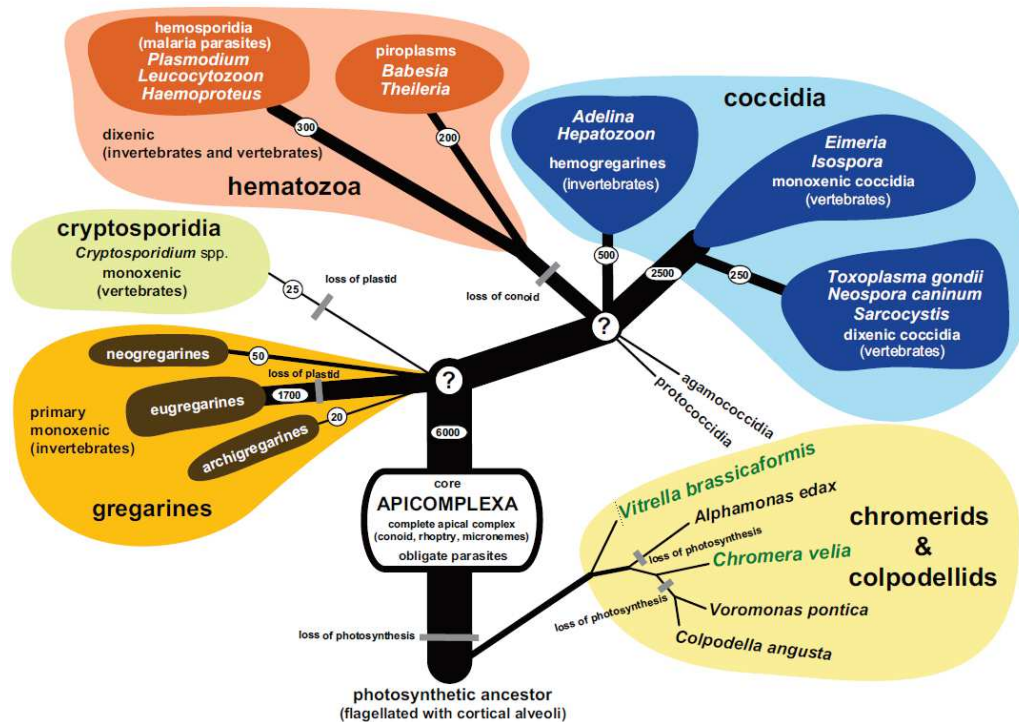


Figure 1: Arbre phylogénétique hypothétique des apicomplexes⁶.

B. Prévalence et génotypes

T. gondii est un parasite ubiquitaire qui infecte près d'un tiers de la population mondiale^{7,8}.

L'identification des génotypes de *T. gondii* a permis de déterminer que les souches prélevées en France ainsi qu'aux Etats-Unis d'Amérique sont des clones issus de trois lignées différentes classées selon leur virulence chez la souris : type I, II et III^{9,10}.

Il existe une certaine disparité géographique concernant ces différentes souches de *T. gondii*¹¹. En effet, en Europe le type II est majoritaire avec une prévalence de 69.4% mais l'on retrouve aussi, en plus faible proportion, le type III (**Figure 2**)⁸. Concernant le type I, il est localement très présent autour du bassin méditerranéen^{12,13}.

De même, en Amérique du Nord, l'étude d'isolats cliniques révèle que le type II serait lui aussi majoritaire (47,4% de prévalence) suivi par le type I responsable de 19,6% des infections⁸.

Si ces souches-là représentent la majorité de celles retrouvées lors d'infections en Europe ou en Amérique du Nord, il existe une plus grande disparité de souches sur les autres continents⁸. Des études menées en Afrique et Asie démontrent une majorité de cas dus à des souches appartenant à des lignées clonales régionales (comme *Chinese 1* ou *Africa 1* et 3)^{8,12,14,15}.

La prédominance des types I, II et III ne s'applique pas non plus pour l'Amérique du Sud où on observe une diversité génétique très élevée. Ces nouveaux génotypes, découverts plus récemment, sont décrits comme atypiques ou exotiques¹⁶.

Une forte prévalence est observée dans des zones au climat chaud et humide, mais ce paramètre n'est pas le seul pouvant influencer le taux de personnes infectées. En effet, le régime alimentaire ou les coutumes de certains pays¹⁷, ainsi que la promiscuité de vie entre humains et animaux, peuvent influencer les infections zoonotiques¹⁸. Un facteur important dans la dissémination de *T. gondii* concerne sa capacité à infecter un grand nombre d'espèces animales en plus de l'Homme. La toxoplasmose étant une maladie zoonotique, la prévalence du parasite au sein des animaux sauvages et domestiques, doit être prise en compte afin de mieux comprendre les possibles écarts de prévalence entre chaque pays.

Le fait que l'on retrouve des souches très différentes en fonction des zones géographiques étudiées, peut aussi être dû à des flux migratoires d'animaux comme les oiseaux, qui peuvent également être des hôtes intermédiaires de *T. gondii*.

A l'exemple de l'activité migratoire, il faut également noter la présence de nombreuses espèces de félins sauvages en Amazonie comme étant un facteur potentiellement responsable de la forte diversité génétique observée en Amérique du Sud. En effet comme nous allons le voir par la suite, les félins sont l'hôte définitif du parasite, et les félins sauvages peuvent couvrir un territoire important. Ils pourraient donc servir d'hôtes à des souches variées issues de territoires géographiques distincts, et donc de contribuer à la grande diversité génétique des souches Sud-Américaines de *T. gondii*¹².

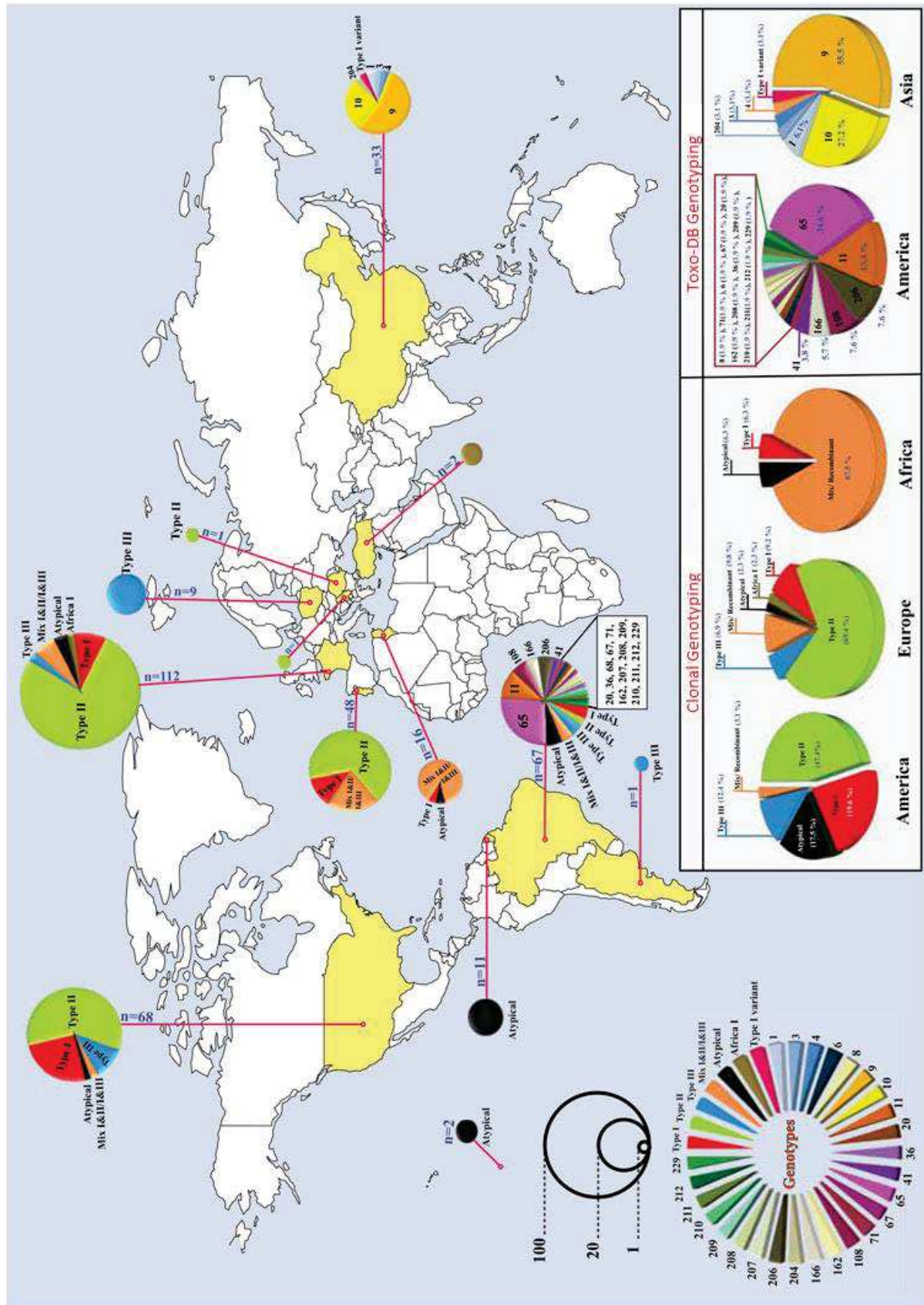


Figure 2: Distribution géographique des souches de *T. gondii* dans le monde⁸.

Chapitre II : *Toxoplasma gondii* responsable d'une zoonose

A. Cycle de vie de *T. gondii*

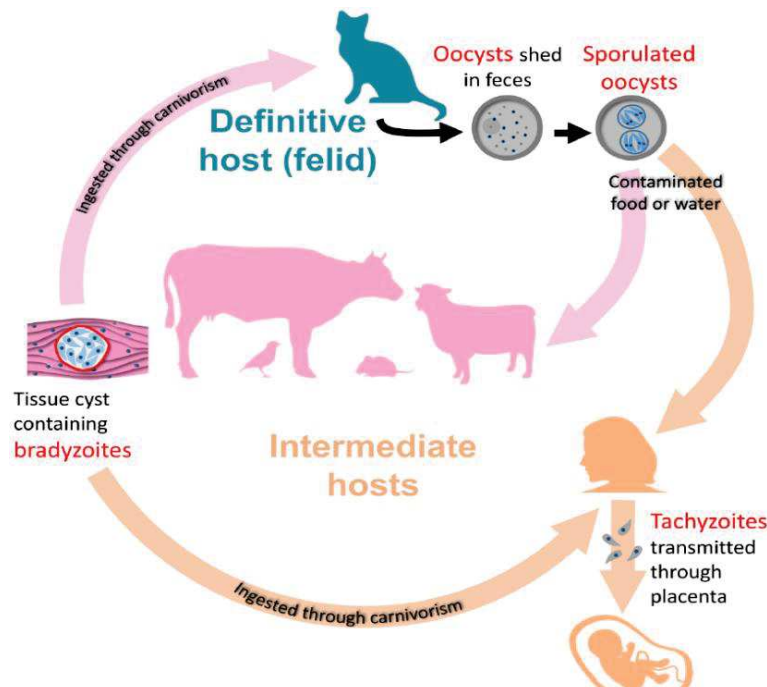


Figure 3: Le cycle de vie de *Toxoplasma gondii*²⁰

T. gondii est un parasite ubiquitaire pouvant infecter quelques 350 espèces différentes d'hôtes incluant des mammifères tout comme des oiseaux¹⁹.

Le parasite a un cycle hétéroxène, qui suit le rythme des relations proie-prédateur.

Le cycle complet se décompose en deux phases : une sexuée chez l'hôte définitif et une asexuée chez un hôte intermédiaire étant un vertébré homéotherme (**Figure 3**).

1) La phase sexuée

La partie du cycle comportant la phase de reproduction sexuée de *T. gondii*, se déroule chez l'hôte définitif : les félinés (sauvages comme domestiques)²⁰. La majeure partie des infections chez les félinés est due à l'ingestion d'une proie infectée contenant des kystes de *T. gondii*. La paroi de ces formes enkystées est par la suite lysée dans leur système digestif, ce qui libère la forme bradyzoïte. Les nombreux parasites libérés peuvent alors infecter tous types de cellules nucléées²¹ dont les cellules épithéliales de l'intestin afin d'entamer leur phase de multiplication nommée schizogonie.

Les schizontes ainsi formés conduisent à la formation de mérozoïtes pouvant alors se différencier en gamètes mâles (microgamètes qui sont flagellés) et femelles (macrogamètes). Les gamètes pourront alors fusionner pour former des zygotes diploïdes. La forme fécondée, mais immature (oocyste non sporulé), est alors entourée par une paroi.

Cette barrière permet à l'oocyste de résister à l'environnement extérieur lors de son élimination avec les fèces du félin (couramment le chat). Un seul chat peut rejeter plus de 100 millions d'oocystes pouvant devenir infectieux²². La maturation des oocystes par sporulation survient cinq jours après leur libération dans l'environnement. Les oocystes contiennent alors chacun huit sporozoïtes infectieux

pouvant survivre pendant une longue période allant jusqu'à plus de un an si les conditions sont favorables²³.

2) La phase asexuée

La phase asexuée du cycle débute lorsqu'un oocyste infectieux est ingéré par un hôte intermédiaire vertébré à sang chaud (oiseau ou mammifère dont l'Homme). Elle peut avoir lieu dans toutes les cellules nucléées de l'organisme.

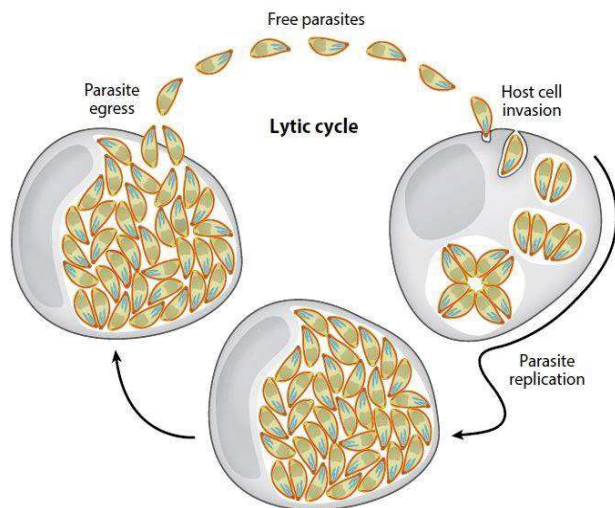


Figure 4: Cycle lytique de *T. gondii*^{23,24}

Après ingestion, l'oocyste libère les sporozoïtes pouvant alors devenir des tachyzoïtes (forme virulente du parasite). *T. gondii* étant un parasite intracellulaire obligatoire, le tachyzoïte va pouvoir survivre à court terme dans le milieu extracellulaire, mais pour que la prochaine phase de prolifération puisse avoir lieu il devra envahir une cellule nucléée (**Figure 4**).

Lors du processus d'invasion, le parasite forme une vacuole parasitophore (PV) issue en partie de membrane de la cellule hôte. Au sein de cette

structure protectrice, les formes tachyzoïtes de *T. gondii* vont alors se répliquer par endodyogénie : les cellules filles sont produites au sein de la cellule mère qui disparaît à l'issue de la complétion des cellules néoformées. Chaque parasite permet donc la formation de deux parasites après chaque cycle de réplication. Après plusieurs cycles de multiplication consécutifs, la cellule hôte va être lysée lors de la sortie des tachyzoïtes. Ces tachyzoïtes peuvent alors infecter de nouvelles cellules. La destruction cellulaire et tissulaire engendrée par la multiplication rapide du parasite lors de la phase aiguë est à l'origine des symptômes de la toxoplasmose.

Sous la pression du système immunitaire, lors de la phase chronique de l'infection, de très importants changements surviennent : la forme tachyzoïte se différencie en une forme latente appelée bradyzoïte. La composition de la PV change afin de former une paroi de kyste et de limiter les interactions avec le système immunitaire de l'hôte.

Ces deux formes répliquatives de *T. gondii* se démarquent aussi par quelques changements morphologiques comme l'emplacement plus basal du noyau, une plus grande quantité de micronèmes (organelles sécrétoires) ainsi que la présence de nombreuses granules d'amylopectine chez les bradyzoïtes²⁴.

La caractéristique la plus importante départageant les deux formes, concerne le rythme de multiplication des parasites qui est bien plus lent chez les bradyzoïtes²⁵. Lors d'une réactivation, les bradyzoïtes pourront être libérés afin de se différencier en tachyzoïtes.

B. Voies de transmission

Toxoplasma existe donc sous trois formes infectieuses : les sporozoïtes (issus de l'oocyste), les tachyzoïtes (formes invasives) et les bradyzoïtes (formes quiescentes). De manière générale, la transmission de l'hôte définitif à l'hôte intermédiaire se fait par ingestion d'aliments et d'eau souillés par des oocystes²⁶. De même une transmission vers l'hôte définitif passe par la prédation et l'ingestion de la proie contaminée²³. Une importante voie de transmission du parasite, ne permettant cependant pas la complétion immédiate du cycle, se fait entre hôtes intermédiaires (**Figure 5**).

En effet, le parasite peut être transmis à un nouvel hôte tel que l'Homme par ingestion de viande animale infestée contenant des bradyzoïtes, voire potentiellement par ingestion de lait non pasteurisé contenant des tachyzoïtes. De plus, une transmission verticale peut subvenir entre la mère et le fœtus par passage de la barrière placentaire²⁷ (**Figure 3**).

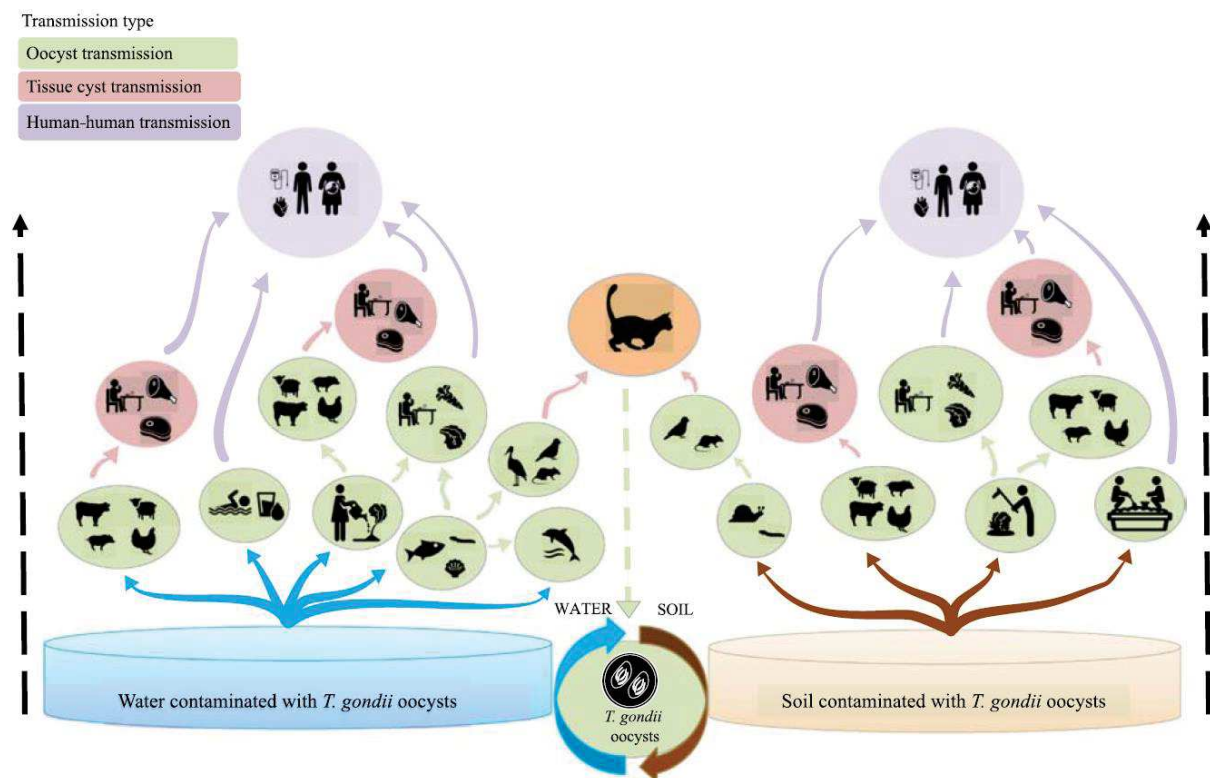


Figure 5: Arbre de transmission des oocystes de *Toxoplasma gondii*²⁶

C. Manifestations cliniques

1) En cas d'immunocompétence chez l'Homme

Lors d'une infection par *T. gondii*, la gravité des symptômes peut varier en fonction de l'état immunitaire du patient ainsi que de la virulence de la souche à l'origine de l'infection. Celle-ci est généralement asymptomatique et sans conséquence. L'infection peut parfois entraîner quelques symptômes bénins pour le patient en bonne condition physique comme des courbatures, maux de tête, fatigue et fièvre²⁸.

Après une première phase d'infection, de multiplication et dissémination active du parasite (phase aiguë), le système immunitaire de l'hôte permet en général de contrôler l'infection. Lors d'une seconde phase le parasite va alors persister sous forme enkystée au sein d'organes de son hôte tels que le cerveau ou les muscles (phase chronique).

2) En cas d'immunodéficience chez l'Homme

Une infection par *T. gondii* peut se révéler dangereuse si le patient souffre d'une déficience du système immunitaire telle qu'une préalable infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ou lors d'une immunosuppression dans le contexte d'une transplantation d'organe. La faiblesse du système immunitaire est alors une aubaine pour le parasite pouvant se répliquer de façon non contrôlée, ce qui peut entraîner de graves conséquences : encéphalite, pneumonie, myocardite voire une hépatite pouvant aboutir à la mort du patient.

Une primo infection au cours d'une grossesse peut se propager au fœtus dans approximativement 30% des cas et peut avoir de graves conséquences pour celui-ci²⁹. En France, la transmission de l'infection est estimée à 1 cas pour 1000 naissances. En effet, le parasite a la capacité de passer la barrière placentaire et peut donc infecter le fœtus, ce phénomène de transmission est nommé toxoplasmose congénitale. La sévérité de l'infection dépend de plusieurs facteurs : la virulence de la souche parasitaire, le moment de la gestation où intervient l'infection, et donc des facteurs comme la maturité immunitaire du fœtus, ainsi que l'état immunitaire de la mère³⁰.

La probabilité d'une infection lors du premier trimestre de grossesse est faible mais peut alors entraîner de graves problèmes de santé au niveau du système nerveux central tels que des hydrocéphalies, une calcification intracrânienne, un ictère et parfois même, aboutir à une fausse couche. Une transmission survenant plus tard au cours de la grossesse a généralement des conséquences moindres sur le fœtus. Des futures réactivations peuvent cependant se déclarer chez des adultes nés avec une toxoplasmose congénitale³¹.

3) La toxoplasmose animale

Toxoplasma gondii est un parasite responsable d'une zoonose, il est donc présent dans diverses espèces animales jouant un rôle essentiel dans la transmission à l'Homme. Ces divers hôtes intermédiaires peuvent être des espèces animales terrestres ou marines, et aussi bien domestiques que d'élevages ou sauvages^{26,32}. Les félins, domestiques et sauvages^{16,18}, jouent un rôle important dans l'infection des hôtes intermédiaires terrestres ou marins, de par la charge d'ocystes qu'ils libèrent dans l'environnement³³. Il existe une corrélation directe entre la présence de félinidés et la séroprévalence de *T. gondii* chez les hôtes intermédiaires¹⁶. Pour les animaux domestiques couramment infectés, en particulier les chats, l'infection n'entraîne que peu de symptômes mais, cela fait de ces espèces un réservoir du parasite non négligeable^{18,34,35}.

De même, les animaux d'élevage ou de ferme peuvent contracter l'infection en fonction de plusieurs paramètres, comme les conditions d'élevage spécifiques à chaque espèce³⁴. En effet, il a été montré que la taille du cheptel ainsi que la présence de rongeurs, impliquant donc des prédateurs tels que les félins, ou l'absence de contrôle sanitaire, engendrent un risque pour le bétail d'être infecté par *T. gondii*³². Ceci est largement vérifié si l'on prend l'exemple de porcs issus d'élevages confinés et contrôlés qui ont une prévalence pour *T. gondii* de seulement 1%, contrairement aux porcs élevés en liberté où la prévalence peut atteindre 60%³².

Tout comme la toxoplasmose humaine, lorsqu'un animal est infecté il peut ne pas développer de symptômes, notamment chez les petits mammifères tels que les rongeurs³⁶. Cependant, il peut également subvenir des avortements dus à une toxoplasmose congénitale³⁶⁻³⁸. Donc, en plus d'un impact sur la santé humaine, la toxoplasmose animale peut également causer des pertes économiques considérables pour les éleveurs³⁸. La toxoplasmose du bétail peut avoir un impact important sur la santé humaine puisque des infections peuvent survenir après ingestion de viande contaminée mal cuite ou même de lait non pasteurisé. Même des animaux n'étant pas supposés être homéothermes comme les poissons ou des mollusques peuvent contenir des ocystes³⁹ et être éventuellement une voie de contamination pour l'Homme.

D. Immunité et efficacité de traitements contre *Toxoplasma gondii*

1) Dynamique de l'immunité de l'Homme après infection par *T. gondii*

L'infection par *T. gondii* induit une réponse immunitaire complexe faisant intervenir à la fois immunité humorale et cellulaire. La réponse immune permet de contrôler aussi bien l'infection aiguë que chronique.

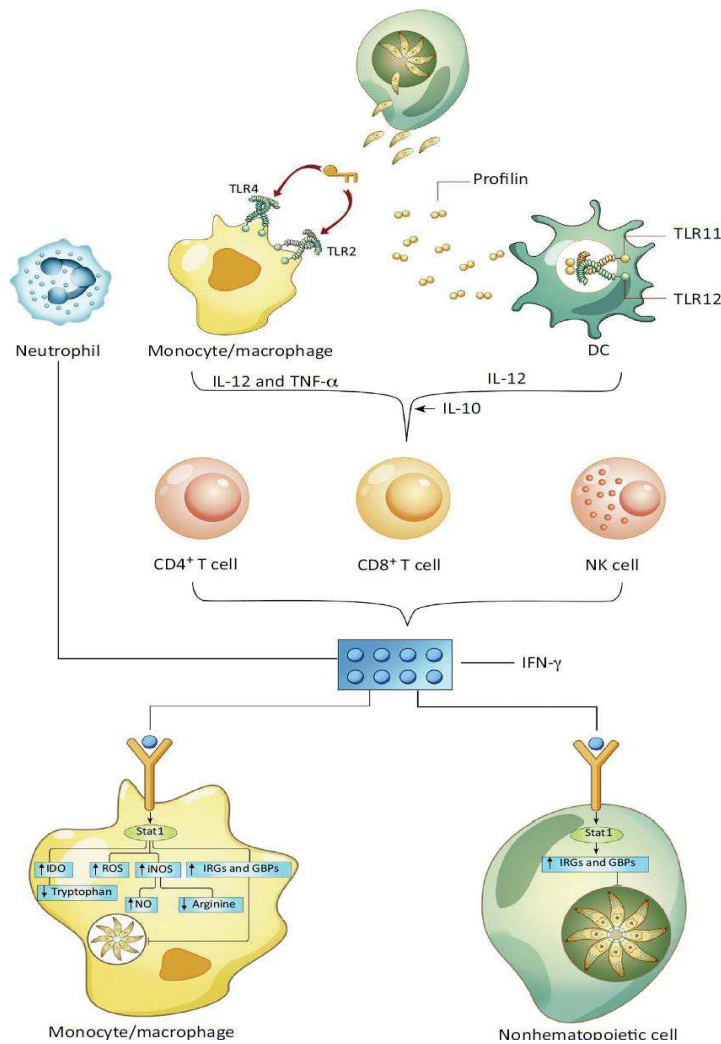


Figure 6: Réponse immunitaire de l'hôte à une infection par *T. gondii*⁴⁰

l'activation des macrophages mais aussi de cellules non-hématopoïétiques (**Figure 6**).

L'IFN- γ va engendrer plusieurs réponses qui vont ralentir la croissance des parasites ou entraîner leur élimination. Un mécanisme général, présent à la fois dans les macrophages mais aussi dans les cellules non-hématopoïétiques, inclut la stimulation de la production des protéines de liaison au guanylate (GBPs) ainsi que de GTPases liées à l'immunité (IRGs). Ces protéines vont alors dégrader la PV³⁷. Dans les macrophages, des mécanismes additionnels de contrôle incluent l'induction d'un stress oxydatif ou la carence en nutriments⁴². Par la même occasion, l'action du TNF- α (tumor necrosis factor) sur les macrophages infectés permet une clairance des parasites par fusion de lysosomes avec la PV³⁷. Ces processus permettent d'éliminer une grande partie des formes tachyzoïtes, mais l'initiation de la réponse immunitaire adaptative déclenche aussi la conversion en bradyzoïtes.

Après contrôle de l'infection aiguë, une mémoire immunitaire se met en place avec la production d'immunoglobulines IgG, IgA, IgE, IgM par les plasmocytes, ce qui permet d'agir rapidement lors d'une possible réinfection. En effet, plusieurs mécanismes pourront alors agir tels que l'opsonisation des

Lors d'une infection par *T. gondii*, il y a recrutement de cellules immunitaires (macrophages –M Φ –, neutrophiles polynucléaires –PNN– et cellules dendritiques –DC–) au site de l'infection⁴⁰. La détection du parasite par les Toll-Like-Receptor entraîne l'activation des M Φ , PNN et DC sécrétant des cytokines pros et anti-inflammatoires. Le contact entre une cellule présentatrice d'antigène va notamment conduire à la production d'interleukine 12 (IL-12)^{41,42}.

La sécrétion d'IL-12 entraîne la production d'Interféron gamma (IFN- γ) par les lymphocytes NK⁴⁰.

L'IFN- γ est un facteur important dans le contrôle de l'infection par *T. gondii*, qui permet de limiter la multiplication du parasite. Son action passe par

parasites, l'inhibition de l'attachement ou de l'invasion des parasites. De même, une réponse par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ est essentielle pour empêcher la réactivation de kystes³⁷.

Chez la femme enceinte, la réponse immunitaire diffère lors de la gestation, la production d'IL-12 et de TNF- α semble diminuer, alors que celle de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) augmente. Ces conditions pourraient rendre la femme enceinte plus vulnérable à l'infection²⁹. De plus, le système immunitaire du fœtus n'est pas complètement fonctionnel, avec notamment une faible quantité de cellules immunitaires lors des premières semaines de développement, là encore offrant une grande vulnérabilité à l'infection par le parasite^{29,43}. Le bon déroulement de la gestation dépend aussi de l'équilibre dans la réponse immunitaire de la mère. En effet une réponse immunitaire trop importante de la part de la mère amène à un excès en IFN- γ et une augmentation de l'activité des lymphocytes NK qui entraîne une inflammation et une apoptose des tissus pouvant aboutir à une fausse couche²⁹.

2) Les stratégies de lutte existantes

Il existe des gestes simples pour éviter une contamination par *T. gondii*. La prophylaxie consiste en plusieurs niveaux de mesures : le contrôle de la prévalence de la maladie chez l'animal (faisant baisser la transmission) ; éviter la consommation de viande peu cuite ; une plus grande attention à l'hygiène lors de la préparation de fruits et légumes ; un suivi sérologique des femmes enceintes au cours de la grossesse²⁹.

Parmi les stratégies envisagées pour lutter contre la toxoplasmose, on retrouve notamment des vaccins générés à partir de souches atténuées, des vaccins à ADN ou à antigènes protéiques (ceux-ci pouvant éventuellement être vectorisés par des vésicules comme des exosomes)⁴¹. La stratégie la plus efficace envisagée est de générer à un vaccin pouvant impacter au minimum deux des trois formes infectieuses de *T. gondii*^{44,45}. Pour cela des études portent sur divers antigènes caractéristiques des formes infectieuses (**Figure 7**). Un seul vaccin commercial (le Toxovax®), obtenu à partir d'une souche atténuée existe pour les ovins mais

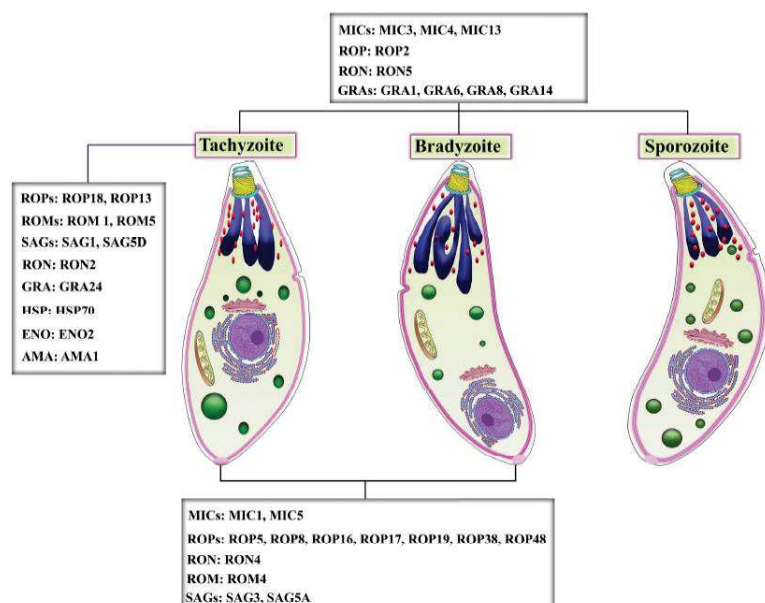


Figure 7: Récapitulatif des antigènes impliqués dans un, deux ou trois stades (tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte) de *T. gondii*.⁴³

aucun vaccin contre la toxoplasmose humaine n'a encore été développé. En effet, le développement d'un vaccin entièrement efficace contre le parasite doit pouvoir répondre à plusieurs contraintes^{41,44,46}: immunisation de l'hôte contre toutes les souches génétiquement différentes de *T.gondii*; induire une forte protection contre toutes les formes du parasite; choix d'un adjuvant pouvant être à l'origine d'effets secondaires. Toutes ces contraintes font qu'il n'existe toujours pas de vaccin pouvant prévenir l'Homme de la toxoplasmose.

Concernant les traitements médicamenteux, il existe plusieurs familles de molécules fonctionnelles dans les modèles murins qui n'ont pas toutes été transposées aux infections humaines à *T. gondii*. De nombreuses cibles des traitements médicamenteux font partie de voies métaboliques essentielles (**Figure 8**). En effet, le traitement le plus couramment utilisé est une combinaison de deux agents bloquant la synthèse de l'acide folique d'origine parasitaire (la pyriméthamine et la sulfadiazine). Ce traitement est utilisé pour traiter les infections aiguës⁴⁷. Or, même s'il y a peu de phénomène de résistance chez *T. gondii*, il faut noter que des souches comportant une mutation au niveau du gène de la dihydroptéroate synthase (*DHPS*) ont acquis une résistance à la sulfadiazine⁴⁷.

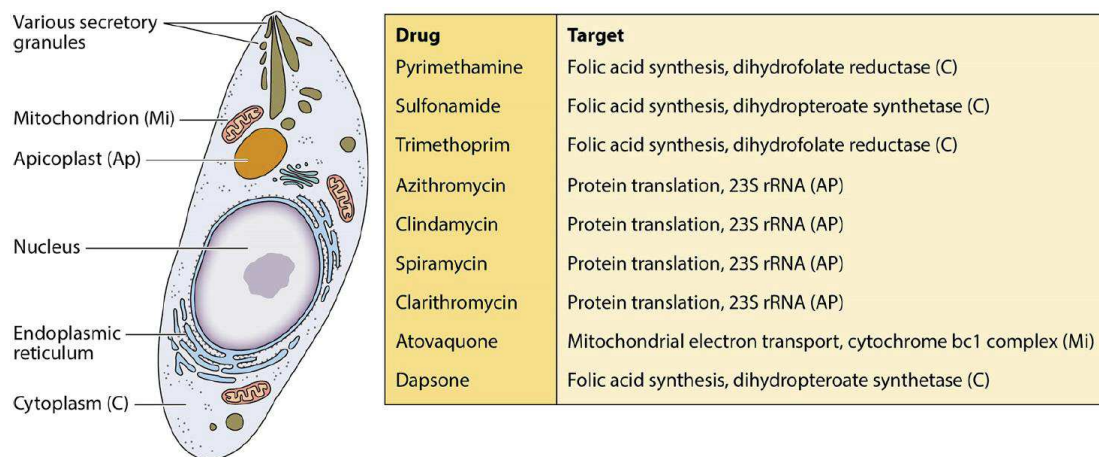


Figure 8: Voies parasitaires ciblées par les médicaments anti *T. gondii* en usage clinique⁴⁸

De plus, du fait de leur toxicité, certaines molécules actives contre des voies essentielles du métabolisme de *T. gondii* ont vu leur utilisation entièrement arrêtée telles que les dérivés de fluoroquinolones inhibant la synthèse de l'ADN en ciblant la topoisomérase IV^{49,50}.

A contrario, les dérivés de macrolides tels que l'azithromycine ont une longue demi-vie et sont adaptables à une formulation orale, ce qui permet le traitement d'infections aiguës⁴⁸. Leur mécanisme d'action consiste à bloquer la synthèse protéique au sein de l'apicoplaste de *T. gondii* (une organelle endosymbiotique dont je détaillerai la fonction plus tard). Dans le contexte de la toxoplasmose congénitale, un traitement lui aussi à base d'antibiotiques de la famille des macrolides (comme la

spiramycine) est préconisé. Ce traitement permet de réduire la probabilité de transmission au fœtus mais elle ne permet pas de soigner les fœtus déjà infectés.

Une autre organelle d'origine endosymbiotique importante d'un point de vue métabolique, la mitochondrie, est aussi la cible de molécules, comme les dérivés de l'hydroxynaphtoquinone tels que l'Atovaquone, inhibant la chaîne respiratoire⁵⁰.

Malgré tout, un certain nombre de contraintes sont associées aux traitements existants : ils nécessitent une prise de relativement longue durée et, de façon importante, ne sont pas actifs contre la forme enkystée du parasite. La forme chronique de la toxoplasmose est donc incurable. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et de nouvelles molécules candidates est donc plus que jamais d'actualité.

Chapitre III : Ultrastructure du tachyzoïte

T. gondii est un organisme eucaryote, sa forme tachyzoïte comporte donc des organelles universelles aux eucaryotes, tels que le noyau (N), le réticulum endoplasmique (ER), l'appareil de Golgi (G) et la mitochondrie (M)⁵¹. Le parasite contient aussi différentes organelles spécifiques (certaines impliquées dans les processus d'attachement et d'invasion de la cellule hôte, dont l'origine et les fonctions seront décrites dans les prochains chapitres) : l'apicoplaste (A), les micronèmes (m), les rhoptries (R), les granules denses (DG) et un cytosquelette structuré de façon unique (**Figure 9**).

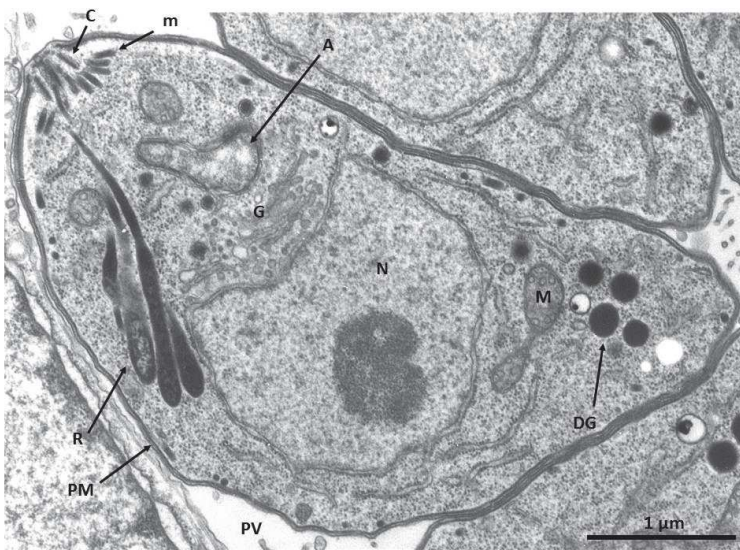


Figure 9: Ultrastructure d'un tachyzoïte de *T. gondii*⁵².

Microscopie électronique d'une section de tachyzoïte contenant les organelles conventionnelles (N : noyau, G : appareil de golgi, PM : membrane plasmique, M : mitochondrie) et spécifiques (C : conoïde, m : micronèmes, R : rhoptries, A : apicoplaste, PV : vacuole parasitophore, DG : granules denses).

En effet, étant un membre du phylum des apicomplexes, il est caractérisé par un complexe apical (**Figure 10**) qui est un assemblage d'organelles nécessaires à l'attachement du parasite et à l'invasion de la cellule hôte pour s'établir au sein d'une PV.

A. Complexe apical et cytosquelette

Le cytosquelette de *T. gondii* est composé d'éléments de base tels que l'actine, la myosine et la tubuline retrouvés aussi chez les autres modèles eucaryotes. Néanmoins,

l'organisation du cytosquelette contient des spécificités propres à *T. gondii*.

1) Le conoïde

Le conoïde est un complexe apical d'environ 380 nm de diamètre, composé de deux anneaux pré-conoïdaux et de protofilaments d' α et β tubuline organisés en spirale⁵² (**Figure 10**). Au sein de cette structure, on retrouve deux populations de microtubules : des microtubules intra-conoïdaux en fuseau et d'autres structuraux organisés en spirale et formant un cône. La (les) fonction(s) de cette organelle ne sont pas complètement élucidée(s), mais elle(s) semble(nt) être nécessaire(s) à l'invasion de la cellule hôte par le parasite^{53,54}.

Le conoïde a une structure dynamique polarisée, pouvant s'extruder et se rétracter, ce qui pourrait avoir un rôle mécanique lors de la sécrétion de protéines.

A la base du conoïde, se trouve l'anneau polaire apical (APR)⁵⁵ qui sert de centre d'organisation des microtubules (MTOC) et d'où sont originaires 22 microtubules sous-pelliculaires organisés en spirale et couvrant environ deux tiers de la longueur du parasite⁵⁶. Ces microtubules sont nécessaires à la forme et au maintien de la structure et la polarité du parasite^{57,58}.

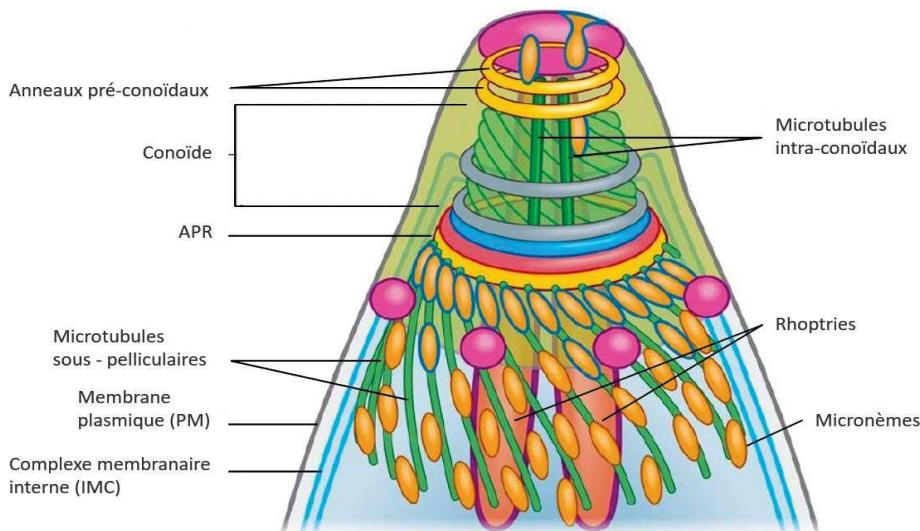


Figure 10: Représentation du complexe apical d'un tachyzoïte de *T. gondii*⁶⁰.

2) La pellicule

La pellicule couvre la surface du tachyzoïte et, est composée de deux couches (**Figure 11**). On trouve la membrane plasmique (PM), ainsi qu'un réseau sous-jacent nommé: complexe membranaire interne (IMC)⁵⁹ qui est constitué de sacs membranaires aplatis appelés alvéoles. Enfin, l'IMC et son réseau protéique associé appelé réseau sous pelliculaire (SNP)^{25,60}, sont liés avec le réseau de microtubules sous-pelliculaires du côté cytoplasmique. La principale fonction de la pellicule consiste à maintenir la forme, la polarité et la structure du tachyzoïte.

L'IMC est discontinu, notamment afin de permettre les échanges avec le milieu extérieur, et il comporte une ouverture au niveau du pôle apical au-dessus du conoïde. De même, il n'est pas fermé au niveau de l'extrémité postérieure du parasite, nommée complexe basal. L'IMC est une composante importante de la structure du parasite puisqu'elle lui confère de la stabilité par association avec le réseau de microtubules sous-pelliculaires de l'APR⁵⁹. De plus, il soutient le glideosome qui est la machinerie d'actine/myosine permettant la motilité par glissement de *T. gondii*⁶¹⁻⁶³.

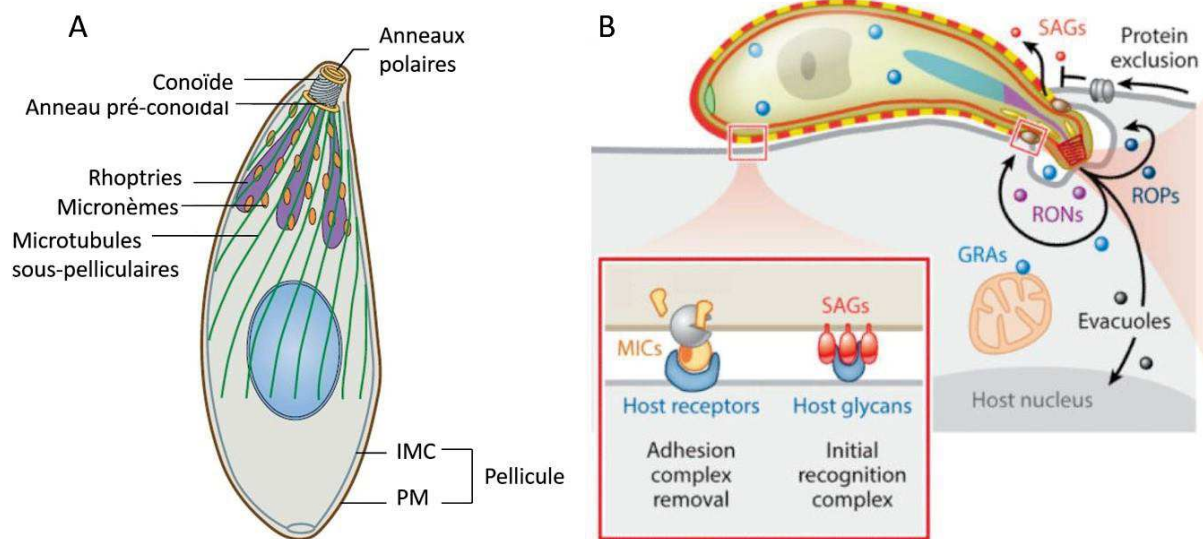


Figure 11: Cytosquelette et mécanisme de glissement d'un tachyzoïte^{59,64}

(A) Structure du cytosquelette de *T. gondii* ; (B) Composition du glideosome et mécanisme d'invasion par glissement.

3) Les organelles sécrétrices

Le complexe apical abrite deux types d'organelles sécrétées séquentiellement et impliquées dans les processus d'attachement et d'invasion de la cellule hôte.

a) Les micronèmes

Les micronèmes sont des structures en forme de grain de riz d'une taille approximative de 250x50nm⁶⁵ et localisées au pôle apical du parasite (**Figure 10**). Elles contiennent des protéines, nommées MICs, qui sont impliquées dans l'attachement à la cellule hôte, qui est la première étape du processus d'invasion de celle-ci⁶⁵. En effet, lorsqu'un tachyzoïte est extracellulaire, les MICs, qui sont des protéines transmembranaires, sont alors transférées à la membrane plasmique de *T. gondii* où elles peuvent alors interagir avec les protéines de surface de l'hôte⁶⁶. De même par leur partie cytoplasmique elles interagissent avec la machinerie de glissement utilisant le moteur d'actine/myosine^{61,67}.

b) Les rhoptries

Les rhoptries, sont au nombre de ~12 pour un tachyzoïte et ont une longueur de 2 à 3 µm⁶⁵. Elles ont deux parties morphologiquement distinctes : le col et le bulbe, qui contiennent aussi deux types distincts de protéines⁶⁸. Dans un premier temps, les protéines RONs (contenues dans le col) sont libérées et permettent la formation d'une structure appelée la jonction mobile, qui se trouve à l'interface du point d'invasion du parasite avec la cellule hôte⁶⁹. La jonction mobile est une structure dynamique se déplaçant de l'extrémité apicale du parasite vers l'extrémité basale assurant ainsi

l'ancrage du parasite et donc l'invasion de la cellule hôte^{68,69}.

La jonction mobile permet aussi l'établissement d'un filtre sélectif déterminant la composition moléculaire de la PV, qui se forme simultanément lors de l'invasion à partir de la membrane plasmique de la cellule hôte⁷⁰. La PV fournit au parasite un environnement contrôlé et protecteur pour sa division, empêchant notamment sa dégradation par les lysosomes de l'hôte⁶⁸.

Les protéines du bulbe des roptries (ROPs) sont sécrétées rapidement après les RONs. Elles vont être libérées dans le cytoplasme cellulaire et s'associer à la membrane de la PV, ou au-delà comme dans le noyau de la cellule hôte. Les ROPs jouent un rôle important dans le contrôle de la réponse immunitaire en modulant des voies de signalisation particulières⁷¹.

c) Les granules denses

Les granules denses sont un autre compartiment de sécrétion qui ne sont pas spécifiques du complexe apical mais sont distribuées dans tout le cytosol. Ces vésicules sphériques de 300nm de diamètre contiennent des protéines appelées GRAs qui sont sécrétées en dernier, après complétion du processus d'invasion. Ces protéines participent à l'établissement à long terme du parasite dans la cellule, notamment pour l'acquisition de nutriments et la modulation de la réponse immune de l'hôte⁷²⁻⁷⁵.

B. Apicoplaste et mitochondrie : une origine endosymbiotique

T. gondii contient plusieurs organelles d'origine endosymbiotique. Le processus d'endosymbiose (incorporation et rétention d'un organisme pour rétablir une relation symbiotique) a eu des conséquences importantes dans l'évolution des eucaryotes. Par exemple, il y a environ 1.3 milliard d'années, une endosymbiose primaire a eu lieu : une cyanobactérie photosynthétique fut phagocytée et retenue par un organisme eucaryote hétérotrophe. Ceci a permis l'émergence de trois grandes lignées : les glaucophytes ; les algues et plantes vertes et enfin les algues rouges^{5,76}. Ces lignées ont pu par la suite subir de nouvelles endosymbioses nommées endosymbioses secondaires.

Les apicomplexes font partie, avec les ciliés et dinoflagellés, du groupe des Alvéolés, lui-même appartenant au supergroupe des chromoalvéolés. Ce supergroupe semble être issu d'un ancêtre commun acquis par endosymbiose secondaire une algue rouge^{77,78}.

Bien que possédant originellement leur propre génome, les organelles endosymbiotiques ont transféré une large partie de leurs gènes vers le génome nucléaire de l'hôte au fur et à mesure de l'établissement de la relation de symbiose.

1) La mitochondrie

La mitochondrie est une organelle acquise par endosymbiose primaire. Elle n'est pas spécifique aux apicomplexes et contient un génome propre réduit. Contrairement à plusieurs autres eucaryotes, chez *T. gondii*, il n'y a pas une population de mitochondries dynamiques qui se déplacent, se divisent et fusionnent continuellement, mais une seule mitochondrie en réseau⁷⁹. Les mitochondries eucaryotes permettent, entre autres fonctions, de fournir l'énergie nécessaire aux cellules par production d'adénosine triphosphate (ATP) au cours du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA)⁸⁰. De façon similaire, *T. gondii* possède un cycle TCA conventionnel capable de générer de l'énergie au sein de sa mitochondrie^{81,82}. La chaîne respiratoire mitochondriale de *T. gondii* a quelques particularités : une absence de complexe I et des sous-unités additionnelles pour les complexes II, III, IV et V⁸³⁻⁸⁵. La mitochondrie est aussi impliquée dans d'autres voies métaboliques tels que la voie de biosynthèse de l'hème qui sera décrite dans les prochains chapitres.

2) L'apicoplaste

L'apicoplaste est une organelle spécifique aux apicomplexes. Elle est située en position apicale par rapport au noyau et est entourée de quatre membranes⁸⁶. Cette particularité de l'apicoplaste n'est autre que le témoin de son origine complexe, car issu d'une endosymbiose secondaire^{87,88} (**Figure 12**). En effet, les deux membranes les plus internes de l'apicoplaste correspondent à la structure en double membrane des cyanobactéries car le premier événement d'endosymbiose fut l'incorporation d'une cyanobactérie, donnant naissance à une algue rouge. Ceci est étayé par leur composition qui est analogue aux membranes internes (IM) et externes (OM) des chloroplastes⁷⁸. Le sous-compartiment entre ces deux membranes et les membranes périphériques est nommé compartiment périplastidien (PPC). Concernant les membranes périphériques, elles proviennent de l'endosymbiose secondaire de l'algue rouge par un ancêtre des apicomplexes. La membrane périphérique la plus interne venant de l'algue rouge et étant appelée membrane périplastidique (PPM). La membrane externe (OM) est probablement

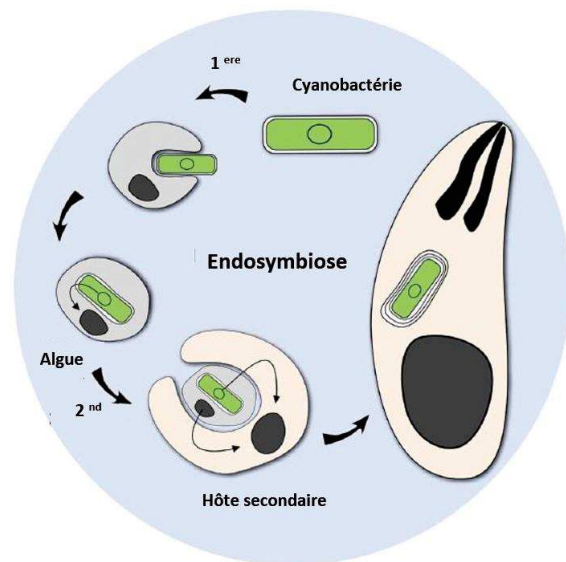


Figure 12: Schéma de l'endosymbiose secondaire à l'origine de l'apicoplaste présent dans le phylum des Apicomplexes⁸¹.

analogue à l'endomembrane de l'hôte qui a phagocyté l'algue rouge^{78,88,89}.

Malgré une origine végétale, ce plaste a perdu sa capacité photosynthétique suite à l'évolution de l'ancêtre des apicomplexes vers un mode de vie parasitaire. Cependant cette organelle reste impliquée dans de nombreuses voies métaboliques importantes (décrites dans les prochains chapitres). De plus, tout comme la mitochondrie, elle comporte un génome extra-chromosomique (~35Kb)⁸⁷. Ce génome code essentiellement pour une machinerie d'origine cyanobactérienne permettant l'expression et la stabilité du reste du génome⁹⁰. L'apicoplaste a été perdu dans certains apicomplexes (*Cryptosporidium* et grégaires par exemple), mais est essentiel pour la viabilité de plusieurs stades de développement chez les apicomplexes où il persiste.

3) Maturation et export de protéines vers les organelles endosymbiotiques

Les protéines fonctionnant au sein de la mitochondrie ou de l'apicoplaste peuvent donc être codées soit directement par l'organelle, soit plus couramment par le noyau de la cellule. Ces dernières, issues du génome nucléaire, nécessitent donc des modifications et un adressage post-traductionnel afin d'être associées à leur organelle respective et être fonctionnelles. Le mécanisme de transport de ces protéines vers les organelles endosymbiotiques est globalement semblable à celui observé chez les autres organismes eucaryotes (vers les mitochondries ou les chloroplastes par exemple)⁹¹.

a) Adressage à la mitochondrie

Une majorité des protéines de *T. gondii* devant être dirigées vers la mitochondrie contiennent une pré-séquence, clivable, en position N-terminale. Cette pré-séquence permet aux protéines néosynthétisées d'être acheminées, à l'état déplié, vers les membranes de l'organelle^{92,93}. Les pré-séquences N-terminales ont comme caractéristique de former des hélices amphiphiles chargées positivement et sont en général clivées lors de l'importation de la protéine dans les mitochondries. La mitochondrie est une organelle possédant deux membranes qui doivent pouvoir être traversées pour l'adressage de protéines du matrice de l'organelle par exemple. Ceci est possible grâce à des complexes protéiques nommés translocons^{94,95}. Chaque membrane a un translocon qui lui est spécifique : le TOM pour la membrane externe, et le TIM qui permet la traversée de la membrane interne de l'organelle^{96,97}. La séquence d'adressage est reconnue par le translocon sur la membrane externe de la mitochondrie. La translocation de la protéine peut être partielle en présence d'un ou plusieurs motif(s) hydrophobe(s), ce qui va alors permettre son ancrage à la membrane. Si la translocation au travers du TOM est complète, alors la protéine va se retrouver dans l'espace intermembranaire. Selon la séquence d'adressage de la protéine, cette dernière pourra alors être dirigée vers le TIM, d'où elle pourra de nouveau être importée partiellement ou totalement. Lorsque la protéine est ancrée dans une des membranes ou libérée dans la matrice de l'organelle, la séquence d'adressage en N-terminal

va pouvoir être clivée par une peptidase. Cela aboutit à un changement conformationnel par la prise en charge par des protéines chaperonnes, menant à la maturation de la protéine cible, qui devient alors fonctionnelle⁹³. A noter que certaines autres protéines mitochondriales sont synthétisées sans pré-séquence clivable et contiennent des signaux de ciblage au sein de la protéine mature.

b) Adressage à l'apicoplaste

L'adressage des protéines à l'apicoplaste nécessite généralement comme pour les mitochondries la présence d'une extension protéique N-terminale (même s'il peut aussi y avoir des séquences d'adressage internes). Cette séquence est constituée de deux parties⁹⁸: les 20 à 30 acides aminés N-terminaux fonctionnent comme une séquence signal classique pour l'entrée dans le réticulum endoplasmique et la voie de sécrétion. Le clivage de la séquence signal expose ensuite un peptide de transit de longueur variable (50 à 200 acides aminés) qui est nécessaire pour diriger les protéines vers l'apicoplaste^{89,99,100}. Plusieurs voies de trafic ont été proposées pour les protéines membranaires des apicoplastes chez les apicomplexes¹⁰⁰.

Il y a plusieurs hypothèses pour le passage de la voie de sécrétion à l'apicoplaste. La première consiste à un trafic classique du ER à l'apicoplaste avec une étape intermédiaire à l'appareil de Golgi¹⁰¹. Une seconde possibilité serait un transport facilité par un flux protéique direct grâce à la contiguïté entre la membrane de l'ER et l'apicoplaste. Enfin, le transport pourrait être vésiculaire directement de l'ER vers l'apicoplaste^{102,103}. Il est possible ces trois voies de transport co-existent¹⁰⁴.

Comme pour la mitochondrie, ou pour d'autres plastes, le passage des membranes pour un adressage interne nécessite des translocons, mais la problématique ici est que l'apicoplaste comporte jusqu'à quatre membranes à traverser (**Figure 13**).

Les mécanismes permettant de traverser ces quatre barrières sont différents à cause de l'origine respective de chaque membrane^{78,88}. La protéine, acheminée à la membrane externe de l'organelle, peut, par la suite, être potentiellement prise en charge par le translocon DER1 de la machinerie SELMA (symbiont-specific ERAD-like machinery) de *T. gondii*. C'est une machinerie de type ERAD (dégradation associée au réticulum endoplasmique) spécifique au symbiote permettant, avec le concours d'autres composants, la traversée de la seconde membrane de l'apicoplaste^{105,106}. Après avoir traversé la membrane périplastidienne, l'importation des protéines s'effectue par des complexes protéiques homologues aux translocons classiques des membranes externes (TOC) et internes (TIC) des chloroplastes^{96,107-109}. Une fois la matrice de l'apicoplaste atteint, le peptide de transit est clivé, ce qui permet une maturation de la protéine pour la rendre fonctionnelle¹¹⁰.

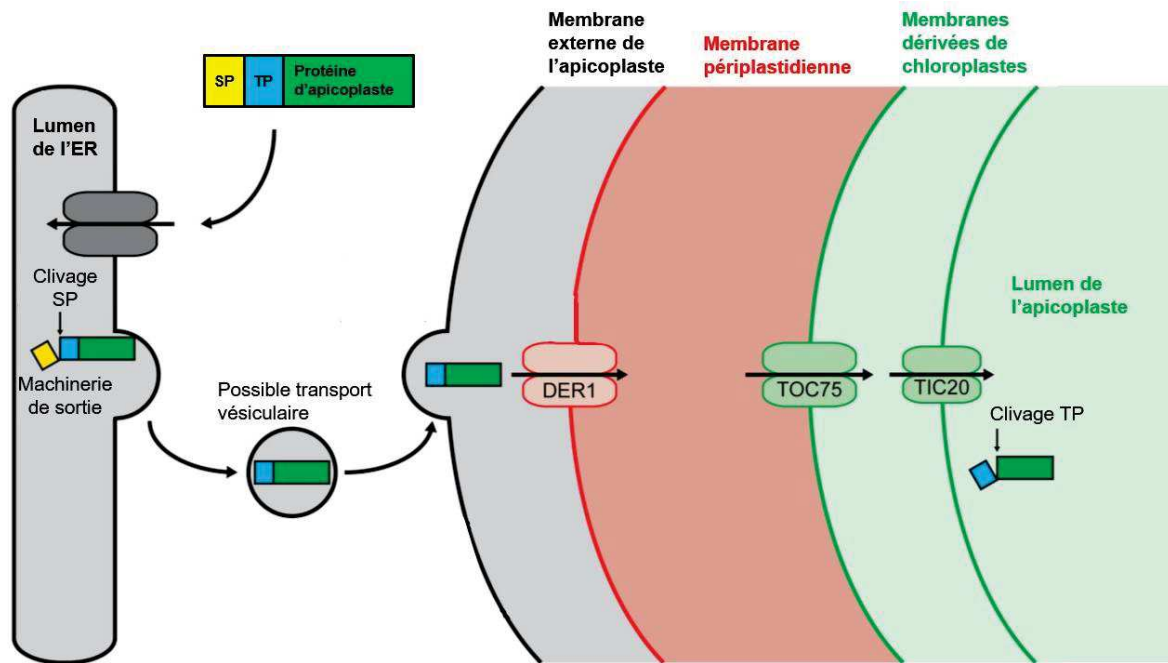


Figure 13: Modèle d'importation des protéines d'apicoplastes via un possible système de sécrétion et la machinerie ERAD (adapté de ¹¹¹)

SP: peptide signal ; TP: peptide de transit ; SP+TP: séquence d'adressage ; DER1: protéine 1 de dégradation dans le ER; TOC: translocon de la membrane externe; TIC: translocon de la membrane interne.

Chapitre IV : cycle lytique du tachyzoïte

A. Invasion de la cellule hôte

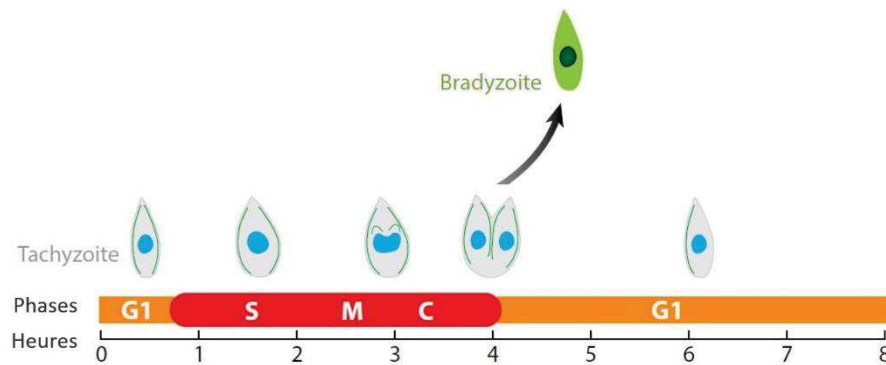
Les tachyzoïtes extracellulaires ne se répliquent pas et comme vu précédemment, ils ne peuvent survivre qu'un temps limité dans le milieu extracellulaire. La forme extracellulaire de *T. gondii* a donc besoin d'envahir une cellule hôte nucléé afin de pouvoir se répliquer.

Comme évoqué précédemment, l'invasion d'une cellule hôte fait intervenir de nombreuses interactions moléculaires entre celle-ci et le parasite. L'invasion est dépendante de la motilité du parasite grâce à la machinerie du glideosome (déplacement par glissement dépendant du moteur d'actine/myosine) (**figure 11**). L'attachement et l'ancrage du parasite à la surface de la cellule hôte dépend d'une séquence d'interactions moléculaires entre le parasite et l'hôte. Tout d'abord il y a fixation du parasite à surface de la cellule hôte par interaction entre les antigènes de surface (SAGs) avec les protéoglycanes de l'hôte. Des protéines MICs participent ensuite à l'ancrage du parasite à la surface de la cellule hôte et à sa propulsion à l'intérieur de celle-ci. Ce premier contact est suivi de la libération d'autres protéines MICs et RONs afin de stabiliser l'ancrage et de former la jonction mobile nécessaire à l'invasion⁶⁴. A l'issue du processus d'invasion, le parasite se retrouve inclus dans une PV⁷⁰.

B. Réplication intracellulaire

Une fois la cellule hôte envahie, les tachyzoïtes intracellulaires peuvent alors se répliquer par un mode de division spécifique nommé endodyogénie. Ce processus permet l'assemblage de deux cellules filles au sein même de la cellule mère¹¹². Ce mécanisme est coordonné et les parasites au sein d'une même PV sont synchronisés.

T. gondii est un organisme haploïde dont le mode de division est constitué de trois phases¹¹². Les phases Gap 1 (G1), de synthèse (S) sont suivies de la phase M qui englobe la mitose (ou la ségrégation du matériel génétique) et la cytokinèse (ou le partage des composants cytoplasmiques dans la progéniture). Un cycle de division d'un tachyzoïte mère en deux tachyzoïtes filles dure entre 6 ou 8 heures (**Figure 14**) selon la souche parasitaire^{113,114}. De plus, il semble y avoir une corrélation entre la durée du cycle et la virulence de la souche (le type I étant le plus virulent à la durée de répllication la plus courte)¹¹⁴.



1) La phase de croissance et réplication du génome

Pendant la division cellulaire, certaines organelles maternelles sont dupliquées (par exemple l'apicoplaste ou l'appareil de Golgi), tandis que les autres sont néo-synthétisées. De plus, lors de cette phase, les différentes organelles maternelles vont subir une réorganisation spatiale impliquée dans les prochaines phases du cycle. La ségrégation et la synthèse de novo, sont finement organisées et coordonnées avec la progression du cycle cellulaire (**Figure 14**). Lors de la phase G1, il y a production des protéines et des organelles nécessaires à la synthèse d'ADN en phase S. A la fin de la phase G1, la duplication de l'ADN est initiée lors de la phase S¹¹⁴. L'étape de réplication de l'ADN est suivie de près par la mitose.

2) Mitose et cytokinèse

Les apicomplexes utilisent une mitose dite fermée. C'est-à-dire que l'enveloppe nucléaire reste pratiquement intacte pendant tout le processus de ségrégation des chromosomes¹¹².

Afin d'assurer la fonctionnalité des futures cellules filles, il est nécessaire d'avoir une répartition équitable des organelles au sein de celles-ci. Le processus de cytokinèse, lié au bourgeonnement des cellules filles, est initié lors de la fin de la phase S et chevauche donc le cycle de réplication d'ADN¹¹⁴. La formation des cellules filles par bourgeonnement se fait grâce à l'assemblage des éléments du cytosquelette cortical. Cela permet par la suite de séparer toutes les organelles directement dans les cellules filles. La coordination entre la phase de croissance et de synthèse d'organelles et la mitose/cytokinèse est assurée par les centrosomes (un autre MTOC des tachyzoïtes), qui ont un rôle essentiel dans l'incorporation du matériel maternel dans les cellules filles. Une fois les cellules filles formées, la membrane de la cellule mère disparaît, laissant alors place à deux tachyzoïtes néosynthétisés pouvant entamer à leur tour un cycle de réplication.

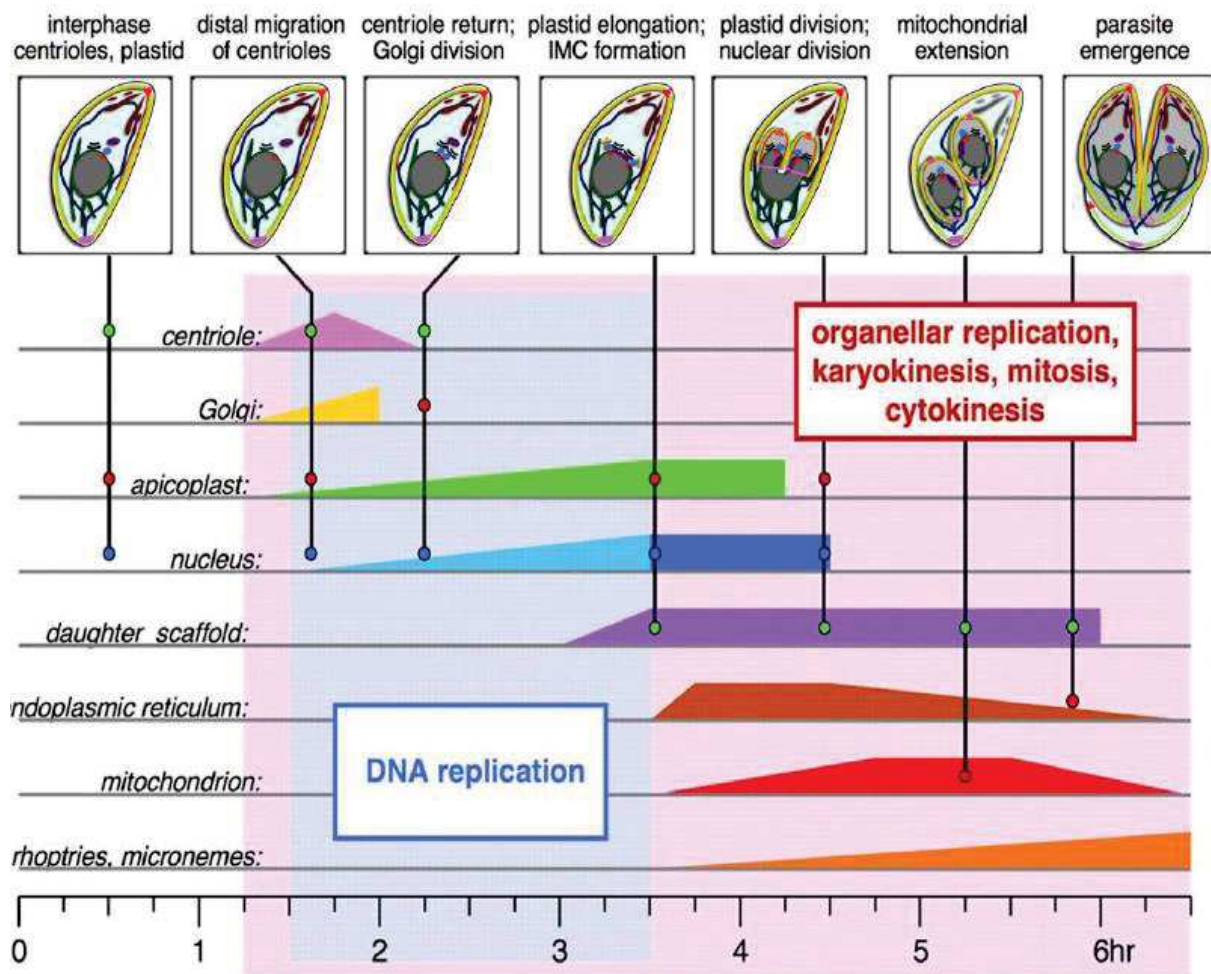


Figure 15: Réplication des organelles durant le cycle cellulaire de *T. gondii* (adapté de¹¹⁵)

C. Sortie

Après plusieurs cycles réplicatifs, les parasites néosynthétisés doivent pouvoir se disperser afin d'envahir de nouvelles cellules. La sortie des parasites de la cellule hôte est aussi nommée egress. C'est un processus dépendant de plusieurs facteurs⁶⁴ comme la sécrétion des micronèmes, la protrusion du conoïde et l'activation du mécanisme de déplacement par glissement dépendant du moteur d'actine/myosine¹¹⁶.

Récemment, il a été montré que *T. gondii* peut percevoir des changements environnementaux comme des flux d'ions potassium K^+ et calcium Ca^{2+} ou des signaux de danger de la cellule hôte, et que ceux-ci pouvaient agir en tant que, signaux d'activation de la sortie du parasite^{117,118} (Figure 16).

Concernant une activation émanant d'un signal de danger de la cellule hôte, cela proviendrait notamment de la liaison entre la cellule hôte infectée et les récepteurs des cellules T cytotoxiques conduisant à un mécanisme de destruction de la cellule et des parasites qui lui sont associés¹¹⁹. De même, un défaut dans les pompes Na^+/K^+ de l'hôte qui ferait diminuer la concentration intracytoplasmique de K^+ de la cellule hôte serait perçu comme un signal de danger¹¹⁸.

Parmi les paramètres intrinsèques aux parasites, on retrouve plusieurs signaux impliqués dans le déclenchement de la sortie du parasite. Par exemple, la multiplication des parasites au sein de la PV entraîne une baisse de pH, ce qui participera à la sortie de la cellule par le parasite^{116,117}.

Plusieurs flux d'ions sont impliqués dans les différentes étapes de la sortie de *T. gondii* (**Figure 16**). En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} par décharge des stocks intracellulaires de Ca^{2+} (du ER et de l'IMC)^{118,119}, va engendrer la sécrétion de MICs ainsi que l'activation du glideosome. De plus, une baisse de pH favorise la liaison membranaire et l'activité d'une protéine acidophile de micronèmes : la protéine de type perforine 1 (PLP1)^{117,118,120}. Elle contient un domaine d'attaque membrane/perforine (MACPF) typique des protéines capable de former des pores, et qui une fois sous forme d'oligomère va pouvoir s'insérer dans la membrane de la PV et de la membrane plasmique de la cellule hôte¹²¹. Le pore ainsi formé entraîne par conséquent la perméabilisation de la membrane d'intérêt.

La sécrétion des micronèmes est aussi régulée par un autre messager secondaire : la production en guanosine monophosphate cyclique (cGMP). En effet cela entraîne une cascade d'activation dont celle de la protéine kinase G (PKG) qui est à l'origine de la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycerol (DAG)^{122,123}. L'IP3 va alors stimuler la libération de Ca^{2+} par l'ER alors que le DAG sera à l'origine de la fusion des micronèmes avec la membrane plasmique du parasite¹¹⁶. Ce phénomène est impliqué dans de nombreux mécanismes en cascade aboutissant à la sécrétion de micronèmes afin de libérer des facteurs fragilisant les membranes et permettant la mobilité des parasites.

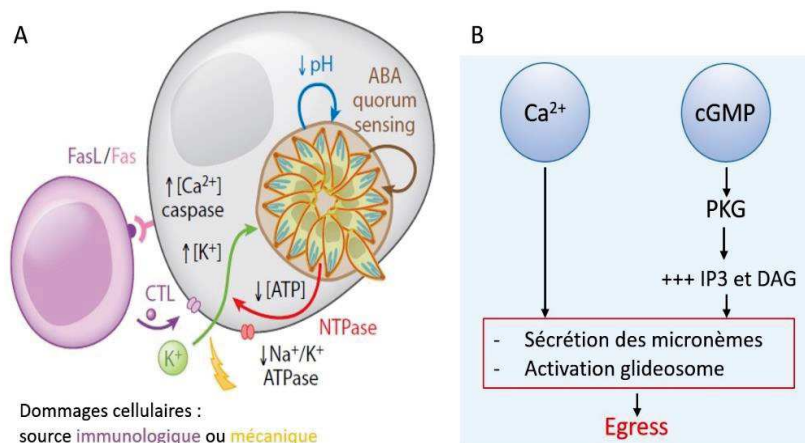


Figure 16: Activation de la sortie de la cellule hôte par *T. gondii* (Adapté de¹¹⁷)

(A) Vue d'ensemble des stimuli impliqués dans le phénomène de sortie.

(B) Résumé des signaux des messagers secondaires menant à la sortie du parasite.

Chapitre V : métabolisme au sein de l'apicoplaste de *T. gondii*

Cette organelle est cruciale pour la survie des formes tachyzoïtes du parasite. En conséquence, l'utilisation de drogues ciblant spécifiquement les capacités intrinsèques de l'organelle à répliquer ou exprimer son propre génome entraîne la mort du parasite¹²⁴. L'apicoplaste héberge notamment des voies métaboliques que l'on retrouve généralement au sein des chloroplastes telles que les biosynthèses de l'hème, des acides gras, des centres fer/soufre et des isoprenoides^{125,126} (**Figure 17**), que je détaillerai plus loin.

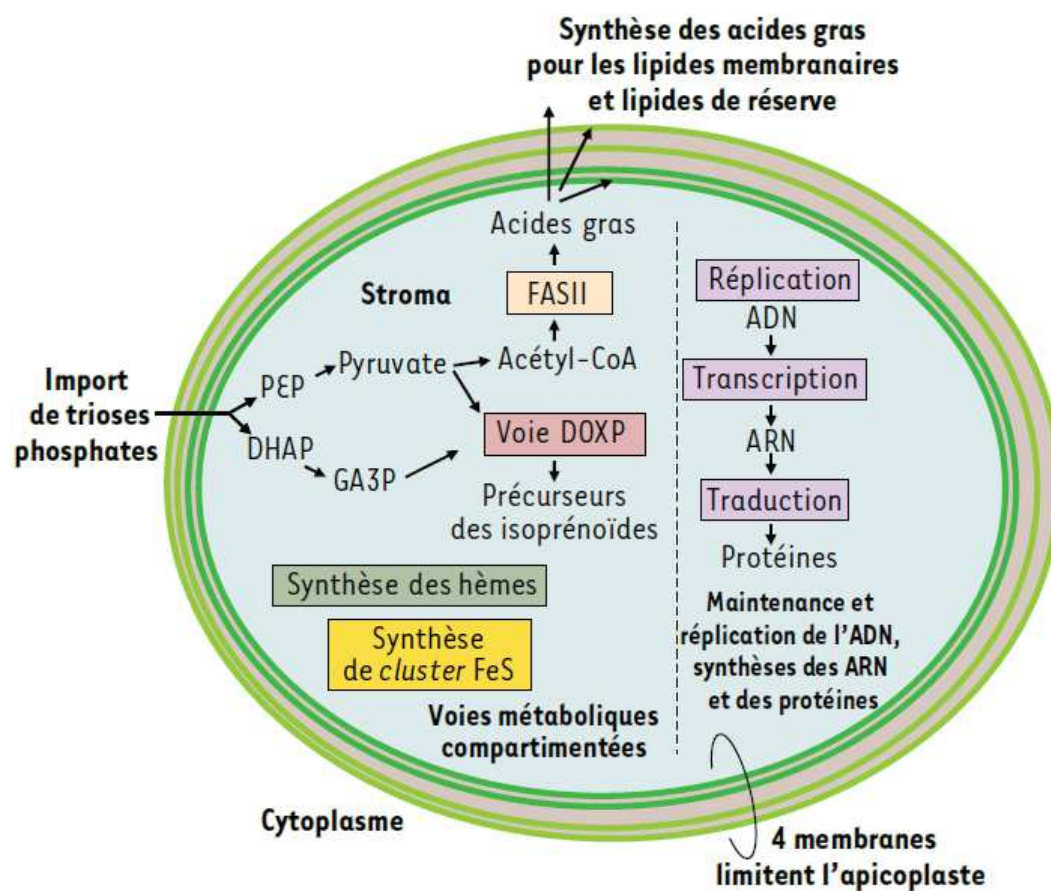


Figure 17: Fonctions biologiques principales hébergées par l'apicoplaste¹²⁷.

A. Apicoplaste et mort retardée

L'administration de traitements qui interfèrent avec les mécanismes de traduction bactériens (comme le chloramphénicol ou les macrolides)⁴⁸ conduit à une mort retardée (ou « delayed death ») du parasite dont il a été montré qu'elle était due à un effet sur l'apicoplaste^{128,129}. Ce phénotype particulier est dû au fait que le traitement n'impacte pas drastiquement les parasites se développant au sein d'une même vacuole lors du premier cycle lytique, par contre ces parasites-là ne pourront se diviser

efficacement sans apicoplaste après une nouvelle re-invasion^{130,131}.

Cette mort ne dépend pas de la dose d'antibiotiques administrés¹³¹. Le phénotype de mort retardée est la conséquence d'un dysfonctionnement ou d'une absence d'apicoplaste pouvant entraîner une déficience métabolique^{89,125}. Cependant, elle est sans effet dans un premier temps car la grande connectivité des parasites se développant au sein d'une même vacuole permet probablement le partage de métabolites qu'ils génèrent⁶⁶.

B. Voie de synthèse des acides gras

Parmi les voies métaboliques hébergées par l'apicoplaste, on retrouve donc la voie de biosynthèse des acides gras⁹⁹. Le métabolisme des lipides est crucial pour le développement des parasites, ils permettent entre autres la synthèse des membranes, de molécules de signalisation, et constituent aussi une réserve d'énergie¹³². La synthèse des lipides au sein des parasites diverge partiellement de celle de l'hôte humain.

En effet, trois voies biochimiques de synthèse des acides gras sont codées par le génome de plusieurs parasites protozoaires comme les apicomplexes ou d'autres parasites protozoaires comme les Kinetoplastidés. Les synthèses d'acides gras de type I et II (FASI et FASII) permettent la production d'acides gras de novo, qui peuvent ensuite subir une élongation par une voie spécifique (FAE). Les voies FASI et FASII sont différentes de par leur architecture puisque les diverses étapes de la voie FASI sont assurées par une seule enzyme ayant plusieurs sites actifs, contrairement à FASII pour laquelle chaque étape enzymatique est effectuée par une protéine dédiée¹²⁸.

Toutes ces voies ne sont pas présentes dans les mêmes organelles voire les mêmes organismes. La voie FASII (dite procaryote) est hébergée par l'apicoplaste de *P. falciparum* et *T. gondii* par exemple. La voie FASI est retrouvée dans le cytosol chez la plupart des eucaryotes dont l'Homme. Des protéines potentiellement impliquées dans cette voie sont également généralement présentes au sein des apicomplexes. C'est cependant la seule retrouvée chez *Theileria sp* et *Babesia bovis*, qui sont des parasites ne se développant pas dans une PV mais dans le cytosol de leur cellule hôte, facilitant donc l'accès aux nutriments de cette cellule^{129,133}. C'est également la seule trouvée *Cryptosporidium* qui, bien que se développant dans une PV, est dépourvu d'apicoplaste¹²⁹.

Tous les mécanismes de synthèse des acides gras suivent une séquence de réaction enzymatique similaire. En effet, les chaînes d'acide gras sont formées par addition séquentielle d'unités composées de deux carbones dérivés de l'acétyl CoA (**Figure 18**).

Les produits de la voie FASII issus de l'apicoplaste sont alors exportés vers le ER afin d'y être allongés et sont ensuite redirigés vers l'apicoplaste afin d'être incorporés dans les membranes de l'organelle¹³⁴.

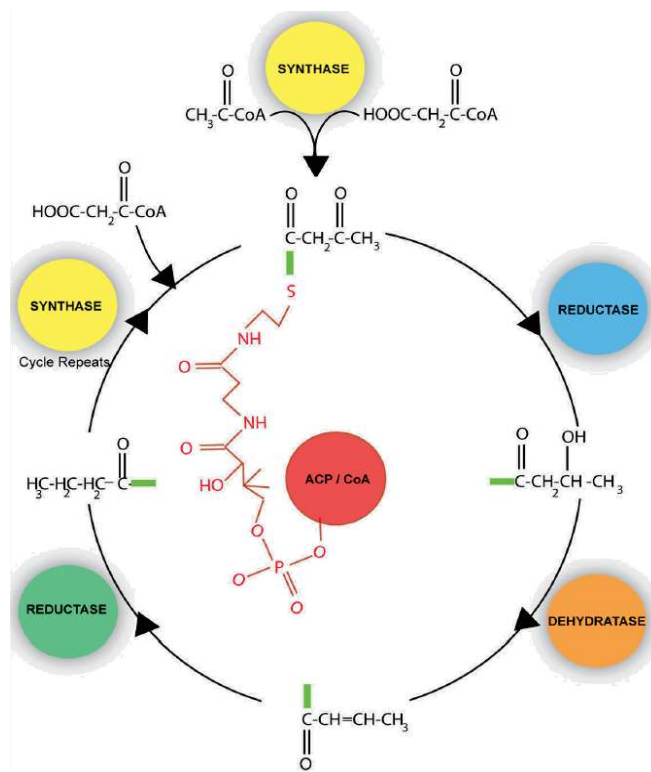


Figure 18: Mécanisme de synthèse des acides gras commun aux trois voies de biosynthèse¹³⁶

Cet acheminement de lipides peut être partiellement facilité par les interactions membranaires entre l'apicoplaste et le ER¹³⁵.

Le système FASII est requis pour la synthèse d'acide gras pouvant être importants dans la composition des lipides membranaires comme l'acide myristique (C14 :0) et l'acide palmitique (C16 :0)^{134,136}.

Bien que les parasites aient la possibilité d'acquérir des précurseurs lipidiques de l'hôte, des études génétiques chez *T. gondii* ont montré que la présence de la voie FASII à l'apicoplaste est essentielle à l'intégrité de l'organelle ainsi qu'à la survie des tachyzoïtes^{133,137}.

C. Voie de synthèse des isoprénoides

La seconde voie de biosynthèse présente à l'apicoplaste est la voie de synthèse des isoprénoides, qui forment une classe extrêmement variée de composants naturels essentiels. Ils le sont notamment pour la biogénèse des membranes de cellules eucaryotes par production de stérols tel que le cholestérol^{138,139}. De même, chez les organismes apicomplexes, ils interviennent dans la formation de dolichols des ancrs GPI (glycosylphosphatidyl inositol) des protéines membranaires^{124,140}. Par ailleurs, les isoprénoides sont aussi impliqués dans des processus de signalisation cellulaire, de modifications des protéines (prénylation) ainsi que des modifications d'ARNt et dans le transport des électrons dans la mitochondrie en fournissant des précurseurs pour la synthèse d'ubiquinones^{125,126,140}.

Ces composés isoprénoides sont constitués d'unités successives d'isomères précurseurs que sont le isopentényl-pyrophosphate (IPP) et le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) qui, dans le cytosol des cellules animales et végétales, sont synthétisés par la voie du mévalonate¹²⁶. Au contraire, dans les

bactéries et les chloroplastes, l'IPP et le DMAPP sont issus de la voie MEP/DOXP qui est indépendante du mévalonate. De même, les apicomplexes ont perdu la voie du mévalonate, mais utilisent la voie MEP/DOXP qui se trouve dans l'apicoplaste^{131,132,140}.

Les isoprénoïdes sont issus de l'assemblage d'unités isoprène à 5 carbones, et ceux-ci sont en général l'IPP et le DMAPP¹²⁶. C'est l'association de ces deux composés qui forme ainsi du géranyl-pyrophosphate (GPP). Celui-ci peut ensuite, par ajouts successifs d'une molécule d'IPP donner du farnésyl-pyrophosphate (FPP), puis du géranylgéranyl-pyrophosphate (GGPP) (**Figure19**). Le GPP tout comme le FPP peuvent servir à l'isoprénylation de protéines importantes pour les voies de signalisation¹³¹. Chez les formes sanguines de *P. falciparum*, il a été démontré biosynthèse des isoprénoïdes est la seule fonction essentielle de l'apicoplaste¹⁴¹.

C'est la fonction de prénylation qui est importante, notamment pour l'association aux membranes de protéines impliquées dans le trafic vésiculaire¹⁴² et l'acquisition de nutriments. Chez le stade tachyzoïte de *Toxoplasma* la voie de synthèse des isoprénoïdes hébergée par l'apicoplaste est également essentielle¹⁴³.

Comme les composants de la voie MEP/DOXP des parasites présents dans l'apicoplaste diffèrent de ceux présents à la voie MEP des hôtes¹⁴⁰, ils sont une cible intéressante pour le développement de traitements antiparasitaires¹⁴⁴.

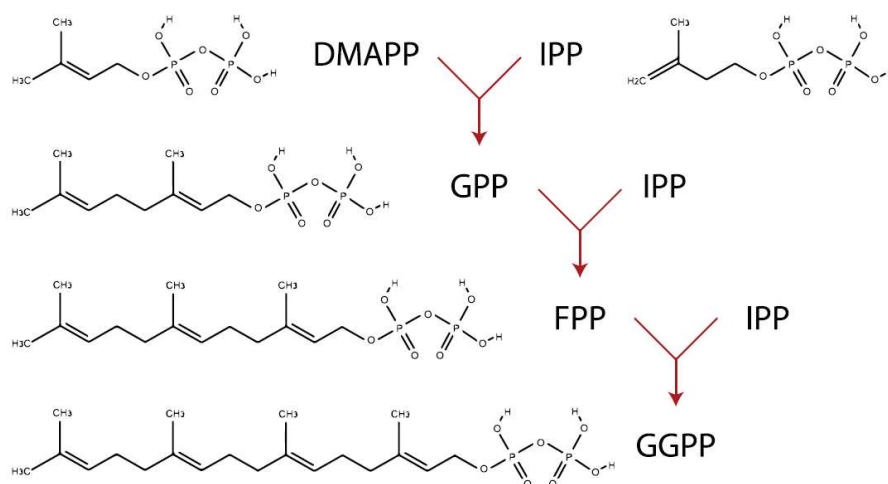


Figure 19: Voie de biosynthèse des isoprénoïdes¹³¹

D. Voie de synthèse de l'hème

Une troisième voie biochimique essentielle et pour laquelle l'apicoplaste joue un rôle important est la biosynthèse de l'hème¹⁴⁵. Cette voie est atypique chez les apicomplexes puisqu'elle n'est pas entièrement localisée dans une seule organelle. En effet, on retrouve des composants de la voie aussi bien dans la mitochondrie et le cytosol que l'apicoplaste¹²⁴⁻¹²⁶.

Cela est très différent de la biosynthèse de l'hème des cellules animales qui se déroule exclusivement à la mitochondrie¹⁴⁶. De même dans les plantes cette voie est presque entièrement plastidique¹⁴⁷. Les origines phylogénétiques des apicomplexes comprenant des organelles endosymbiotiques issues de cyanobactéries et de plastes expliquent la complexité de cette voie de biosynthèse^{126,148}.

L'hème est un groupement prosthétique, complexé avec du fer, constitué de quatre cycles de pyrrole^{124,125,132}. Cette structure particulière permet à l'hème d'accueillir un gaz tel que l'oxygène. Les protéines à hème sont ainsi impliquées dans le transport et la réduction de l'oxygène, le transfert d'électrons ainsi que d'autres processus biologiques importants¹⁴⁹.

Les enzymes impliquées dans les dix étapes de biosynthèse de l'hème sont donc présentes dans les apicomplexes *P. falciparum* et *T. gondii*^{148,150}, bien que réparties dans différents sous-compartiments cellulaires (**Figure 20**). La synthèse de l'hème débute et finit dans la mitochondrie, mais des étapes intermédiaires essentielles se déroulent dans le cytoplasme et l'apicoplaste.

En conséquence de tous ces changements de compartiments chez les apicomplexes, plusieurs intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'hème doivent traverser les membranes de l'apicoplaste et de la mitochondrie. Ceci est rendu particulièrement difficile par les chaînes latérales incapables de traverser des bicouches lipidiques, et demande donc l'implication d'un mécanisme de transport non connu à ce jour.

Chez *Plasmodium*, bien que l'hème en tant que cofacteur soit essentiel pour les stades hépatiques et dans l'hôte moustique, cela n'est pas le cas pour les stades sanguins¹⁵¹. Pour *Toxoplasma*, il a été récemment montré que la voie de biosynthèse de l'hème est essentielle à la viabilité des tachyzoïtes¹⁵², notamment la partie de la voie située dans l'apicoplaste¹⁵³.

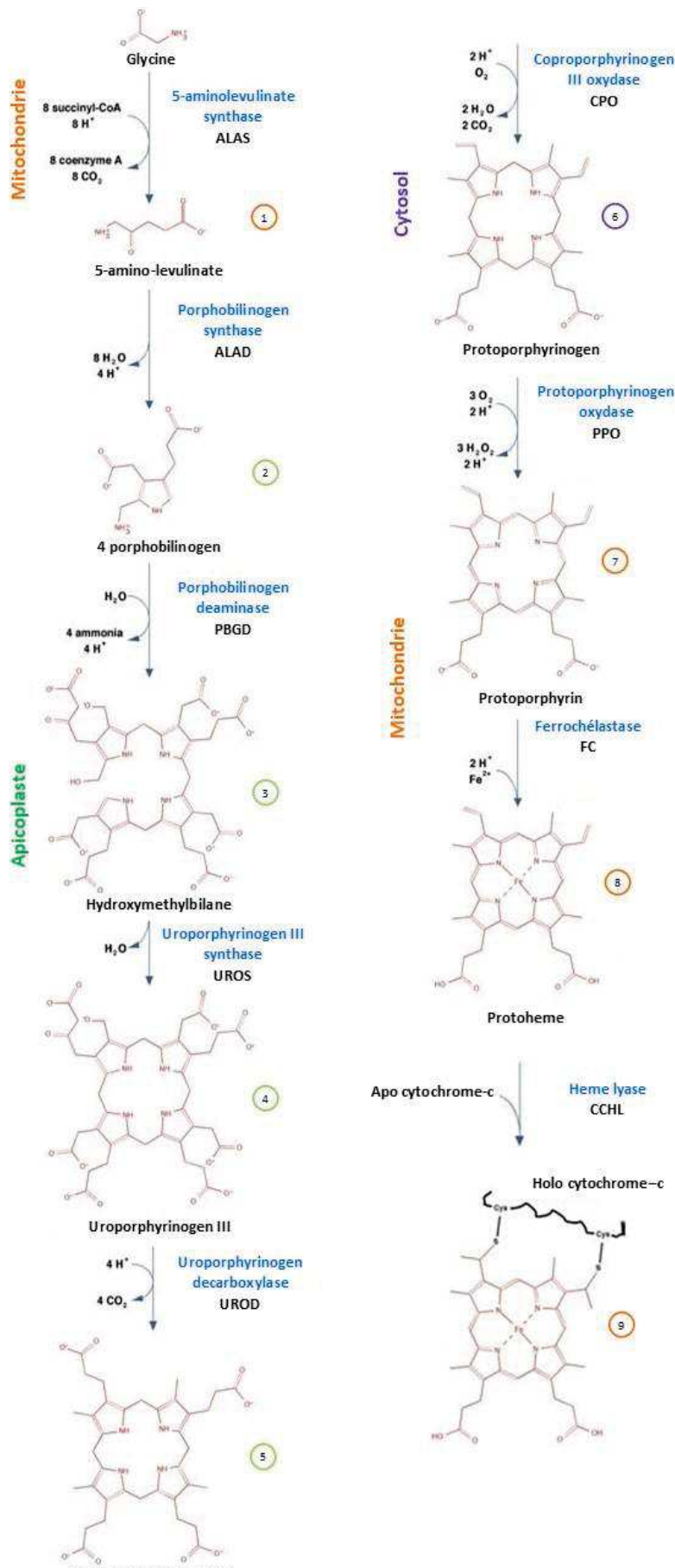


Figure 20: Synthèse de l'hème et métabolisme de *T. gondii* (adapté de 123,147)

(1) Assemblage d'une glycine et du succinyl-CoA afin de générer du 5-aminolevulinate (ALA) par la d-aminolevulinate synthase (ALAS).

(2) La condensation de deux molécules ALA par la ALA-déhydratase (ALAD) aboutit à la formation de molécules porphobilinogènes.

(3) Nouvelle condensation de 4 porphobilinogènes grâce à l'action de la porphobilinogène désaminase (PBGD) menant à la formation d'un tétrapyrrole linéaire.

(4) Réarrangement spatial d'un centre pyrrole par l'uroporphyrinogène synthase (UROS) dormant un tétrapyrrole cyclique.

(5) Délétion d'un groupement carboxyle par l'uroporphyrinogène décarboxylase (UROD) permettant la production d'une molécule de coproporphyrinogène.

(6) Décarboxylation oxydative grâce à la coproporphyrinogène oxydase (CPO).

(7) Réaction d'oxydation par la protoporphyrinogène oxydase (PPO).

(8) Chélation par la ferrochelatase (FeCH) permettant l'ajout d'un atome de fer liant les quatre cycles pyrrole.

(9) Liaison de l'hème aux cystéines de l'apo-cytochrome-c qui sera alors actif dans le transfert d'énergie de la chaîne respiratoire.

E. Biosynthèse des protéines à centre Fer-soufre

La dernière voie métabolique pour laquelle l'apicoplaste joue potentiellement un rôle est la voie de biosynthèse des protéines à centre fer-soufre [Fe-S]¹²².

Les centres fer-soufre sont des cofacteurs très anciens et donc très répandus, tant chez les eucaryotes que les procaryotes. Ils ont un rôle clé pour des protéines impliquées dans des processus métaboliques essentiels et variés parmi lesquels: le transfert d'électrons, la stabilisation de structures protéiques et la régulation de gènes¹⁵⁴ (**Figure 21**).

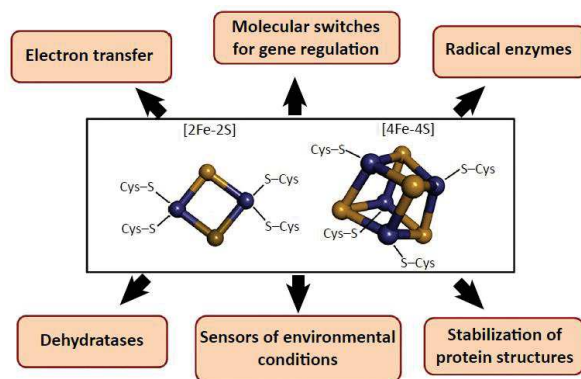


Figure 21: Structures et fonctions des principaux centres fer-soufre dans la nature¹⁵⁷.

Les organismes procaryotes et eucaryotes ont tous au moins une voie dédiée à la biosynthèse des centres [Fe-S]. L'acquisition par les eucaryotes de ces voies de synthèse suite à des endosymbioses a donné lieu à des systèmes d'assemblage distincts mais pouvant être interdépendants^{155,156}.

Ainsi, chez les eucaryotes, ces centres sont assemblés et associés à des apoprotéines spécifiques par des voies de biosynthèse distinctes, mais avec des mécanismes d'action comparables, localisées dans différents compartiments cellulaires¹⁵⁷.

Cette fonction de biosynthèse est ainsi assurée par la voie ISC (pour « iron sulfur cluster ») dans les mitochondries. Ce système est indirectement lié fonctionnellement à la machinerie CIA (pour « cytosolic iron/sulfur cluster assembly »), qui est impliquée dans la maturation des apoprotéines cytosoliques et nucléaires.

Le système SUF (pour « sulfur utilisation factors ») se trouve quant à lui généralement dans les organismes porteurs de plastes et assure la maturation des apoprotéines dans les plastes.

Les enzymes d'assemblage impliquées dans cette voie et adressées au plaste ne sont pas seulement présentes dans des organismes végétaux comme *Arabidopsis thaliana*¹⁵⁵, mais ont été par la suite découvertes dans l'apicoplaste de *P. falciparum*, qui est le seul apicomplexe où des études fonctionnelle avaient été effectuées au moment de commencer ma thèse. Elles ont montrés que la voie SUF est potentiellement essentielle pour l'homéostasie de l'organelle et la viabilité des stades sanguins de *Plasmodium*^{156,158,159}.

Chapitre VI : voies de synthèse des protéines à centre Fer-Soufre

L'hypothèse concernant un possible système d'agrégation spontanée du fer et du soufre en grappe formant alors des centres [Fe-S], fut émise dès 1989 lors de recherches sur les cofacteurs acquis par la nitrogénase de la bactérie *Azotobacter vinelandii*¹⁶⁰.

Ces groupements prosthétiques sont des cofacteurs servant à catalyser des processus biologiques essentiels (**Figure 21**) et semblent avoir été exploités tôt au cours de l'évolution¹⁶¹. En effet, des analyses phylogénétiques ont permis de déterminer que les protéines à centre [Fe-S] sont parmi les plus anciennes ce qui explique aussi leur large distribution dans l'arbre du vivant. Ils s'avèrent être présents dans les trois différents domaines du vivant : eucaryote, procaryote et archaea¹⁶².

Leur origine remonterait à environ 2.5 milliards d'années avant que l'atmosphère soit constituée majoritairement d'oxygène (O₂)¹⁶³. A cette époque, le fer et le soufre étaient des composants abondants de l'environnement anoxique dans laquelle les organismes vivaient.

Le changement de composition de l'atmosphère devenant donc riche en O₂ a alors entraîné l'oxydation de nombreux composés tels que le fer et le soufre et par conséquent en a diminué la disponibilité. Ce changement atmosphérique a engendré l'apparition des dérivés réactifs à l'oxygène (ROS) pouvant être délétères au développement des micro-organismes sensibles à l'utilisation de l'O₂¹⁶⁴. Pour faire face à l'augmentation de l'O₂, diverses stratégies ont été mises en place notamment pour protéger les groupes [Fe-S] comme l'utilisation des métalloprotéines (des enzymes piégeant les radicaux libres) de type superoxyde dismutase (SOD)¹⁶⁵. Cette théorie de l'évolution concernant les groupements [Fe-S] a été appuyée par une étude comparant l'utilisation de ces centres [Fe-S] dans 400 espèces procaryotes ayant des modes de vie et environnements en O₂ différents¹⁶⁶. En effet, il semble que le nombre de protéines [Fe-S] d'un organisme soit en corrélation avec la taille du génome et la capacité de l'organisme à utiliser l'O₂. Cela expliquerait donc pourquoi la quantité de protéines à centres [Fe-S] est bien plus élevée au sein de bactéries anaérobies par comparaison avec les bactéries aérobies¹⁶⁶. Les connaissances accumulées au fil des années sur le sujet, sont plus avancées concernant la biogénèse des centres [Fe-S] bactériens et mitochondriaux par rapport à celle prenant place dans les plastides, et encore moins de recherches ont été menées concernant le plaste particulier des apicomplexes^{167,168}.

A. Les centres [Fe-S]

Les formes libres de fer (Fe^{2+/3+}) et en moindre mesure de soufre (S²⁻), sont toxiques pour les cellules. En effet elles peuvent donner ou accepter un électron des molécules voisines, elles vont alors endommager des composants cellulaires ou générer des ROS. Il a donc été nécessaire pour les

organismes de développer au cours de l'évolution des mécanismes permettant de réguler les quantités de fer et de soufre libre afin de se protéger.

Les centres fer-soufre sont de composition variable mais retrouvés le plus couramment sous la forme [2Fe-2S] et la forme [4Fe-4S], respectivement de géométrie rhombique et cubique (**Figure 21**).

Concernant la forme [2Fe-2S] les atomes de soufre, se situent dans le même plan que les deux atomes de fer. Alors que la structure de type cubique lie de manière covalente les atomes de fer et ceux de soufre de façon à ce qu'ils soient alternés^{169,170}. Le point commun de ces deux formes est l'interaction avec des résidus soufrés de cystéines.

Il existe également un autre type de centre [2Fe-2S] : le type Rieske, nommé en rapport à la protéine éponyme du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il semble que ce troisième type de centre ait un potentiel redox plus élevé du fait de l'interaction non pas avec des résidus soufrés de quatre cystéines, mais de deux cystéines et deux histidines.

Une protéine peut intégrer plusieurs centres [Fe-S] ou même interagir avec différents types de centres [Fe-S]. C'est notamment le cas de la biotine synthase, qui intègre aussi bien un [2Fe-2S] qu'un [4Fe-4S] ainsi que de la succinate déshydrogénase qui peut se lier aux trois différents types de centres¹⁶⁷.

B. Transfert d'électron et rôle des centres [Fe-S]

Les centres [Fe-S] sont des catalyseurs, impliqués la majeure partie du temps, dans des réactions d'oxydoréduction. Les mécanismes faisant intervenir des centres [Fe-S] et n'impliquant pas nécessairement d'échange d'ions, sont notamment des mécanismes de régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel. On retrouve des exemples de ces régulations chez les levures (avec Aft1), les mammifères (avec la régulation des gènes du métabolisme du fer par IRP1/2)¹⁷¹ et chez les bactéries (avec le système de répresseur IscR)^{172,173}.

Concernant les réactions redox impliquant des protéines à centre [Fe-S], on les retrouve dans les chaînes de transfert d'électrons telles que la respiration et la photosynthèse ; tout comme dans des réactions enzymatiques impliquées dans la réparation de l'ADN ou la synthèse de cofacteurs.

Plus précisément, de nombreuses protéines à centres [Fe-S] sont retrouvées au niveau de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale : le complexe I comportant pas moins de 8 centres [Fe-S], ainsi que le complexe III avec la protéine Rieske.

De même, au sein de la chaîne de transport d'électrons chloroplastique on retrouve des centres [Fe-S] en interaction de nombreuses protéines telles que la ferrédoxine ou le photosystème I.

Un des rôles principaux des centres [Fe-S] est de préserver les cellules et aussi de servir de senseur pour les ROS qui sont toxiques¹⁶⁴. Les voies qui régulent l'homéostasie des ROS sont donc essentielles

à de nombreux organismes.

Le fait de trouver de multiples protéines à centre [Fe-S] impliquées dans des fonctions variées mais conservées et essentielles d'organismes éloignés phylogénétiquement illustre le rôle important qu'ont eut les groupements [Fe-S] au cours de l'évolution.

C. Biochimie de la synthèse des centres [Fe-S]

Les différents organismes, ou les différents compartiments subcellulaires des eucaryotes ont des répertoires de protéines à centre [Fe-S] pouvant varier. Il est donc légitime de penser que les voies de synthèses sont différentes selon les organismes et organelles considérés. Comme mentionné précédemment, on retrouve donc quatre machineries spécifiques de biosynthèse :

- la voie NIF (pour « Nitrogène Fixation »), première voie découverte chez les bactéries¹⁶⁰.
- la voie ISC (pour « iron sulfur cluster ») retrouvée dans les bactéries et les mitochondries.
- le système SUF (pour « sulfur utilisation factors ») se trouvant généralement dans les bactéries et les plastides.
- la machinerie CIA (pour « cytosolic iron/sulfur cluster assembly »), présente chez les eucaryotes et liée de façon fonctionnelle à la voie ISC et impliquée dans la maturation d'apoprotéines cytosoliques et nucléaires.

Or, malgré des localisations différentes, au sein d'organelles spécialisées, la biosynthèse des protéines à centres fer-soufre nécessite une machinerie cellulaire complexe et coordonnée faisant intervenir de nombreuses protéines spécialisées et mais des étapes généralement conservées (**Figure 22**)¹⁷⁴.

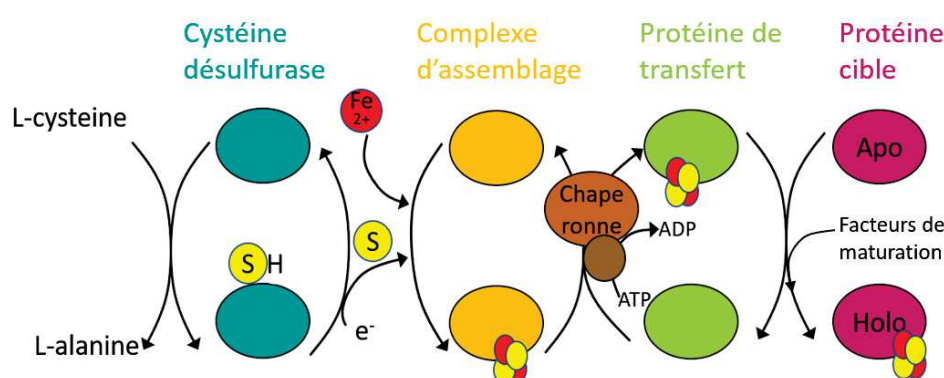


Figure 22: Schéma général de la voie de biosynthèse des centres [Fe-S]¹⁷³

De façon générale, la génération de soufre se fait à partir de L-cystéine grâce à une cystéine désulfurase (ainsi que par l'action d'une sulfur transférase). Le donneur de fer n'est, à ce jour pas connu. L'assemblage des atomes de fer et de soufre en centre [Fe-S] est opéré par une protéine d'assemblage (« scaffold »). Le groupement est ensuite transféré jusqu'à l'apoprotéine cible grâce à des navettes protéiques dites protéines de transfert ou de transport (« carrier »). Lorsque l'apoprotéine reçoit le groupement [Fe-S] elle passe alors de sa forme immature à la forme mature : holoprotéine^{154,169}.

1) Les cystéines désulfurases

Les premiers acteurs des voies de biosynthèse des centres [Fe-S] sont les cystéines désulfurases. Elles peuvent être classées par homologie de séquence du motif déterminant la spécificité catalytique:

- le groupe I (comprenant les protéines NifS et IscS décrites par la suite), possédant un motif SSGSACTS.
- le groupe II (comprenant SufS et CsdA décrites elles aussi par la suite) possédant un motif RXGHHCA¹⁷⁵.

Malgré des divergences structurelles entre ces deux groupes, la fonction d'une cystéine désulfurase reste inchangée : elle permet de libérer le soufre lié à une cystéine afin de le rendre disponible pour l'assemblage avec les atomes de fer.

La réaction peut notamment impliquer en premier lieu la formation d'une base de Schiff, c'est-à-dire une double liaison C=N entre une cystéine libre et le groupement aldéhyde d'une coenzyme : le phosphate de pyridoxal (PLP)¹⁷⁵.

Le tout est suivi par l'attaque nucléophile de la cystéine-PLP engendré par le site actif d'un groupe cystéinylthiol. En effet, les groupes thiols confèrent aux cystéines des fonctions spécialisées telles que : la nucléophilie, la forte affinité pour les métaux, ainsi que la formation de ponts disulfures¹⁷⁶. L'attaque nucléophile de la cystéine-PLP permet la formation d'un persulfure de cystéine (qui est un dérivé de la L-cystéine ayant un atome de soufre supplémentaire lié au groupe cystéinylthiol) permettant à son tour la libération d'une L-alanine¹⁷⁷. Enfin le persulfure peut alors être transféré à un résidu cystéine d'une protéine ne contenant pas au préalable de centre [Fe-S], telle qu'une protéine d'assemblage.

2) Les protéines d'assemblage et protéines chaperonnes

Ces protéines ont pour fonction de permettre l'assemblage en centre [Fe-S] des différents atomes libres de soufre et de fer.

Tout comme les cystéines désulfurases, elles peuvent être elles aussi distinguées en deux groupes (U-type scaffold et A-type scaffold) en fonction des motifs qu'elles contiennent, menant tous deux à la réduction du persulfure en sulfure pouvant alors être assemblé avec les atomes de fer pour former un centre [Fe-S]¹⁷⁸. Afin que cette étape d'assemblage soit réalisée, il est nécessaire que des donneurs d'électrons interviennent (tels que la ferrédoxine mitochondriale pour la voie ISC).

Les protéines de type A comportent des résidus conservés dans leur région C-terminale : C-X₄₂₋₄₄-D-X₂₀-C-G-C. On peut regrouper sous cette appellation des protéines donnant le centre [Fe-S] à des protéines de type U, ou encore des protéines chaperonnes.

Concernant les protéines d'assemblage de type U, la première caractérisée et la plus connue de toutes est NifU¹⁶⁰. Elles contiennent des domaines (3 pour NifU) permettant la formation de centres [Fe-S] pouvant ensuite être transférés vers une apoprotéine. On retrouve dans ce groupe des protéines

comprenant une partie similaire au domaine C-terminal de NifU chez les cyanobactéries, les plantes et les eucaryotes supérieurs¹⁷⁵, ce qui atteste encore une fois de la conservation évolutive de ce type de machinerie.

Il reste néanmoins un point non élucidé de cette étape d'assemblage pour les différents mécanismes de biosynthèse des centres [Fe-S] : d'où provient le fer et comment celui-ci est-il intégré aux atomes de soufre ? Néanmoins, les connaissances concernant le fonctionnement et la structure des protéines d'assemblage ont avancé ces dernières années.

En effet, nous savons désormais que les protéines d'assemblage de la voie SUF fonctionnent en complexe (SufB, SufC et SufD) contrairement aux voies ISC et CIA ne comprenant qu'une seule protéine principale (respectivement IscU et NBP35)¹⁷⁹.

Par la suite, l'intervention de protéines chaperonnes et de co-chaperonnes hydrolysant l'ATP en ADP fait alors retourner la protéine d'assemblage sous la forme immature dissociée du centre [Fe-S], qui sera lui alors associé à une protéine de transport^{175,178}.

3) Les protéines de transport

Une fois le centre [Fe-S] assemblé par les protéines d'assemblage, il doit être transféré à une apoprotéine. Les protéines impliquées dans ce transfert sont nommées transporteurs de type A canoniques (ATC). Il en existe un grand nombre et, par exemple, *Escherichia coli* en possède trois différentes (IscA, SufA et ErpA décrites plus précisément dans la prochaine partie), toutes proches phylogénétiquement. Initialement ces protéines n'ont pas été décrites comme spécifiques au transport puisqu'il leur est aussi possible de contribuer à la création du centre [Fe-S] en plus de le transférer à une apoprotéine¹⁸⁰.

Or, il est maintenant établi que ces protéines appartiennent à une catégorie à part entière de la machinerie de biosynthèse des centres [Fe-S]. Les ATC peuvent lier le centre [Fe-S] grâce à un motif de trois résidus cystéines, et le transfert du centre d'une protéine d'assemblage vers une protéine de transport est non réversible^{172,173}.

Il existe aussi des protéines de transport non usuelles, pour lesquelles il y a encore des nombreux débats. On retrouve notamment la classe de protéine NfuA présente chez *E.coli*, résultant en une fusion du domaine Nfu avec un domaine N-terminal dégénéré des ATC (ATC*) donc dépourvu des trois résidus cystéine qui lient le centre [Fe-S]¹⁸¹. Il semble que le domaine ATC* améliore l'efficacité du transfert des centres [Fe-S] en conditions de stress¹⁸¹. Il est parfois difficile de déterminer l'implication directe d'une protéine dans le transfert sans test d'activité *in vitro* c'est pour cela que des protéines homologues ont été classées comme protéines d'assemblages dans certains organismes et de transfert pour d'autres. C'est par exemple le cas pour Nbp35/ApbC pour qui on a assigné un rôle dans

l'assemblage chez *S. enterica* alors que son homologue est décrite en tant que protéine de transport chez les archae¹⁸².

De plus, il existe au sein des mitochondries, une autre famille de transporteurs nécessaire au fonctionnement de la voie cytosolique (CIA) : les transporteurs ABC mitochondriaux (ATM). On en retrouve aussi bien chez la levure (avec Atm1)¹⁸³ que chez les mammifères (ABCB7)¹⁸⁴ ou chez les végétaux (ATM1-ATM2-ATM3)¹⁷⁹. Ce sont des transporteurs intramembranaires permettant le passage de facteurs (encore non identifiés) contenant des atomes de soufres dont la voie CIA se sert comme précurseur pour synthétiser *de novo* des clusters [Fe-S].

La finalité de ces groupes de protéines de transport reste le fait de transférer le groupement [Fe-S] à une apoprotéine qui est la cible finale nécessitant le cluster.

4) Les apoprotéines cibles des centres [Fe-S]

Comme vu précédemment, dans une ultime étape, les centres [Fe-S] vont être incorporés dans protéines sous forme « apo » non mature, afin de les rendre stables et matures (sous forme « holo »). Comme évoqué plus haut, les apoprotéines, cibles finales des centres [Fe-S], sont impliqués dans de très nombreuses fonctions cellulaires.

Les fonctions cellulaires qui sont dépendantes de la biosynthèse des centres [Fe-S] diffèrent en fonction des organismes et des voies étudiées, mais on retrouve globalement des fonctions similaires pouvant être impactées.

La voie mitochondriale ISC, qu'elle soit bactérienne¹⁷³, végétale¹⁵⁵, ou pour d'autres eucaryotes¹⁵⁷, alimente des protéines impliquées dans:

- La synthèse de cofacteurs (tels que la lipoate synthase) ;
- Le fonctionnement des complexes I et II de la chaîne respiratoire et le transfert d'électrons
- L'approvisionnement en énergie par le cycle TCA (grâce à l'aconitase impliquant un centre [Fe-S]).

Concernant la voie CIA, elle génère des protéines impliquées dans la synthèse et réparation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles et la synthèse d'acides aminés. De plus, elle permet aussi la fonction de senseurs de l'environnement tels que les protéines humaines IRP1-2 impliquées dans homéostasie du fer, tel que vu précédemment, avec l'apport d'énergie par le cycle TCA (la forme holoprotéine de IRP1 étant l'aconitase).

La voie SUF, hébergée notamment par les plastes, permet la synthèse de protéines [Fe-S] impliquées dans des fonctions vitales telles que :

- L'assimilation de nutriments (comme l'azote et le soufre) ;
- Le fonctionnement de différentes voies de biosynthèse ; acides gras / isoprénoides / hème
- La conversion du pyruvate en Acétyl-CoA (notamment par le biais de la sous-unité E2 de la pyruvate déshydrogénase (PDH), qui contient un centre [Fe-S]) ;
- La photosynthèse (photosystème I).

Ainsi, les centres [Fe-S] sont nécessaires à une grande partie des organismes, puisqu'ils gouvernent des fonctions cellulaires diverses et indispensables au bon développement de ces êtres vivants.

D. Organisation et régulation de la voie de synthèse des protéines à centres [Fe-S]

Du fait de l'hétérogénéité des organismes abritant les voies de biosynthèse des protéines à centres [Fe-S], il est logique de penser que divers mécanismes de régulations de ces voies ont été développés au cours de l'évolution.

1) Au sein des bactéries

Le modèle bactérien le plus étudié concernant la biosynthèse des centres [Fe-S] est *E.coli* pour lequel il existe seulement deux des trois machineries bactériennes (ISC, SUF) organisées en opéron. Ainsi, la voie ISC est régie par l'opéron *iscRSUA-hscBA-fdx* ; alors que la voie SUF est, elle, sous contrôle de l'opéron *sufABCDSE* (**Figure 23**)^{172,174}. Ces deux opérons codent respectivement pour les complexes de cystéines désulfurases (IscS et SufS/E), la protéine d'assemblage IscU (dont l'action est facilitée par une interaction avec les protéines chaperonnes et co-chaperonnes : HscB/A) et le complexe d'échafaudage SufBC2D. De plus, les protéines de transport IscA et SufA sont elles aussi codées par les opérons, tout comme la ferrédoxine (fdx) permettant de fournir les électrons nécessaires à la voie ISC¹⁷⁴.

Le facteur de transcription *iscR* présent sur l'opéron *isc*, ainsi que le petit ARN non codant *RyhB*, contrôlent la transcription des gènes *isc* et *suf* chez *E. coli* ce qui permet aussi une autorégulation du répresseur¹⁷⁵. Les voies ISC et SUF sont réprimées en condition anaérobie mais fortement exprimées en réponse aux ROS. En effet, la protéine IscR contient trois cystéines pouvant se lier à un cluster [Fe-S]. Ce centre [Fe-S] assure une fonction de senseur du stress oxydatif (par le régulateur OxyR) et de la disponibilité en nutriments (par le régulateur de fer FUR). Qu'elle soit sous forme apo ou holo, *iscR* a la capacité de lier l'ADN et est impliquée dans une boucle de régulation.

La forme holo agit comme répresseur de l'opéron de la voie ISC jusqu'à ce que la présence de la forme Apo-IscR soit grandement réduite. La répression est alors atténuée et la protéine IscR peut être à nouveau synthétisée, la boucle d'autorégulation peut alors recommencer.

L'activation de la voie SUF est dépendante du niveau d'expression de la forme Apo-IscR qui lorsqu'elle

est en grande quantité engendre, tout comme la présence d'OxyR ou une limitation en fer, la transcription de l'opéron *suf*.

Cette régulation sur la base d'opéron est importante pour la croissance optimale des bactéries et pour une réponse efficace aux stress cellulaires.

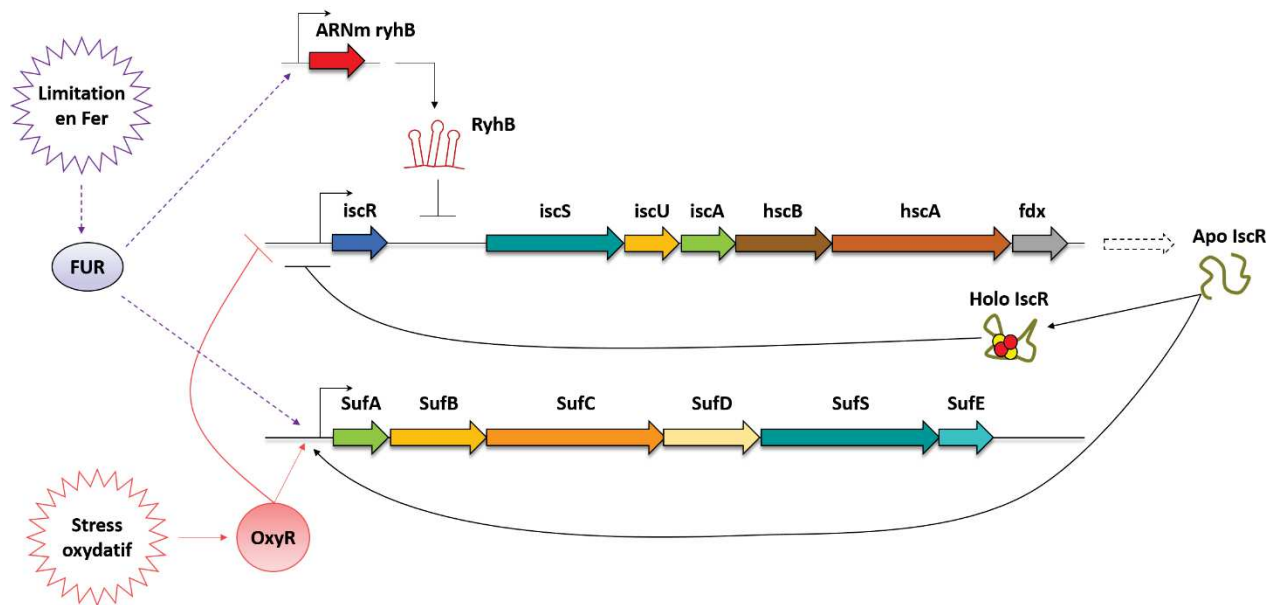


Figure 23: Régulation des opérons gouvernant les voies ISC et Suf présents chez *E. coli* (adapté de ^{172,174}).

2) Importance des protéines à centre [Fe-S] pour les cellules humaines

Les voies ISC et CIA sont présentes et indispensables aux cellules humaines. La machinerie ISC se situe dans les mitochondries (organelles nécessaires au bon fonctionnement de la cellule), or le fer présent dans ces organelles peut engendrer des dommages en favorisant la génération de ROS. Il est donc nécessaire d'avoir une régulation du fer mitochondrial.

La voie ISC est gouvernée par l'action d'un complexe faisant intervenir : la cystéine de sulfurase NFS1 et sa protéine stabilisatrice ISD11, la protéine d'assemblage ISCU, des protéines carrières de type A et la Frataxine (*fxn*) participant au transfert du soufre de NFS1 vers ISCU¹⁸⁵. Par la suite c'est l'action de chaperonne/co-chaperonne (analogues aux HscA/HscB bactériennes) HSPA9/HSC20, qui va aboutir à l'apport du centre [Fe-S] à l'apoprotéine cible¹⁸⁵.

De nombreuses recherches sont portées sur la Frataxine du fait de son implication dans l'ataxie de Friedreich, une pathologie neurodégénérative grave, causée par une déficience en cette protéine¹⁸⁵. Il est maintenant établi qu'une déficience en Frataxine induit de très nombreuses conséquences comme la perturbation des transports de fer intra et extracellulaires : ferritines (FRTs) et ferroportines (FPN)¹⁸⁶. Le tout aboutit à une réduction de l'efficacité de la voie ISC ainsi qu'à un dysfonctionnement de la régulation de l'homéostasie cellulaire par accumulation de fer intra cellulaire (Figure 24)^{186,187}. Ce phénomène augmente alors les dommages oxydatifs (ROS) délétères pour la cellule.

Ainsi, il est suggéré que la Frataxine pourrait fonctionner comme un régulateur du métabolisme du fer mitochondrial, permettant de favoriser soit la voie de synthèse de l'hème, soit la voie ISC. D'autres protéines importantes sont impliquées dans la régulation du fer : IRP1 et IRP2 en régulant l'expression de protéines des machineries ISC et de synthèse de l'hème^{186,188}. IRP1 a pour caractéristique d'être bi-fonctionnelle : en présence de fer, elle se complexe avec un centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ et devient l'aconitase, alors qu'en absence de fer la forme apoprotéine se réarrange structurellement pour devenir un élément régulateur. En effet, lorsque le taux de fer dans la cellule est bas, les protéines IRPs se lient à différents éléments de réponse au fer (IRE) présents sur les ARNm de protéines liées au métabolisme du fer. Deux possibilités de liaison s'offrent aux IRPs¹⁸⁶ :

- une liaison avec un IRE à l'extrémité 5'UTR réprimant la traduction de l'ARNm
- une liaison en 3' UTR qui semble augmenter la traduction.

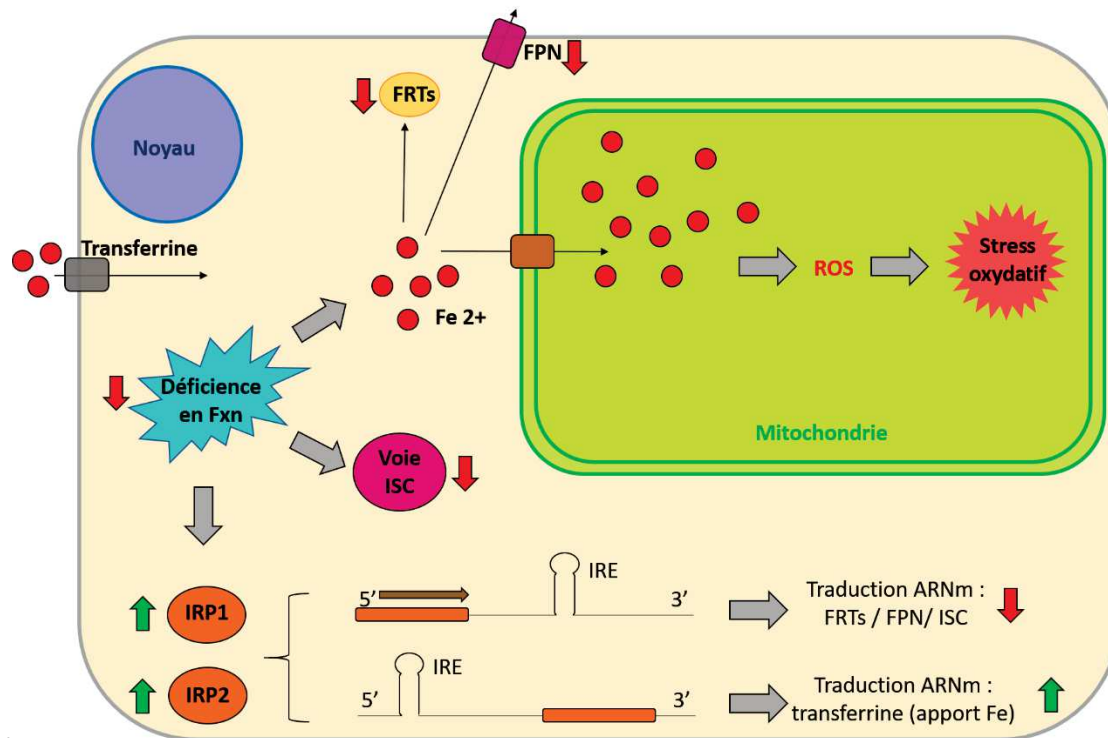


Figure 24: Régulation de l'homéostasie du fer des cellules eucaryotes (adapté de ^{186,188}).

3) Importance des centres $[\text{Fe-S}]$ chez les plantes

Les organismes photosynthétiques (*i.e* les plantes comme que *Arabidopsis thaliana*, les algues) sont particulièrement riches en protéines à centre $[\text{Fe-S}]$. Ils abritent plusieurs voies de biosynthèse des protéines à centre $[\text{Fe-S}]$ au sein de différents compartiments cellulaires. Les voies étant localisées dans différents compartiments : les plastes (voie SUF) ; les mitochondries (voie ISC) ; le cytosol (voie CIA), cela implique un moyen d'adressage spécifique des protéines vers les voies SUF et ISC. La compartimentation des machineries, tout comme la vulnérabilité due à une exposition à l'oxygène (particulièrement pour les chloroplastes) et la toxicité des nutriments libres $\text{Fe}^{2+/3+}$ et S^2 sont sûrement

à l'origine de la complexité des mécanismes de régulation des voies de biosynthèse des centres [Fe-S]¹⁷⁸.

L'héritage cyanobactérien des chloroplastes, où se déroulent les mécanismes de photosynthèse et de synthèse de l'hème, confère un système spécifique d'assemblage des centres [Fe-S] : la voie SUF¹⁵⁵. De ce fait certaines protéines impliquées dans cette voie ont des homologues de séquence et d'activité avec des protéines bactériennes, même si la machinerie propre aux eucaryotes a pu se complexifier comme pour la protéine SufE qui a trois isoformes chez *A.thaliana*.

De multiples protéines de synthèse de centres [Fe-S] sont importantes pour la survie de la plante ; ainsi leur absence engendre un phénotype de mort, ou une anomalie morphologique prononcée (chlorose et retard de croissance). C'est notamment le cas pour des protéines de la voie SUF comme HCF101/ AtSufB/ AtSufC¹⁶⁸/ AtSufD¹⁸⁹. De même, concernant la voie ISC, *Arabidopsis*, possède un homologue de la protéine Frataxine (nommée FH) qui comme pour les cellules animales est indispensable au développement de l'organisme. En effet, une déficience partielle en FH entraîne une diminution de l'activité des protéines à centre [Fe-S] mitochondriales (aconitase et succinate déshydrogénase) et une hypersensibilité aux ROS, alors qu'une déplétion totale en FH cause la mort de l'embryon¹⁷⁸.

En raison du besoin élevé en centres [Fe-S] des mitochondries et chloroplastes, ainsi que des phénotypes graves impliqués par une déficience dans les protéines à centres [Fe-S], une fine régulation de l'absorption et de l'assimilation de ces nutriments est nécessaire. Cependant, la régulation de l'homéostasie du fer et du soufre n'est pas complètement connue. Il semble que l'expression des gènes des voies ISC/CIA et ceux de la voie SUF puissent être activés indépendamment. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les gènes de la voie mitochondriale ISC sont liés à ceux de la voie cytosolique CIA formant alors un seul et même groupe contrairement aux gènes de la voie SUF formant un groupe fonctionnel à part entière¹⁷⁹. De plus ces deux groupes semblent être régulés différemment et en fonction de signaux externes à la plante.

En effet, chez les plantes supérieures, il s'avère que l'expression des protéines à centres [Fe-S] peut être adaptée en fonction du taux d'absorption de Fe, ainsi seules quelques protéines essentielles se verront maintenues¹⁷⁹ (**Figure 25**). C'est notamment le cas pour le photosystème I et le complexe I dont leur expression est abaissée lorsque les plants poussent dans des conditions pauvres en Fe¹⁹⁰, incitant possiblement un recyclage du Fe déjà présent. De plus une autre source de Fe vient des centres [Fe-S] qui libèrent du Fe lorsqu'ils sont endommagés. Au vu de la toxicité du Fe libre, il est alors impératif de le mobiliser afin de le réutiliser ou de le stocker grâce à la ferritine.

De même, les gènes ISC et SUF peuvent être régulés à la baisse lors d'une hypoxie ou lors d'une infection par un pathogène comme *Pseudomonas syringae*. En effet, lors d'une infection par un

pathogène, les centres [Fe-S] peuvent être détruits, en raison du stress oxydatif engendré par les ROS libérés afin de combattre l'infection, et leur expression peut être également diminuée afin de limiter la quantité de Fe libérée et enrayer l'augmentation des dégâts oxydatifs^{179,189}.

Pareillement, en cas d'hypoxie il semble que les centres [Fe-S] aient une durée de vie plus longue ce qui nécessite moins de biosynthèse de ces centres¹⁷⁹.

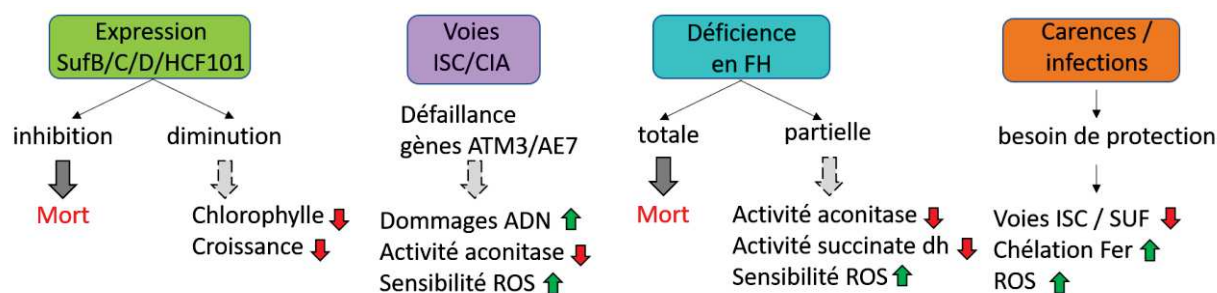


Figure 25: Exemples d'impacts liés à l'expression de protéines à centres [Fe-S] chez les plantes

4) Ce qui est connu chez les apicomplexes

Le phylum des apicomplexes auquel appartient *T. gondii*, mais aussi *P. falciparum* (un des agents du paludisme). Comme la plupart des eucaryotes, ces apicomplexes semblent coder pour des enzymes prédites pour participer à la biosynthèse de protéines à centres [Fe-S] (**Annexes 1 à 3**). Le travail de recherche sur les protéines [Fe-S] au sein de ces parasites est récent et a été jusqu'à présent essentiellement focalisé sur *P. falciparum*.

En ce qui concerne les autres membres du phylum, on peut trouver des informations sur la machinerie [Fe-S] de *Chromera velia* qui est génétiquement apparentée au phylum des apicomplexes¹⁹¹ mais n'est autre qu'une algue vivant associées aux coraux de la grande barrière de corail australienne. Le séquençage de son génome a révélé des voies provenant des parasites et des algues (elle contient un plaste photosynthétique) et elle est souvent considérée comme modèle pour l'étude des apicomplexes. A contrario, au sein du même phylum on retrouve des organismes dépourvus d'apicoplaste comme *Cryptosporidium parvum* qui est utile afin de comprendre les spécificités liées à la présence de l'apicoplaste.

Par comparaison avec les prédictions faites pour différents organismes modèles d'apicomplexes et apparentés (**Annexes 1 à 3**), comprenant *T. gondii*/ *P. falciparum*/ *C. velia*/ *C. parvum* il apparaît clairement que les apicomplexes comportent les principaux composants pour la synthèse des centres [Fe-S], Cela est valable pour les voies mitochondriales (ISC), cytoplasmique (CIA) et plastidique (SUF). En effet, il semble que ces quatre organismes comportent tous les composants de la voie CIA par homologie avec *A. thaliana* (**Annexe 1**). De plus, concernant la voie mitochondriale, il semble que la

majorité des composants de la voie sont présents pour les quatre apicomplexes étudiés (**Annexe 2**). Il subsiste néanmoins quelques divergences comme la possible absence d'homologues des IscA1 à 4 chez *C. parvum* alors qu'ils semblent être en partie présents pour les trois autres modèles. La plus grande disparité survient avec les prédictions concernant la voie SUF (**Annexe 3**). En effet, *C. parvum* ne semble pas posséder d'homologue de cette voie contrairement aux autres organismes, ce qui est tout à fait cohérent avec l'absence d'apicoplaste. Cependant, si l'on associe la voie SUF à la présence de l'apicoplaste, les différences fonctionnelles entre le plaste photosynthétique de *C. velia* et l'apicoplaste dépourvue de photosynthèse de *T. gondii* et *P. falciparum*, ne semble pas impliquer ou se répercuter sur la présence de protéines putatives de la voie SUF.

Bien que l'apicoplaste ne soit pas photosynthétique, il abrite plusieurs voies métaboliques indispensables aux parasites dont certaines sont prédites pour contenir des enzymes nécessitant des centres [Fe-S]¹⁹². C'est notamment le cas pour la lipoate synthase LIPA de la voie de synthèse de l'acide lipoïque ainsi que les protéines IspG-IspH nécessaires à la biosynthèse des isoprénoides.

Il s'avère que la voie DOXP des isoprénoides de *P. falciparum*, est la cible d'un anti-malarique (la fosmidomycine) ; c'est en fait la seule voie métabolique de l'apicoplaste qui est essentielle pour les stades sanguins du parasite. Par exemple, la supplémentation du milieu en isopentényle pyrophosphate (IPP)¹⁵⁶ permet aux parasites de survivre malgré l'absence d'apicoplaste. Il est donc naturel de supposer que des protéines à centre Fe-S (issus potentiellement de la voie SUF) nécessaires à la biosynthèse des isoprénoides ont une importance considérable pour les parasites, tout en étant absentes de l'hôte mammifère.

Par conséquent, une grande partie des études faites chez *P. falciparum* sont focalisées sur la voie plastidique SUF. Ce qui a permis de confirmer la localisation à l'apicoplaste de cette voie et de caractériser les premières interactions protéines-protéines avec le complexe SufS-SufE¹⁹³.

De plus, il a été démontré par des études fonctionnelles, que la voie SUF lorsqu'elle est perturbée entraîne une mort des parasites au stade sanguin de *P. falciparum*¹⁵⁶ ce qui n'est pas le cas lorsque ces parasites sont supplémentés en IPP. Cela semble confirmer l'importance de cette voie sur la synthèse des isoprénoides et le développement du stade sanguin. Dans un même temps, il apparaît que ces mêmes parasites ne contiennent plus d'apicoplaste ni le génome qu'il héberge, ce qui n'est pas le cas lorsque l'on inhibe seulement la voie des isoprénoides. Cela suggère alors que la voie SUF ne sert pas seulement à fournir des centres Fe-S à la voie MEP mais est aussi impliquée dans le maintien de l'apicoplaste chez *P. falciparum*.

Le fait que l'apicoplaste n'ait pas de fonction photosynthétique, contrairement aux chloroplastes, implique alors très probablement des différences dans la machinerie SUF. Ainsi, de par l'absence de

photosystèmes dans l'apicoplaste par exemple, une protéine comme HCF101, permettant notamment le transfert de centre [Fe-S] vers le photosystème I chez les plantes, a une fonction inconnue chez les apicomplexes. Les apicomplexes comportent des homologues d'HCF101 (**Annexe 3**), or, il s'avère que les homologues présents chez *T. gondii* et *P. falciparum* ne possèdent pas de peptide signal, ou de domaine bipartite permettant un adressage spécifique à l'apicoplaste et auraient alors une localisation cytosolique. Ces protéines, qui sont aussi présentes au sein d'organismes n'ayant pas de plastes^{125,194} (dont *Cryptosporidium*), ont peut-être une fonction originelle cytosolique et se seraient spécialisées dans une fonction liée au chloroplaste plus tard dans l'évolution.

Une autre protéine de la même famille que HCF101, Nbp35 (concernant la voie ISC) semble elle aussi être présente chez les apicomplexes, comme chez toutes les cellules eucaryotes^{194,195}. La protéine Nbp35 de *T. gondii* semble être localisée à la mitochondrie grâce à un domaine d'adressage en N-terminal¹⁵⁶. De plus elle semble être indispensable au bon développement du parasite mais non impliquée dans la biosynthèse des centres [Fe-S] mitochondriaux^{194,195}. Concernant le rôle de Nbp35 de *T. gondii* au vu de sa localisation, il a été émis l'hypothèse d'une implication dans la maturation des protéines à centre [Fe-S] cytosoliques se faisant à la face cytosolique de la membrane externe mitochondriale.

Malgré le peu d'informations disponibles sur les voies de synthèse des centres [Fe-S] chez *T. gondii*, il est intéressant de noter que ce parasite semble comporter certaines originalités par rapport aux modèles canoniques eucaryotes, dont certaines pourraient être exploitées pour de futures approches thérapeutiques. En effet, étant donné l'importance de ce type de voies métaboliques pour les organelles qui les hébergent, ainsi que leur implication dans de nombreuses fonctions vitales, il est probable que les voies de synthèse des centres [Fe-S] aient une importance majeure dans la croissance de *T. gondii*. Cependant, au moment où j'ai commencé ma thèse, aucune caractérisation n'avait été effectuée chez ce parasite. Or, depuis, la voie cytoplasmique a récemment été montrée comme étant essentielle pour les tachyzoïtes¹⁹⁵. Lors de ce projet de thèse, je me suis intéressée plus particulièrement aux deux voies de synthèse des centres [Fe-S] hébergées par les organelles d'origine endosymbiotique (mitochondrie et plaste) de *T. gondii* afin d'élucider leur contribution respective au développement des tachyzoïtes.

Résultats

Chapitre I : identification et caractérisation de deux protéines putatives des voies de biosynthèse Fe-S chez T. gondii

A. Introduction

Bien que les groupements prosthétiques [Fe-S] soient essentiels à la vie de nombreux organismes, leur synthèse et assemblage étaient relativement peu étudiés chez *T. gondii*.

Une analyse par recherches d'homologues entre *T. gondii* et la plante *A. thaliana* (qui comporte les trois voies, cytoplasmique, mitochondriale et plastidique), à l'aide de la base de données ToxoDB, nous a permis d'identifier les composants de ces machineries chez le parasite (**Annexes 1 à 3**). Nous avons ensuite utilisé l'outil bio-informatique MétalPrédator¹⁹⁶ grâce auquel plus d'une soixantaine de protéines candidates (**Annexe 4**), possédant un possible centre [Fe-S], ont été révélées. Parmi celle-ci, on trouve, comme chez d'autres eucaryotes, des protéines impliquées dans d'importantes fonctions cellulaires telles que les ADN et ARN polymérases ou encore des protéines impliquées dans le contrôle redox et le transfert d'électrons.

La base de données ToxoDB comporte des informations concernant la localisation¹⁹⁷ (données de protéomique spatiale par « hyperplexed localization of organelle proteins by isotope tagging » (hyperLOPIT) et l'essentialité¹⁹⁸ (données de crible CRISPR à l'échelle du génome) de nombreux candidats.

Cela nous a permis de voir que la plupart des composants des trois voies de biosynthèses hypothétiques, ISC/SUF/CIA, semblent être indispensables au parasite. De même, la localisation suggérée (plaste/mitochondrie/cytoplasme) de leurs composants est généralement semblable à celle des homologues végétaux (avec tout de même quelques exceptions, comme TgHCF101).

Au début de ce projet, aucune étude fonctionnelle n'avait été réalisée sur les voies de synthèse [Fe-S] de *T. gondii*. Depuis, l'étude de l'équipe de Giel Van Dooren¹⁹⁵ est parue, décrivant la caractérisation de la protéine TgNbp35 et l'importance de la voie CIA pour la survie du parasite.

De notre côté, nous avons voulu évaluer les contributions respectives des deux voies de synthèse des centres [Fe-S], hébergées par les organelles d'origine endosymbiotique du parasite, pour lesquelles nous avons généré plusieurs mutants spécifiques.

Ainsi, les candidats dont nous avons commencé l'étude sont : pour la voie SUF, la cystéine désulfurase SufS, son partenaire putatif SufE, ainsi que l'ATPase SufC ; pour la voie ISC, la cystéine désulfurase IscS et la protéine d'assemblage IscU. Nous avons pu obtenir rapidement des mutants pour les candidats SufS et IscU dont nous avons poursuivi en priorité l'étude approfondie. L'analyse fonctionnelle de ces deux protéines est décrite sous forme de manuscrit, intitulé « Differential contribution of two organelles of endosymbiotic origin to iron-sulfur cluster synthesis and overall, in Toxoplasma » et tel qu'il a été soumis à Plos Pathogens. Pour un soucis de cohérence concernant la nomenclature des protéines composants les voies de biosynthèse SUF et ISC, avec le récent papier de Gil Van Dooren¹⁹⁵, les mutants auparavant nommés TgSufS et TgIscU sont alors renommés dans cet article respectivement: TgNFS2 et TgISU1.

B. Differential contribution of two organelles of endosymbiotic origin to iron- sulfur cluster synthesis and overall, in Toxoplasma.

Differential contribution of two organelles of endosymbiotic origin to iron-sulfur cluster synthesis and overall fitness in *Toxoplasma*

Sarah Pamukcu¹, Aude Cerutti¹, Yann Bordat¹, Sonia Hem², Valérie Rofidal², Sébastien Besteiro^{3*}

¹LPHI, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France

²BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

³LPHI, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

* sebastien.besteiro@inserm.fr

Abstract

Iron-sulfur (Fe-S) clusters are one of the most ancient and ubiquitous prosthetic groups, and they are required by a variety of proteins involved in important metabolic processes. Apicomplexan parasites have inherited different plastidic and mitochondrial Fe-S clusters biosynthesis pathways through endosymbiosis. We have investigated the relative contributions of these pathways to the fitness of *Toxoplasma gondii*, an apicomplexan parasite causing disease in humans, by generating specific mutants. Phenotypic analysis and quantitative proteomics allowed us to highlight notable differences in these mutants. Both Fe-S cluster synthesis pathways are necessary for optimal parasite growth in vitro, but their disruption leads to markedly different fates: impairment of the plastidic pathway leads to a loss of the organelle and to parasite death, while disruption of the mitochondrial pathway trigger differentiation into a stress resistance stage. This highlights that otherwise similar biochemical pathways hosted by different sub-cellular compartments can have very different contributions to the biology of the parasites, which is something to consider when exploring novel strategies for therapeutic intervention.

Author summary

Toxoplasma gondii is a ubiquitous unicellular parasite that harbours two organelles of endosymbiotic origin: the mitochondrion, and a relict plastid named the apicoplast. Each one of these organelles contains its own machinery for synthesizing iron-sulfur clusters, which are important protein co-factors. In this study, we show that interfering with either the mitochondrial or the plastidic iron-sulfur cluster synthesizing machinery has a profound impact on parasite growth. However, while disrupting the plastidic pathway led to an irreversible loss of the organelle and subsequent death of the parasite, disrupting the mitochondrial pathway led to conversion of the parasites into a stress resistance form. We used a comparative quantitative proteomic analysis of the mutants, combined with experimental validation, to provide mechanistic clues into these different phenotypic outcomes. Although the consequences of disrupting each pathway were manifold, our data highlighted distinct changes at the metabolic level. For instance, the plastidic iron-sulfur cluster synthesis pathway is likely important for maintaining the lipid homeostasis of the parasites, while the mitochondrial pathway is clearly crucial for maintaining their respiratory capacity. Interestingly, we have discovered that other mutants severely impacted for mitochondrial function, in particular the respiratory chain, are able to survive and initiate conversion to the stress resistance form. This illustrates a different capacity for *T. gondii* to adapt for survival in response to distinct metabolic dysregulations.

Keywords: iron-sulfur cluster, *Toxoplasma*, differentiation, bradyzoite, apicoplast, mitochondrion

Short title: Iron-sulfur cluster synthesis in *Toxoplasma*

46 Introduction

47
48 Endosymbiotic events were crucial in the evolutionary timeline of eukaryotic cells. Mitochondria and plastids
49 evolved from free-living prokaryotes that were taken up by early eukaryotic ancestors and transformed into
50 permanent subcellular compartments that have become essential for harnessing energy or synthesizing
51 essential metabolites in present-day eukaryotes [1]. As semiautonomous organelles, they contain a small
52 genome, but during the course of evolution a considerable part of their genes have been transferred to the
53 cell nucleus. Yet, they rely largely on nuclear factors for their maintenance and expression. Both organelles are
54 involved in critically important biochemical processes. Mitochondria, which are found in most eukaryotic
55 organisms, are mostly known as the powerhouses of the cell, owing to their ability to produce ATP through
56 respiration. Importantly, they are also involved in several other metabolic pathways [2], including the synthesis
57 of heme groups, steroids, amino acids, and iron-sulfur (Fe-S) clusters. Moreover, they have important cellular
58 functions in regulating redox and calcium homeostasis. Similarly, plastids that are found in plants, algae and
59 some other eukaryotic organisms, host a diverse array of pathways that contribute greatly to the cellular
60 metabolism [3]. While often identified mainly as compartments where photosynthesis occurs, plastids host other
61 important metabolic pathways. For example, they are involved in the assimilation of nitrogen and sulfur, as
62 well as the synthesis of carbohydrates, amino acids, fatty acids and specific lipids, hormone precursors, and also
63 Fe-S clusters. The best-characterized plastid is arguably the plant cell chloroplast, but not all plastids have
64 photosynthetic function, and in higher plants they are in fact a diverse group of organelles that share basal
65 metabolic pathways, but also have specific physiological roles [4].
66

67
68 The phylum Apicomplexa comprises a large number of single-celled protozoan parasites responsible for serious
69 disease in animals, including humans. For example, this phylum includes parasites of the genus *Plasmodium*
70 that are responsible for the deadly malaria, and *Toxoplasma gondii* a ubiquitous parasite that can lead to a
71 severe pathology in immunocompromised individuals. Apicomplexan parasites evolved from a photosynthetic
72 ancestor and many of them still retain a plastid [5,6]. This plastid, named the apicoplast, originated from a
73 secondary endosymbiotic event [7,8]. It has lost its photosynthetic properties as the ancestors of Apicomplexa
74 switched to an intracellular parasitic lifestyle [9]. The apicoplast nevertheless still hosts four main metabolic
75 pathways [10,11]: a so-called non-mevalonate pathway for the synthesis of isoprenoid precursors, a type II
76 fatty acid synthesis pathway (FASII), part of the heme synthesis pathway, and a Fe-S cluster synthesis
77 pathway. As the apicoplast is involved in these important biological processes for the parasite, and as they
78 markedly differ from those of the host (because of their algal origin), that makes it a valuable potential drug
79 target. Apicomplexan parasites also generally contain a single tubular mitochondrion, although its aspect may
80 vary during parasite development [12,13]. The organelle is an important contributor to the parasite's
81 metabolic needs [14]. It classically hosts tricarboxylic acid (TCA) cycle reactions, which are the main source of
82 electrons that feeds the mitochondrial electron transport chain (ETC) which generates a proton gradient used
83 for ATP production. It also contains additional metabolic pathways, like a Fe-S cluster synthesis pathway and
84 part of the heme synthesis pathway operating in collaboration with the apicoplast. The latter reflects obvious
85 functional links between the organelles and potential metabolic interactions, which is also illustrated by their
86 physical connection during parasite development [15,16].
87

88
89 Fe-S clusters are simple and ubiquitous cofactors involved in a great variety of cellular processes. As their name
90 implies, they are composed of iron and inorganic sulfur whose chemical properties confer key structural or
91 electron transfer features to proteins in all kingdoms of life. They are important to the activities of numerous
proteins that play essential roles to sustain fundamental life processes

including, in addition to electron transfer and exchange, iron storage, protein folding, oxygen/nitrogen stress sensing, and gene regulation [17]. The synthesis of Fe-S clusters and their insertion into apoproteins requires complex machineries and several distinct pathways have been identified in bacteria for synthesizing these ancient cofactors [18]. They include the ISC (iron-sulfur cluster) pathway for general Fe-S cluster assembly [19], and the SUF (sulfur formation) pathway [20] that is potentially activated in oxidative stress conditions [21]. Eukaryotes have inherited machineries for synthesizing Fe-S cluster through their endosymbionts [22]. As a result, organisms with both mitochondria and plastids, like land plants, use the ISC pathway for assembling Fe-S clusters in the mitochondria and the SUF pathway for Fe-S clusters in the plastids [23]. Additional protein components that constitute a cytosolic Fe-S cluster assembly machinery (CIA) have also been identified: this pathway is important for the generation of cytosolic, but also of nuclear Fe-S proteins, and is highly dependent on the ISC mitochondrial pathway for providing a sulfur-containing precursor [24].

Like in plants and algae, apicoplast-containing Apicomplexa seem to harbour the three (ISC, SUF and CIA) Fe-S cluster synthesis pathways. Although the CIA pathway was recently shown to be important for *Toxoplasma* fitness [25], investigations in apicomplexan parasites have been so far almost exclusively focused on the apicoplast-located SUF pathway [26–30] and mostly in *Plasmodium* species. The SUF pathway was shown to be essential for the viability of malaria parasites during both the erythrocytic and sexual stages of development, and has thus been recognized as a putative avenue for discovering new antiparasitic drug targets (reviewed in [31]). Contrarily to the ISC pathway, which is also present in the mammalian hosts of apicomplexan parasites, the SUF pathway may indeed yield interesting specificities that may be leveraged for therapeutic intervention. However, very little is known about Fe-S clusters synthesis in other apicomplexan parasites, including *T. gondii*. For instance, out of the four known metabolic pathways hosted by the apicoplast, Fe-S synthesis was the only one remaining to be functionally investigated in *T. gondii*, while the others were all shown to be essential for the tachyzoite stage of the parasite (a fast replicating developmental stage responsible for the symptoms of the disease) [32–35]. Here, we present the characterization of two *T. gondii* mutants we generated to specifically impact the plastidic and mitochondrial SUF and ISC pathways, respectively. Our goal was to assess the relative contributions of these compartmentalized pathways to parasite development and fitness.

Results

TgNFS2 and *TgISU1* are functional homologs of components of the Fe-S cluster synthesis pathways

Fe-S cluster biosynthesis pathways in the mitochondrion and the plastid follow a similar general pattern: cysteine desulfurases (NFS1, NFS2) produce sulfur from L-cysteine, scaffold proteins (ISU1, SufB/C/D) provide a molecular platform allowing iron and sulfur to meet and form a cluster, and finally carrier proteins (like IscA or SufA) deliver the cluster to target apoproteins [23]. The cytosolic CIA pathway, which is responsible for the de novo formation of Fe-S clusters to be incorporated in cytosolic and nuclear proteins, is dependent on the ISC pathway, as its first step requires the import of a yet unknown sulfur-containing precursor that is translocated to the cytosol from the mitochondrion [24]. To get a general overview of the predicted components for the Fe-S cluster machinery in *T. gondii*, we conducted homology searches in the ToxoDB.org database [36], using well-characterized proteins from plants (*Arabidopsis thaliana*) belonging to the SUF, ISC and CIA pathways (Table S1). Data from global mapping of protein subcellular location by hyperLOPIT spatial proteomics [37] was in general in good accordance with the expected localization of the homologs

(with the noticeable exception of members of the NBP35/HCF101 ATP-binding proteins). Overall, our search revealed that *T. gondii* appeared to have a good conservation of all the main components of the three ISC, SUF and CIA Fe-S synthesis pathways (Table S1, Figure 1A). Additional information available on ToxoDB.org such as scores from a CRISPR/Cas9-based genome-wide screening [38], highlighted that most components of the three pathways are predicted to be important for parasite fitness. This suggests several Fe-S proteins localizing to the endosymbiotic organelles, but also the cytosol/nucleus, are essential for the optimal growth of tachyzoites. In order to verify this, our aim was to specifically interfere with the apicoplast-localized SUF pathway or the mitochondrion-localized ISC pathway in *T. gondii* tachyzoites. More precisely, we wanted to target the homologs of *A. thaliana* NFS2 and ISU1, which are both central (and presumably essential) to their respective pathways (Figure 1A): NFS2 is a cysteine desulfurase that provides the inorganic sulfur part of plastidic Fe-S clusters, while ISU1 is a scaffold protein important for cluster assembly in the mitochondrial pathway. Interfering with these key players of the upstream machinery would likely lead to a comparable disruption of the respective Fe-S cluster biogenesis pathways hosted by each organelle [39].

As a first step, we sought to determine whether TgNFS2 (TGGT1_216170) and TgISU1 (TGGT1_237560) were real functional homologs by performing complementation assays of bacterial mutants. In many bacteria, the ISC machinery is the primary system for general Fe-S cluster biosynthesis, while the SUF system plays a similar general role, but is mostly operative under stress conditions (like iron limitation or oxidative stress). In *Escherichia coli*, both pathways are partially redundant, but their individual disruption results in slowed bacterial growth, especially when limiting iron availability with a specific chelator [40]. Expression of the predicted functional domains of TgNFS2 and TgISU1 in mutant strains for the corresponding *E. coli* proteins (named SUFS and ISCU, respectively) improved bacterial growth, in the presence of an iron chelator or not (Figure 1B). The complementation seemed partial as complemented strains remained more sensitive to the iron chelator than the wild-type strain. Yet, and although stationary phase was reached earlier than for the wild-type bacteria, contrarily to the mutants the complemented strains showed a bacterial density close to that of the WT at stationary phase. This suggests TgNFS2 and TgISU1, in addition to a good sequence homology with their bacterial homologues (Figure S1), have a conserved function.

We next determined the sub-cellular localizations of TgNFS2 and TgISU1 by epitope tagging of the native proteins. This was achieved in the TATi Δ Ku80 cell line, which favors homologous recombination and would allow transactivation of a Tet operator-modified promoter we would later use for generating a conditional mutant in this background [41–43]. A sequence coding for a C-terminal triple hemagglutinin (HA) epitope tag was inserted at the endogenous TgNFS2 or TgISU1 locus by homologous recombination (Figure S2). Using the anti-HA antibody, by immunoblot we detected two products for each protein (Figure 2A, B), likely corresponding to their immature and mature forms (ie after cleavage of the transit peptide upon import into the organelle). Accordingly, the analysis of TgNFS2 and TgISU1 sequences with several subcellular localization and N-terminal sorting signals site predictors confirmed they likely contained sequences for plastidic and mitochondrial targeting [44], respectively, although no consensus position of the exact cleavage sites could be determined. Immunofluorescence assay (IFA) in *T. gondii* tachyzoites confirmed HA-tagged TgNFS2 and TgISU1 co-localize with markers of the apicoplast and the mitochondrion, respectively (Figure 2C, D).

NFS2 is a cysteine desulfurase whose activity is enhanced by an interaction with the SUFE protein [45]. Similar to plants that express several SUFE homologues [46], there are two putative SUFE-like proteins in *T. gondii* (Table S1), one of which was already predicted to reside in the apicoplast by

hyperLOPIT (TgSUF1, TGGT1_239320). We generated a cell line expressing an HA-tagged version of the other, TgSUF2 (TGGT1_277010, Figure S3A, B, C), whose localization was previously unknown. Like for TgNFS2, several programs predicted a plastidic transit peptide, which was confirmed by immunoblot analysis (detecting TgSUF2 immature and mature forms, Figure S3D). IFA showed TgSUF2 co-localizes with an apicoplast marker (Figure S3E). This further confirms that the initial steps of Fe-S cluster biogenesis in the apicoplast are likely functionally-conserved.

Disruption of either the plastidic or the mitochondrial Fe-S cluster pathway has a profound impact on parasite growth

In order to get insights into plastidic and mitochondrial Fe-S biogenesis, we generated conditional mutant cell lines in the TgNFS2-HA or TgISU1-HA-expressing TATi Δ Ku80 background [43]. Replacement of the endogenous promoters by an inducible-Tet07SAG4 promoter, through a single homologous recombination at the loci of interest (Figure S4), yielded TgNFS2 and TgISU1 conditional knock-down cell lines (cKD TgNFS2-HA and cKD TgISU1-HA, respectively). In these cell lines, the addition of anhydrotetracycline (ATc) can repress transcription through a Tet-Off system [47]. For each cKD cell line several transgenic clones were obtained and were found to behave similarly in the initial phenotypic assays we performed, so only one was analysed further. Transgenic parasites were grown for various periods of time in presence of ATc, and protein down-regulation was evaluated. Immunoblot and IFA analyses of cKD further -HA and cKD TgISU1-HA parasites showed that the addition of ATc efficiently down-regulated the expression of TgNFS2 (Figure 3A, C) and TgISU1 (Figure 3B, D), and most of the proteins were undetectable after two days of incubation.

We also generated complemented cell lines expressing constitutively an additional copy of TgNFS2 and TgISU1 from the uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) locus from a tubulin promoter in their respective conditional mutant backgrounds (Figure S5A, B). We confirmed by semi-quantitative RT-PCR (Figure S5C) that the transcription of TgNFS2 and TgISU1 genes was effectively repressed in the cKD cell lines upon addition of ATc, whereas the corresponding complemented cell lines exhibited a high transcription level regardless of ATc addition (due to the expression from the strong tubulin promoter).

We next evaluated the consequences of TgNFS2 and TgISU1 depletion on *T. gondii* growth in vitro. First, to assess the impact on the parasite lytic cycle, the capacity of the mutants and complemented parasites to produce lysis plaques was analyzed on a host cells monolayer in absence or continuous presence of ATc for 7 days (Figure 4A, B). Depletion of both proteins completely prevented plaque formation, which was restored in the complemented cell lines. To assess whether this defect in the lytic cycle is due to a replication problem, all cell lines were preincubated in absence or presence of ATc for 48 hours and released mechanically, before infecting new host cells and growing them for an additional 24 hours in ATc prior to parasite counting. We noted that incubation with ATc led to an accumulation of vacuoles with fewer parasites, yet that was not the case in the complemented cell lines (Figure 4C, D). Overall, these data show that either TgNFS2 or TgISU1 depletion impacts parasite growth.

Then, we sought to assess if the viability of the mutant parasites was irreversibly affected. We thus performed another series of plaque assays, but at the end of the 7-day incubation, we washed out the ATc, incubated the parasites for an extra 7 days in the absence of ATc and evaluated plaque formation (Figure 4E). In these conditions, cKD TgNFS2-HA parasites displayed very small plaques suggesting their viability was irreversibly impacted. In contrast, cKD TgISU1-HA parasites showed plaques, suggesting parasite growth had at least partly resumed after ATc washout, while host cell

lysis remained limited if the drug was kept continuously during the same period of time. This suggests that although depletion of TgISU1 has a marked impact on parasite growth, it is not completely lethal.

We performed IFAs to assess possible morphological defects that may explain the impaired growths of cKD TgNFS2-HA and cKD TgISU1-HA parasites. We stained the apicoplast and mitochondrion of parasites kept in the continuous presence of ATc for several days. cKD TgNFS2-HA parasites managed to grow and egress after three days and were seeded onto new host cells, where they were kept for two more days in the presence of ATc. During this second phase of intracellular development, and in accordance with the replication assays (Figure 4C), growth was slowed down considerably. Strikingly, while the mitochondrial network seemed normal, we noticed a progressive loss of the apicoplast marker TgCPN60 (Figure 5A), which was quantified (Figure 5B). As this could reflect a specific impact on this protein marker rather than a loss of the organelle, we also stained the parasites with fluorescent streptavidin, which mainly detects the biotinylated apicoplast protein acetyl-CoA carboxylase [48], confirming a similar loss of signal (Figure S6). This suggests there is a general impact of TgNFS2 depletion on the organelle. The growth kinetics we observed for this mutant are consistent with the “delayed death” effect observed in apicoplast-defective parasites [6,49,50]. On the other hand, we were able to grow cKD TgISU1-HA parasites for five days of continuous culture: they developed large vacuoles and showed little sign of egress from the host cells (Figure 5C). Both the mitochondrion and the apicoplast appeared otherwise normal morphologically. These large vacuoles could reflect a defect in the parasite egress stage of the lytic cycle [51]. We thus performed an egress assay on cKD TgISU1-HA parasites that were kept for up to five days in the presence of ATc, and they were able to egress normally upon addition of a calcium ionophore (Figure 5D). These large vacuoles are also reminiscent of cyst-like structures [52], so alternatively this may reflect spontaneous stage conversion. Cysts are intracellular structures that contain the slow-growing form of *T. gondii*, called the bradyzoite stage (which is responsible for the chronic phase of the disease), and they may appear even during *in vitro* growth in particular stress conditions [53]. Yet, this mutant cell line was generated in a type I *T. gondii* strain, which is associated with acute toxoplasmosis in the mouse model [54], and typically does not spontaneously form cysts. So, to be confirmed this hypothesis needed further investigations, as we will see later in the manuscript.

In any case, our data show that interfering with the plastidic and mitochondrial Fe-S protein pathways both had important consequences on parasite growth, but had a markedly different impact at a cellular level.

Use of label-free quantitative proteomics to identify pathways affected by TgNFS2 or TgISU1 depletion

There is a wide variety of eukaryotic cellular processes that are depending on Fe-S cluster proteins. To get an overview of the potential *T. gondii* Fe-S proteome, we used a computational tool able to predict metal-binding sites in protein sequences [55], and performed subsequent manual curation to refine the annotation. We identified 64 proteins encompassing various cellular functions or metabolic pathways that included, beyond the Fe-S synthesis machinery itself, several DNA and RNA polymerases, proteins involved in redox control and electron transfer, and radical S-adenosylmethionine (SAM) enzymes involved in methylation and methylthiolation (Table S2). HyperLOPIT data or manual curation helped us assign a putative localization for these candidates. A considerable proportion (19%) of these were predicted to localize to the nucleus, where many eukaryotic Fe-S proteins are known to be involved in DNA replication and repair [56]. Yet, strikingly,

most of the predicted Fe-S proteins likely localize to the endosymbiotic organelles. Several (19%) are predicted to be apicoplast-resident proteins, including radical SAM enzymes lipoate synthase (LipA) [57] and MiaB, a tRNA modification enzyme [58], as well as the LspG and LspH oxidoreductases of the non-mevalonate isoprenoid pathway [59]. Finally, for the most part (43%), candidate Fe-S proteins were predicted to be mitochondrial, with noticeably several important proteins of the respiratory chain (SDHB, the Fe-S subunit of the succinate dehydrogenase complex, Rieske protein and TgApiCox13) [60–62], but also enzymes involved in other metabolic pathways such as heme or molybdopterin synthesis. CRISPR/Cas9 fitness scores [38] confirmed many of these putative Fe-S proteins likely support essential functions for parasite growth.

We sought to confirm these results experimentally. Thus, in order to uncover the pathways primarily affected by the depletion of TgISU1 and TgNFS2, and to identify potential Fe-S protein targets, we conducted global label-free quantitative proteomic analyses. Like most plastidic or mitochondrial proteins, candidate Fe-S acceptors residing in these organelles are nuclear-encoded and thus need to be imported after translation and have to be unfolded to reach the stroma of the organelle. This not only implies the addition of the Fe-S cofactor should happen locally in the organelle, but also that this may have a role in proper folding of these proteins. We thus assumed that disrupting a specific pathway may have a direct effect on the stability and expression levels of local Fe-S proteins. Cellular downstream pathways or functions may also be affected, while other pathways may be upregulated in compensation. Parasites were treated for two days with ATc (TgISU1-HA) or three days (cKD TgNFS2-HA, as it takes slightly longer to be depleted, Figure 3A), prior to a global proteomic analysis comparing protein expression with the ATc-treated TATi Δ Ku80 control. For each mutant, we selected candidates with a $\log_2(\text{fold change}) \leq -0.55$ or ≥ 0.55 (corresponding to a ~ 1.47 -fold change in decreased or increased expression) and a p-value < 0.05 (ANOVA, $n=4$ biological replicates) (Tables S3 and S4, Figure 6A, B). To get a more exhaustive overview of proteins whose amounts varied drastically, we completed this dataset by selecting some candidates that were consistently and specifically absent from the mutant cell lines or only expressed in these (Tables S3 and S4).

Overall, depletion of TgISU1 led to a higher variability in protein expression and while the pattern of expression was essentially specific for the respective mutants, a number of shared variant proteins were found (Figure 6C, Table S5). For instance, common lower expressed candidates include a SAM synthase, possibly reflecting a general perturbation of SAM biosynthesis upon loss of function of Fe-S-containing radical SAM enzymes [63]. Using dedicated expression data [64,65] available on ToxoDB.org we realized that, strikingly, many of the common variant proteins were stage-specific proteins (Table S5). For instance, the protein whose expression went down the most is SAG-related sequence (SRS) 19F. The SRS family contains GPI-anchored surface antigens related to SAG1, the first characterized *T. gondii* surface antigen, and whose expression is largely stage-specific [66]. This protein, SRS19F, may be most highly expressed in stages present in the definitive host [65,67]. Conversely, SRS44, also known as CST1 and one of the earliest marker of stage conversion to bradyzoites [68], was upregulated in both mutants. Several other bradyzoite proteins whose expression increased included Ank1, a tetratricopeptide-repeat protein highly upregulated in the cyst-stages but not necessary for stage conversion [69], aspartyl protease ASP1, an α -galactosidase, as well as several dense granule proteins (GRA). Dense granules are specialized organelles that secrete GRA proteins that are known to participate in nutrient acquisition, immune evasion, and host cell-cycle manipulation. Many GRA have been characterized in the tachyzoite stage, but several are stage-specific and expressed in bradyzoites [70]. It should be noted that bradyzoite-specific proteins were generally much strongly expressed upon TgISU1 depletion than TgNFS2 depletion. Nevertheless, altogether these results show that altering either the plastidic or the mitochondrial Fe-

S cluster synthesis pathway led to an initial activation of the expression of some markers of the bradyzoite stage, whose involvement in the stress-mediated response is well documented [53].

Depletion of TgNFS2 has an impact on the apicoplast, but also beyond the organelle

We next focused on proteins that varied specifically upon depletion of TgNFS2 (Table S3). Using the hyperLOPIT data available on ToxoDB.org, we assessed the putative localization of the candidates (Figure 6D, Figure S7A) and we also defined putative functional classes based on manual curation (Figure 6A, Figure S7B). Surprisingly, few apicoplast proteins were impacted. This could reflect a limited impact on apicoplast Fe-S apoproteins, but this is in contradiction with the late, yet pronounced, effect we see on the organelle in the absence of TgNFS2 (Figure 5A, B). There might also be a bias due to an overall low protein abundance: less than half of the apicoplast candidates of the predicted Fe-S proteome (Table S2) were robustly detected even in the control for instance, including our target protein TgNFS2. Finally, of course it is possible that depletion of Fe-S clusters, while impacting the functionality of target proteins, did not have a considerable effect on their abundance. We sought to verify this for apicoplast stroma-localized LipA, a well-established and evolutionarily-conserved Fe-S cluster protein, which was found to be only marginally less expressed in our analysis (Table S3). LipA is responsible for the lipoylation of a single apicoplast target protein, the E2 subunit of the pyruvate dehydrogenase (PDH) [32]. Using an anti-lipoic acid antibody on cKD TgNFS2-HA protein extracts, we could already see a marked decrease in lipoylated PDH-E2 after only one day of ATc incubation (Figure 7A). This was not due to a general demise of the apicoplast as it considerably earlier than the observed loss of the organelle (Figure 5A, B), and levels of the CPN60 apicoplast marker were clearly not as markedly impacted (Figure 7A). This is also unlikely to reflect a general decrease of TgPDH-E2 levels upon TgNFS2 knock-down, as our quantitative proteomics data, which was performed after 3 days of ATc incubation, show the same amount of unique peptides for TgPDH-E2 (32 ± 2.5 for the control and 32.25 ± 2.75 for the mutant, ~60% of sequence coverage). This finding suggests apicoplast Fe-S-dependent activities may be specifically affected in our mutant, which would happen before observing the general demise and loss of the organelle. Long term incubation of cKD TgNFS2-HA parasites with ATc and co-staining with apicoplast and inner membrane complex (IMC) markers, revealed general cell division defects, including organelle segregation problems and an abnormal membranous structures (Figure 7B). Overall, this suggests impacting the Fe-S cluster synthesis pathway in the apicoplast had important metabolic consequences beyond the organelle itself.

Depletion of TgISU1 impacts the mitochondrial respiratory chain

We also analyzed the proteins whose abundance changed upon TgISU1 depletion (Table S4). Again, we used hyperLOPIT data to determine the localization of variant proteins (Figure 6E, Figure S8A) and we also inferred their potential function from GO terms or manual curation (Figure 6B, Figure S8B). Depletion of TgISU1 had a notable impact locally, as numerous mitochondrial proteins were found in lower abundance. Remarkably, most of these proteins were identified as members of the mitochondrial respiratory chain: while our proteomic study detected peptides corresponding to as much as 92% of the hyperLOPIT-predicted mitochondrial membrane and soluble proteins, 12% of these were found to be significantly less expressed upon TgISU1 depletion, 60% of which are known mitochondrial ETC components (Figure 6A, Figure 8A, Table S4). This suggests a specific effect of TgISU1 depletion on the mitochondrial ETC. This ETC comprises four complexes in Apicomplexa (which typically lack complex I), in which several Fe-S proteins have important function. As

mentioned earlier, they include the Fe-S subunit of the succinate dehydrogenase complex (SDHB, part of complex II), the Rieske protein (part of complex III) and TgApiCox13 (part of complex IV) [60–62]. Not only these three Fe-S cluster proteins were found to be less expressed upon TgISU1 depletion, but about 60% and 80% of complexes III and IV components (including recently characterized parasite-specific subunits [61,62]), respectively, were also significantly less abundant (Table S4, Figure 8A). The impact on components of complexes III and IV beyond their respective Fe-S-dependent subunits is not surprising: as shown by others in *T. gondii* depletion of selected members of a mitochondrial ETC complex can result in stalled assembly or impaired stability of the whole complex [60–62,71].

We sought to verify the impact of TgISU1 depletion on proteins of the mitochondrial respiratory chain by tagging two candidates, TgSDHB and TgApiCox13. In order to do this, due to the lack of efficient selectable marker in the cKD TgISU1-HA cell line, we first had to generate a new independent cKD TgISU1 untagged mutant from the TATi ΔKu80 cell line (Figure S9A, B). In this cell line, we verified proper regulation of TgISU1 expression by ATc (Figure S9C) and impact of TgISU1 depletion on parasite growth (Figure S9D). In this cKD TgISU1 mutant, a sequence coding for a C-terminal triple HA epitope tag was inserted at the endogenous TgSDHB or TgApiCox13 locus by homologous recombination (Figure S10). We then incubated these parasites with ATc for three days and used an anti-HA antibody to detect and quantify the proteins of interest by IFA (Figure 8B) and immunoblot (Figure 8C). In accordance with the quantitative proteomics data, both TgSDHB and TgApiCox13 were found to be less expressed in absence of TgISU1.

This suggested the mitochondrial membrane potential and consequently the respiratory capacity of the mitochondrion were likely altered in the absence of a functional mitochondrial Fe-S cluster synthesis pathway. To verify this, we performed flow cytometry quantification using JC-1, a monomeric green fluorescent carbocyanine dye that accumulates as a red fluorescent aggregates in mitochondria depending on their membrane potential (Figure 8D). Depletion of TgISU1 led to a marked decrease of the parasite population displaying a strong red signal (Figure 8D). The effect was maximal after two days of ATc treatment and not further increased by a four-day treatment, which is consistent with the quantitative proteomics data already showing strong impact on proteins from complexes II, III and IV after only two days of ATc treatment. It should be noted that although we believe the drop in mitochondrial membrane potential is likely due to a specific alteration of the respiratory chain, it may also be due to a loss of parasite viability. Reassuringly, our results are in line with the recent findings obtained by Aw et al., who generated a mutant of mitochondrial Fe-S cluster synthesis (by depleting TgNFS1), and observed a sharp decrease in TgSDHB abundance and a clear drop in mitochondrial O₂ consumption rate [25].

Concomitantly to the lesser expression of mitochondrial respiratory chain subunits, the proteomics analysis revealed TgISU1 depletion induced a significant increase in cytosolic enzymes involved in glycolysis, as well as its branching off pentose phosphate pathway (Figure 8A, B, Table S4). The upregulation of glycolytic enzymes potentially reflects a metabolic compensation for mitochondrial defects in energy production due to the impairment of the respiratory chain. Other proteins whose abundance was markedly decreased were predicted to be cytoplasmic or nuclear, including proteins involved in DNA repair and replication (Table S4), which is perhaps unsurprising as the cytosolic CIA Fe-S cluster assembly pathway is supposedly dependent from the ISC pathway [24]. Finally, the changes in abundance of several RNA-binding proteins involved in mRNA half-life or transcription/translation regulation may also reflect adaptation to a stress (Table S4).

409 Depletion of TgISU1 initiates conversion into bradyzoites

410 Another feature highlighted by the quantitative proteomics analysis of the TgISU1 mutant is indeed
 411 the change in the expression of stage-specific proteins (Table S4). The expression of several
 412 bradyzoite-specific proteins including GRAs and proteins of the SRS family, was strongly increased. At
 413 the same time, some tachyzoite-specific SRS and GRA proteins were found to be less expressed. This
 414 was supporting the idea that intracellularly developing parasites lacking TgISU1 may convert into
 415 bona fide cyst-contained bradyzoites, as suggested by our initial morphological observations (Figure
 416 5C). To verify this experimentally, we used a lectin from the plant *Dolichos biflorus* (DBL), which
 417 recognizes the SRS44/CST1 glycoprotein that is exported to the nascent wall of differentiating cysts
 418 [68]. We could see that during continuous growth of cKD TgISU1-HA parasites in the presence of ATc,
 419 there was an increasing number of DBL-positive structures (Figure 9A). This was quantified during the
 420 first 48 hours of intracellular development (Figure 9B) and, interestingly, was shown to mimic the
 421 differentiation induced by nitric oxide, a known factor of stage conversion [72], and a potent
 422 damaging agent of Fe-S clusters [73]. We combined RNAseq expression data for tachyzoite and
 423 bradyzoite stages [65] to establish a hierarchical clustering of the SRS proteins detected in our
 424 quantitative proteomics experiments for the two mutants (Figure 9C). This clearly confirmed a strong
 425 increase in the expression of bradyzoite-specific SRS in the TgISU1 mutant. As mentioned earlier,
 426 some were also upregulated in the TgNFS2 mutant but in much lesser proportions. The strongest
 427 increase in bradyzoite-specific SRS expression upon TgNFS2 depletion was for SRS44/CST1, which
 428 happens to be the protein DBL preferentially binds to [68]. However, contrarily to the TgISU1 mutant,
 429 labelling experiments did not indicate any detectable increase in DBL recruitment in the TgNFS2
 430 mutant (Figure 9B), confirming that impairing the plastidic Fe-S center synthesis pathway does not
 431 trigger full stage conversion.

432 Stage conversion is a progressive process that happens over the course of several days, as it involves
 433 the expression of distinct transcriptomes and proteomes [53]. Markers for specific steps of in vitro
 434 cyst formation had been previously described [74], so we have used several of these to check the
 435 kinetics of stage conversion in the TgISU1-depleted parasites. We kept the cKD TgISU1-HA parasites
 436 for up to 14 days in the presence of ATc and tested for the presence of SAG1 (tachyzoite maker), DBL
 437 (early bradyzoite marker), P18/SAG4 (intermediate bradyzoite marker) and P21 (late bradyzoite
 438 marker) (Figure 9D). After 7 days of ATc treatment, the DBL-positive cyst contained parasites that
 439 were still expressing SAG1 and not yet SAG4, whereas after 14 days parasites with SAG4 labelling
 440 were found, but there was still a residual SAG1 expression; expression of late marker P21 was,
 441 however, never detected. This suggests stage conversion of these parasites progresses beyond the
 442 appearance of early cyst wall markers, but not only it does so with slow kinetics, but it seems
 443 incomplete. In fact, observation of DBL-positive cysts showed a marked decrease in their mean size
 444 between the 7 and 14 days timepoints (Figure 9D). This suggests incomplete conversion may be
 445 leading to subsequent reactivation/reinvasion events. The smaller cyst size may also suggest a lack of
 446 fitness in the long term for TgISU1-depleted parasites.

447

448 Lack of lethality and initiation of stage conversion are features shared by other mitochondrial
 449 mutants

450 As impairment of the mitochondrial ETC and stage conversion are the two main features observed
 451 for the TgISU1 mutant, it raised the possibility the former may be involved in triggering the latter. We
 452 thus sought to evaluate in more details viability and differentiation of other mitochondrial mutants.
 453 We used the ATc-regulatable cKD cell line for TgQCR11 [62], a complex III subunit found less

abundant in absence of TgISU1 (Figure 8A), and which was found by others to be essential for mitochondrial respiration and parasite growth [61,62]. We also included in our study an ATc-regulatable cKD cell line for TgmS35, a mitoribosomal protein whose depletion impacts organelle morphology and function (including mitochondrial respiration), and overall parasite fitness [75].

Like for TgISU1 (Figure 4E), we assessed whether or not the fitness phenotype of these mutants was reversible by performing plaque assays in the presence of ATc for 7 days, and then monitored plaque formation for another 7 days upon drug removal (Figure 10A). The TgQCR11 mutant behaved very similarly to the TgISU1 mutant, with virtually no plaques formed when incubated with ATc, while it was able to reactivate the lytic cycle upon ATc washout. The TgmS35 mutant seemed less affected by protein depletion: not only it generated small plaques after 7 days in the presence of ATc, but whether or not the drug was washed out, prolonged incubation led to large lysis plaques in the host cells. Overall, this experiment showed that mitochondrial mutants, whether they are affected in a metabolic or more structural function, remain essentially viable. The similarity between the TgISU1 and the TgQCR11 mutant suggested the latter may be switching to a slow-growing but still viable bradyzoite stage. The slowed-down, but less hampered progression through the lytic cycle of the TgmS35 mutant suggested it might retain more tachyzoite-like growth kinetics.

To investigate the ability of these mutants to form cysts, we performed IFAs with specific bradyzoite markers, like we did previously for the cKD TgISU1-HA cell line (Figure 9A, B). We first looked for the recruitment of DBL to parasite-containing vacuoles during the first 48 hours of protein depletion, (Figure 10B, C). As a control, we also treated TATi Δ Ku80 parasites with atovaquone, an inhibitor of the mitochondrial ETC that was previously shown to trigger stage conversion [76]. Interestingly, like the atovaquone-treated TATi Δ Ku80 parasites and the TgISU1 mutant (Figure 9A and B), treatment of both TgQCR11 and TgmS35 mutants with ATc seemed to trigger stage conversion, as illustrated by an increase in DBL staining of vacuoles over time (Figure 10B and C). When then tried to evaluate conversion over a longer period by keeping the parasites for up to 14 days in the presence of ATc (Figure 10D). For the TgmS35 mutant, this was achieved by using very low doses of parasite inoculum, which allowed preserving some host cells in spite of the extensive lysis caused by the parasites. Like for the TgISU1 mutant, even long term parasite did not allow complete disappearance of the SAG1 tachyzoite marker in the TgQCR11 and TgmS35 mutants, and staining of the late bradyzoites marker P21 was not observed. However, while a few DBL-labelled cysts remained in the TgmS35 culture after 14 days of ATc treatment, they very rarely showed staining with the intermediate bradyzoite marker P18/SAG4. On the contrary, substantial staining was observed upon long term depletion of TgQCR11, like we observed for the TgISU1 mutant.

In conclusion, our findings suggest that interfering with general function like mitochondrial translation, or targeting more specifically the mitochondrial ETC, does not irreversibly impair parasite viability and instead leads to an initiation of stage conversion into bradyzoites, although it may not necessarily be complete.

Discussion

Because of their origin and metabolic importance, the two apicomplexan endosymbiotic organelles have gathered considerable interest as potential drug targets [77,78]. It may be obvious, as for example the plastid hosts several metabolic pathways which are not present in the mammalian hosts of these parasites. Yet, even for conserved housekeeping functions or, in the case of the mitochondrion early phylogenetic divergence, there may still be enough molecular differences to allow selective chemical inhibition. In fact, several drugs used for prophylactic or curative treatments

against Apicomplexa-caused diseases are already targeting these organelles [79]. They are essentially impacting the organellar protein synthesis by acting on the translation machinery [80], although the mitochondrial ETC inhibitor atovaquone is also used to treat malaria and toxoplasmosis [81]. One main difference when targeting *Plasmodium* and *Toxoplasma* by drugs is that the latter easily converts into the encysted bradyzoite resistance form. It has been known for some time that treatment of tachyzoites with mitochondrial inhibitors triggers stage conversion [72,76,82]. This may be efficient to counteract the acute phase of toxoplasmosis, but at the same time may favour persistence of the parasites in the host.

Here we characterized Fe-S synthesis pathways which are very similar biochemically, but are located into two distinct endosymbiotic organelles, and whose inactivation has drastically different consequences for parasite fitness. Fe-S clusters are ancient, ubiquitous and fundamental to many cellular functions, but their synthesis by distinct biosynthetic pathways was inherited by plastids or by the mitochondrion through distinct bacterial ancestors, and have thus specialized into adding these cofactors to different client proteins [22]. A key function of Fe-S clusters, owing to their mid-range redox potential, is electron transfer and redox reactions, mainly as components the respiratory and photosynthetic ETCs. They also have important functions in stabilizing proteins, redox sensing, or catalysis through SAM enzymes. Several of these are not retained in Apicomplexa, whose plastid has lost its photosynthetic ability for example. Nevertheless, our prediction of the *T. gondii* Fe-S proteins repertoire suggests many key functions associated with the apicoplast or the mitochondrion are likely to be affected by a perturbation of Fe-S assembly (Table S2).

For the apicoplast, these include lipoic acid or isoprenoid synthesis. Inactivation of the apicoplast-located TgNFS2 had a late but marked effect on the organelle itself, as it led ultimately to a partial loss of the apicoplast, which is consistent with the phenotype observed when disrupting the SUF pathway in *Plasmodium* [26]. IspG and IspH, which are key Fe-S-dependent enzymes of the non-mevalonate isoprenoid synthesis pathway [59], were only found marginally less expressed in our quantitative analysis after TgNFS2 depletion. However, our proteomics dataset provided indirect clues that their function may be impacted. Isoprenoid synthesis is vital for *T. gondii* tachyzoites [33], and it has implication beyond the apicoplast, as prenylated proteins or isoprenoid precursors are involved in more general cellular processes including intracellular trafficking or mitochondrial respiration [83]. Isoprenoids are for instance important for synthesizing ubiquinone/coenzyme Q, and the single predicted mitochondrial candidate that was significantly less expressed upon TgNFS2 depletion is a putative UbiE/COQ5 methyltransferase, involved in synthesis of this co-factor [84]. Isoprenoids are also important for dolichol-derived protein glycosylation and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis, and interestingly the three putative rhoptry-localized candidates significantly less expressed in the TgNFS2 mutant (Table S3) are predicted to be GPI-anchored and/or glycosylated. Overall, this might be an indication that TgNFS2 depletion impacts isoprenoid synthesis in the apicoplast, which in turn would impact other metabolic pathways.

Impairing isoprenoid synthesis does not, however, necessarily lead to a loss of the organelle [26]. There may thus be another explanation for this phenotype. Interestingly, we could show that perturbing the SUF pathway, which is supposedly important for Fe-S-containing enzyme LipA, impacts the lipoylation of the E2 subunit of the apicoplast-located PDH (Figure 7A). The PDH complex catalyzes the production of acetyl-CoA, which is the first step of the FASII system, and perturbation of either the PDH or other steps of the FASII system leads to a loss of the organelle and severely impairs fitness of the parasites [33,85]. Interestingly, long term depletion of TgISU1 leads to cell division problems, and affects membrane compartments such as the IMC (Figure 7B), which are defects previously observed in parasites where the FASII system has been genetically- or chemically-

disrupted [86–88]. Our quantitative proteomic analysis shows potential compensatory mechanisms may be used by the parasites in response this early perturbation of the apicoplast lipid metabolism that precedes organelle loss. Tachyzoites are indeed known to be able to use exogenous lipid sources to adapt metabolically [85,87] and, interestingly, upon depletion of TgNFS2 we observed a pattern of overexpression for ER-located enzymes involved in the synthesis of several phospholipids and ceramides (Figure 6A and D, Table S3). These lipids are usually synthesized in the ER from apicoplast-generated precursors, as both organelles cooperate for FA and phospholipid (PL) synthesis [89]. Yet, the ER-localized PL-synthesis machinery can also use FA scavenged from the host [90]. The increased expression of ER-localized lipid-related enzymes may thus reflect an increased synthesis, potentially from exogenous lipid precursors, in compensation for a defect in the apicoplast-localized machinery. In spite of this potential compensation mechanism, it seems the alteration of the SUF pathway in *T. gondii* has such a profound impact that it ultimately leads to the irreversible demise of the parasites (Figure 4E). It would be interesting to use recently described approaches like stable isotope labelling of lipid precursors combined to lipidomic analysis [87], to investigate in the SUF pathway mutant the potential changes in de novo synthesis of FA or in lipid scavenging from the host.

In the mitochondrion, important pathways potentially involving Fe-S proteins include the respiratory ETC, the TCA cycle, as well as molybdenum and heme synthesis (Table S2). Accordingly, perhaps the most obvious consequence of disrupting the ISC pathway was the profound impact on the mitochondrial respiratory capacity, as evidenced experimentally by measuring the mitochondrial membrane potential (Figure 8D), and supported by quantitative analyses showing a clear drop in expression of many respiratory complex proteins (Figure 8A, B, and C, Table S4). This is also in line with the recent description of another mitochondrial Fe-S cluster synthesis mutant that showed a marked alteration of its respiratory capacity [25]. Although the mitochondrion, through the TCA cycle and the respiratory chain/oxidative phosphorylation, contributes to energy production in tachyzoites [91], the glycolytic flux is also believed to be a major source of carbon and energy for these parasites [92]. Thus, rather coherently, as highlighted by our quantitative proteomic analysis, disruption of the ISC pathway led to a potential overexpression of glycolytic enzymes concurrently with the lower expression of mitochondrial ETC components (Figure 6B, Table S4). The possible overexpression of enzymes of the pentose phosphate pathway, which is branching off from glycolysis and is providing redox equivalents and precursors for nucleotide and amino acid biosynthesis, is also potentially indicative of a higher use of glucose in these conditions. The metabolic changes encountered by ISC-deficient parasites do not cause their rapid demise, as they are able to initiate conversion to the bradyzoite stage, which has been suggested to rely essentially on glycolysis for energy production [93]. Our analysis of the viability of other mitochondrial mutants confirmed results obtained by others showing that the organelle, and in particular the ETC, seem important for parasite fitness [61,62,75]. Yet, perhaps because of their metabolic flexibility, we have shown that mutant parasites seem to retain the ability to survive as tachyzoites, or initiate a switch to bradyzoites.

The inactivation of the ISC pathway likely has consequences on other important cellular housekeeping functions besides mitochondrial metabolism. In other eukaryotes, the ISC pathway provides a yet unknown precursor molecule as a sulfur provider for the cytosolic CIA Fe-S cluster assembly pathway [24]. The ISC pathway thus not only governs the proper assembly of mitochondrial Fe-S proteins, but also of cytoplasmic and nuclear ones. Our quantitative proteomics data suggests it is also the case in *T. gondii*, as several putative nuclear Fe-S proteins involved in gene transcription (such as DNA-dependent RNA polymerases) or DNA repair (like DNA endonuclease III) were found to be impacted by TgISU1 depletion. The CIA pathway has recently been shown to be important for tachyzoite proliferation [25], and several of the cytoplasmic or nuclear Fe-S cluster-containing proteins are likely essential for parasite viability. It is thus possible that, in spite of their conversion to

a stress-resistant form, the long-term viability of TgISU1 parasites could be affected beyond recovery. In vivo experiment in the mouse model may be used to assess this.

The transition from tachyzoite to bradyzoite is known to involve a considerable change in gene expression [64,65], and it takes several days of in vitro differentiation-inducing conditions to obtain mature cysts [94,95]. Quantitative proteomic analysis showed that TgISU1-depleted parasites rapidly display a high expression of bradyzoite-specific surface antigens and GRA markers (Table S4, Figure 9C). In all the mitochondrial mutants investigated in this study, long term perturbation of the organelle led to the appearance of parasite-containing structures with typical cyst-like morphology (Figure 5, Figure 9, Figure 10). However, using specific antibodies against early or late bradyzoite markers, the differentiating parasites never appeared to reach a fully mature bradyzoite stage (Figures 9 and 10). Also, contrarily to the ETC mutants (TgQCR11 and TgISU1), the mitochondrial translation mutant (TgmS35), while seemingly initiating conversion to bradyzoite, largely continued to thrive with almost tachyzoite growth dynamics (Figure 10A). However, as the mitochondrion encodes three proteins that are subunits of mitochondrial ETC complexes III (cytochrome b) and IV (CoxI and III), this mutant should also be supposedly impacted for ETC function. This apparent discrepancy might then be explained by a looser control of down-regulation of protein expression, or by compensatory mechanisms that may be specifically at play in this particular mutant. It is also possible that more directly targeting the ETC is a much stronger inducer of differentiation, and thus different mitochondrial mutants may behave differently regarding stage conversion. Importantly, one main reason potentially explaining the incomplete differentiation of these mitochondrial mutants is that they were generated in a type I *T. gondii* strain that typically does not form cysts: type I tachyzoites may upregulate specific bradyzoite genes and, according to some reports, produce bradyzoite-specific proteins or cyst wall components, but they are largely incapable of forming mature bradyzoite cysts [96]. This calls for further investigations, and in particular generating similar mitochondrion-related mutants in more cystogenic type II parasites, which could be very insightful.

Our quantitative proteomics analysis shows that SUF-impaired parasites also seem to initiate an upregulation of some bradyzoite markers early after TgNFS2 depletion. Yet, these parasites did not display the hallmarks of bradyzoite morphology. They did not progress towards stage conversion and instead they displayed considerable perturbation of the cell division process (Figure 7B), and eventually died. Both the apicoplast and the mitochondrion have established a close metabolic symbiosis with their host cell, so there are likely multiple mechanisms allowing these organelles to communicate their status to the rest of the cell. This raises the question as to why mitochondrion, but not apicoplast, dysfunction can lead to differentiation into bradyzoites. This may be due to differences in the kinetics or the severity of apicoplast-related phenotypes that may not allow stage conversion (which is typically a long process) to happen. Alternatively, there might be differentiation signals specifically associated to the mitochondrion. In fact this organelle is increasingly seen as a signalling platform, able to communicate its fitness through the release of specific metabolites, reactive oxygen species, or by modulating ATP levels [97]. Interestingly, it was shown in other eukaryotes that mitochondrial dysfunctions, such as altered oxidative phosphorylation, significantly impair cellular proliferation, oxygen sensing or specific histone acetylation, yet without diminishing cell viability and instead may lead to quiescent states [98–100]. Consequences of mitochondrial dysfunction include a restricted energy supply and thus constitutes a metabolic challenge that can trigger important cellular adaptations that ultimately determine eukaryotic cell fate and survival. Our results suggest that this is also possibly the case for *T. gondii*. It is for instance quite interesting to see that altering the respiratory activity of the organelle, whether it is by generating specific mutants or by the use of drugs such as atovaquone, seems to lead to a similar differentiation phenotype.

More generally, the environmental or metabolic cues that drive specific gene expression to induce a functional shift leading to conversion into bradyzoites are not fully identified. Moreover, how these stimuli are integrated is also largely unknown. A high-throughput approach has allowed the recent identification of a master transcriptional regulator of stage conversion [101], but how upstream events are converted into cellular signals to mobilize the master regulator is still an important, yet unresolved, question. Translational control [102] may play a role in regulating this factor in the context of the integrated stress response [103]. In fact, an essential part of the eukaryotic cell stress response occurs post-transcriptionally and is achieved by RNA-binding proteins [104]. Interestingly, among the proteins significantly less abundant in the spontaneously-differentiating TgISU1 mutant were many RNA-binding proteins. They include components of stress granules (PolyA-binding protein, PUF1, Alba1 and 2, some of which are linked to stage conversion [105–107]), which are potentially involved in mRNA sequestration from the translational machinery, but also two regulators of the large 60S ribosomal subunit assembly, as well as the gamma subunit of the eukaryotic translation initiation factor (eIF) complex 4 (known to be down-regulated in the bradyzoite stage [108]). Variation in these candidates may have a considerable impact on the translational profile and on the proteostasis of differentiating parasites, and how they may help regulating stage conversion in this context should be investigated further. Understanding the mechanisms that either lead to encystment or death of the parasites is crucial to the development of treatments against toxoplasmosis. This question is key to the pathology, because long term persistence of bradyzoites and their resistance to current treatments makes them a durable threat for their human hosts. Comparative studies of stress-induced or spontaneously differentiating conditional mutants may bring further insights on how the parasites integrate upstream stresses or dysfunctions into global regulation of stage conversion.

Materials and methods

Parasites and cells culture. Tachyzoites of the TATi ΔKu80 *T. gondii* strain [43], as well as derived transgenic parasites generated in this study, were maintained by serial passage in human foreskin fibroblast (HFF, American Type Culture Collection, CRL 1634) cell monolayer grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco), supplemented with 5% decompemented fetal bovine serum, 2-mM L-glutamine and a cocktail of penicillin-streptomycin at 100 µg/ml. The TgQCR11 [62] and TgmS35 [75] conditional mutants cell lines were generously provided by the Sheiner laboratory.

Bioinformatic analyses. Sequence alignments were performed using the MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) algorithm of the Geneious 6.1.8 software suite (<http://www.geneious.com>). Transit peptide and localization predictions were done using IPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/>), Localizer 1.0.4 (<http://localizer.csiro.au/>), and Deeploc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc-1.0/>) algorithms.

The putative Fe-S proteome was predicted using the MetalPredator webserver (<http://metalweb.cerm.unifi.it/tools/metalpredator/>) [55]. The whole complement of *T. gondii* annotated proteins was downloaded in FASTA format from the ToxoDB database (<https://toxodb.org> [36], release 45) and used for analysis in the MetalPredator webserver. Additional manual curation included homology searches for known Fe-S proteins from plants (see appendix A in [109]), and search for homologues in the Uniprot database (<https://www.uniprot.org>) that were annotated as containing a Fe-S cofactor. For proteomics candidates, annotations were inferred from ToxoDB, KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) and the Liverpool Library of Apicomplexan Metabolic Pathways (<http://www.llamp.net/> [110]).

683 N-glycosylation predictions were done with the GlycoEP webserver
684 (<http://crdd.osdd.net/raghava/glycoep/index.html>). GPI anchor predictions were done with the
685 PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/>) and GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) webserver.

686 Candidate variant proteins identified by quantitative proteomics were mapped on the graphic
687 representation of the high-resolution spatial proteome map of *T. gondii* using the hyperLOPIT dataset
688 [37] (<https://proteome.shinyapps.io/toxolopittzex/>).

689 Heterologous expression in *E. coli*. Constructs for designing recombinant proteins were defined by
690 aligning TgNFS2 and TgISU1 amino acid sequences with their *E. coli* counterparts. For TgNFS2, a 1,438
691 bp fragment corresponding to amino acids 271-699, was amplified by polymerase chain reaction
692 (PCR) from *T. gondii* cDNA using primers ML4201/ML4012 (sequences of the primers used in this
693 study are found in Table S6). For TgISU1, a 393 bp fragment corresponding to amino acids 64-194,
694 was amplified by PCR from *T. gondii* cDNA using primers ML4204/ML4205. The fragments were
695 cloned into the pUC19 (Thermo Fisher Scientific) using the HindIII/BamHI and SphI/BamHI restriction
696 sites, respectively. *E. coli* mutants from the Keio collection (obtained from the The Coli Genetic Stock
697 Center at the University of Yale: stain numbers JW1670-1 for SufS, JW2513-1 for IscU), were
698 transformed with plasmids for expressing recombinant TgNFS2 and TgISU1 and selected with
699 ampicillin. For growth assays [40], overnight stationary phase cultures were adjusted to the same
700 starting OD₆₀₀ of 0.6 in salt-supplemented M9 minimal media containing 0.4% glucose and varying
701 amounts of the 2,2[-Bipyridyl iron chelator (Sigma-Aldrich). Parental *E. coli* (strain K12) were
702 included as a control. Growth was monitored through OD₆₀₀ measurement after 7, 14 and 24 hours at
703 37°C in a shaking incubator.

704 Generation of HA-tagged TgNFS2, TgSUF2 and TgISU1 cell lines. The ligation independent strategy
705 [42] was used for C-terminal hemagglutinin (HA)₃-tagging of TgISU1. A fragment corresponding to the
706 3' end of TgISU1 was amplified by PCR from genomic DNA, with the Q5 DNA polymerase (New
707 England BioLabs) using primers ML4208/ML4209 and inserted in frame with the sequence coding for
708 a triple HA tag, present in the pLIC-HA₃-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) plasmid. The
709 resulting vector was linearized and 40 µg of DNA was transfected into the TATi ΔKu80 cell line to
710 allow integration by single homologous recombination, and transgenic parasites of the TgISU1-HA
711 cell line were selected with chloramphenicol and cloned by serial limiting dilution.

712 For TgNFS2 and TgSUF2, a CRISPR-based strategy was used. Using the pLIC-HA₃-CAT plasmid as a
713 template, a PCR was performed with the KOD DNA polymerase (Novagen) to amplify the tag and the
714 resistance gene expression cassette with primers ML3978/ML3979 (TgNFS2) and ML4023/ML4162
715 (TgSUF2), that also carry 30bp homology with the 3' end of the corresponding genes. A specific
716 single-guide RNA (sgRNA) was generated to introduce a double-stranded break at the 3' of the
717 respective loci. Primers used to generate the guides were ML3948/ML3949 (TgNFS2) and
718 ML4160/ML4161 (TgSUF2) and the protospacer sequences were introduced in the Cas9-expressing
719 pU6-Universal plasmid (Addgene, ref #52694) [38]. Again, the TATi ΔKu80 cell line was transfected
720 and transgenic parasites of the TgNFS2-HA or TgSUF2-HA cell lines were selected with
721 chloramphenicol and cloned by serial limiting dilution.

722 Generation of TgNFS2 and TgISU1 conditional knock-down and complemented cell lines. The
723 conditional knock-down cell for TgNFS2 and TgISU1 were generated based on the Tet-Off system
724 using the DHFR-TetO7Sag4 plasmid [111].

725 For TgISU1, a 930 bp 5' region of the gene, starting with the initiation codon, was amplified from
726 genomic DNA by PCR using Q5 polymerase (New England Biolabs) with primers ML4212/ML4213 and

cloned into the DHFR-TetO7Sag4 plasmid, downstream of the anhydrotetracycline (ATc)-inducible TetO7Sag4 promoter, yielding the DHFR-TetO7Sag4-TgISU1 plasmid. The plasmid was then linearized and transfected into the TgISU1-HA cell line. Transfected parasites were selected with pyrimethamine and cloned by serial limiting dilution. A similar approach was used to generate an independent cKD TgISU1 cell line, but starting from the TATi Δ Ku80 cell line instead of the TgISU1-HA cell line, to allow subsequent tagging of mitochondrial candidates.

For TgNFS2, a CRISPR-based strategy was used. Using the DHFR-TetO7Sag4 plasmid as a template, a PCR was performed with the KOD DNA polymerase (Novagen) to amplify the promoter and the resistance gene expression cassette with primers ML4154/ML4155 that also carry 30[bp homology with the 5' end of the TgNFS2 gene. A specific sgRNA was generated to introduce a double-stranded break at the 5' of the TgNFS2 locus. Primers used to generate the guide were ML4156/ML4157 and the protospacer sequences were introduced in the pU6-Universal plasmid (Addgene ref#52694) [38]. The TgNFS2-HA cell line was transfected with the donor sequence and the Cas9/guide RNA-expressing plasmid and transgenic parasites were selected with pyrimethamine and cloned by serial limiting dilution.

The cKD TgNFS2-HA and cKD TgISU1-HA cell lines were complemented by the addition of an extra copy of the respective genes put under the dependence of a tubulin promoter at the uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) locus. TgNFS2 (2097 bp) and TgISU1 (657 bp) whole cDNA sequences were amplified by reverse transcription (RT)-PCR with primers ML4576/ML4577 and ML4455/ML4456, respectively. They were then cloned downstream of the tubulin promoter sequence of the pUPRT-TUB-Ty vector [43] to yield the pUPRT-TgNFS2 and pUPRT-TgISU1 plasmids, respectively. These plasmids were then linearized prior to transfection of the respective mutant cell lines. The recombination efficiency was increased by co-transfecting with the Cas9-expressing pU6-UPRT plasmids generated by integrating UPRT-specific protospacer sequences (with primers ML2087/ML2088 for the 3', and primers ML3445/ML3446 for the 5') which were designed to allow a double-strand break at the UPRT locus. Transgenic parasites were selected using 5-fluorodeoxyuridine and cloned by serial limiting dilution to yield the cKD TgNFS2-HA comp cKD TgISU1-HA comp cell lines, respectively.

Generation of HA-tagged TgSDHB and TgApiCox13 cell lines. A CRISPR-based strategy was used. Using the pLIC-HA₃-CAT plasmid as a template, a PCR was performed with the KOD DNA polymerase (Novagen) to amplify the tag and the resistance gene expression cassette with primers ML5116/ML5117 (TgSDHB) and ML5114/ML5115 (TgApiCox13), that also carry 30[bp homology with the 3' end of the corresponding genes. A specific sgRNA was generated to introduce a double-stranded break at the 3' of the respective loci. Primers used to generate the guides were ML4986/ML4987 (TgSDHB) and ML4984/ML4985 (TgApiCox13) and the protospacer sequences were introduced in the Cas9-expressing pU6-Universal plasmid (Addgene, ref #52694) [38]. The cKD TgISU1 cell line was transfected and parasites were selected with chloramphenicol and cloned by serial limiting dilution.

Immunoblot analysis. Protein extracts from 10⁷ freshly egressed tachyzoites were prepared in Laemmli sample buffer, separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane using the BioRad Mini-Transblot system according to the manufacturer's instructions. Rat monoclonal antibody (clone 3F10, Roche) was used to detect HA-tagged proteins. Other primary antibodies used were rabbit anti-lipoic acid antibody (ab58724, Abcam), mouse anti-SAG1 [112], rabbit anti-CPN60 [113] and mouse anti-actin [114]. Protein quantification was performed by band densitometry using FIJI (<https://imagej.net/software/fiji/>).

Immunofluorescence microscopy. For immunofluorescence assays (IFA), intracellular tachyzoites grown on coverslips containing HFF monolayers, were either fixed for 20 min with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS and permeabilized for 10 min with 0.3% Triton X-100 in PBS or fixed for 5 min in cold methanol (for the use of cyst-specific antibodies). Slides/coverslips were subsequently blocked with 0.1% (w/v) BSA in PBS. Primary antibodies used (at 1/1,000, unless specified) to detect subcellular structures were rabbit anti-CPN60 [113], mouse monoclonal anti-F1-ATPase beta subunit (gift of P. Bradley), mouse monoclonal anti-GRA3 [115], rabbit anti-TgHSP28 [116], rabbit anti-GAP45 [117], mouse monoclonal anti-SAG1 [112], anti SAG4/P18 (diluted 1/200, T8 3B1) and anti P21 (diluted 1/200, T8 4G10) [118]. Rat monoclonal anti-HA antibody (clone 3F10, Roche) was used to detect epitope-tagged proteins. Staining of DNA was performed on fixed cells by incubating them for 5 min in a 1 µg/ml 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution. All images were acquired at the Montpellier RIO imaging facility from a Zeiss AXIO Imager Z1 epifluorescence microscope driven by the ZEN software v2.3 (Zeiss). Z-stack acquisition and maximal intensity projection was performed to visualize larger structures such as in vitro cysts. Adjustments for brightness and contrast were applied uniformly on the entire image.

Plaque assay. Confluent monolayers of HFFs were infected with freshly egressed parasites, which were left to grow for 7 days in the absence or presence of ATc (added to a final concentration of 1 µg/ml). They were then fixed with 4% v/v PFA and plaques were revealed by staining with a 0.1% crystal violet solution (V5265, Sigma-Aldrich). For the washout experiments, after 7 days the culture medium was removed from the wells and one gentle wash was performed with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), taking care not to disturb the cells; then new DMEM medium containing or not ATc was added for another 7-day incubation, before termination of the experiment by PFA fixation and crystal violet staining.

Egress assay. *T. gondii* tachyzoites were grown for 40 (without ATc) or 120 (with ATc) hours on HFF cells with coverslips in 24-well plates. The infected host cells were incubated for 7 min at 37°C with DMEM containing 3 µM of calcium ionophore A23187 (C7522, Sigma-Aldrich) prior to fixation with 4% PFA. Immunofluorescence assays were performed as previously described [119]: the parasites and the parasitophorous vacuole membrane were labelled with anti-GAP45 and anti-GRA3, respectively. The proportion of egressed and non-egressed vacuoles was calculated by counting 250 vacuoles in three independent experiments. Data are presented as mean values ± SEM.

Semi-quantitative RT-PCR. Total mRNAs of freshly egressed extracellular parasites from the cKD TgNFS2-HA, cKD TgISU1-HA and their respective complemented cell lines, as well as cKD TgISU1 (incubated with or without ATc at 1.5 µg/mL for 3 days) were extracted using Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel). The cDNAs were synthesized with 450 ng of total RNA per RT-PCR reaction using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Specific primers for TgNFS2 (ML4686/ML4687), TgISU1 (ML4684/ML4685) and, as a control, Tubulin β (ML841/ML842) or actin (ML843/ML844) were used to amplify specific transcripts with the GoTaq DNA polymerase (Promega). PCR was performed with 21 cycles of denaturation (30 s, 95 °C), annealing (20 s, 55 °C), and elongation (30 s, 72 °C).

Mitochondrial membrane potential measurement. Parasites grown for the indicated time with or without ATc were mechanically released from their host cells, purified on a glass wool fiber column, washed and adjusted to 10⁷ parasites/ml in phenol red-free medium, and incubated in with 1.5 µM of the JC-1 dye (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine Iodide, T3168, Invitrogen) for 30 min at 37°C, washed phenol red-free medium and analyzed by flow cytometry or microscopy. Flow cytometry analysis was performed on a FACSAria III flow cytometer (Becton

Dickinson). An unstained control was used to define gates for analysis. 50,000 events per condition were collected and data were analysed using the FlowJo Software.

Quantitative label-free mass spectrometry. Parasites of the TATi Δ Ku80 and cKD TgISU1-HA cell lines were grown for two days in the presence of ATc; parasites of the cKD TgNFS2-HA were grown for three days in the presence of ATc. Then they were mechanically released from their host cells, purified on a glass wool fiber column, washed in Hanks' Balanced Salt Solution (Gibco). Samples were first normalized on parasite counts, but further adjustment was performed after parasite pellet resuspension in SDS lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA pH8, 1% SDS) and protein quantification with a bicinchoninic acid assay kit (Abcam). For each condition, 20 μ g of total proteins were separated on a 12% SDS-PAGE run for 20 min at 100 V, stained with colloidal blue (Thermo Fisher Scientific), and each lane was cut in three identical fractions. Trypsin digestion and mass spectrometry analysis in the Q Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) were carried out as described previously [120].

For peptide identification and quantification, the raw files were analyzed with MaxQuant version 1.6.10.43 using default settings. The minimal peptide length was set to 6. Carbamidomethylation of cysteine was selected as a fixed modification and oxidation of methionine, N-terminal-pyroglutamylation of glutamine and glutamate and acetylation (protein N terminus) as variable modifications. Up to two missed cleavages were allowed. The files were searched against the *T. gondii* proteome (March 2020 -<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000005641-8450> entries). Identified proteins were filtered according to the following criteria: at least two different trypsin peptides with at least one unique peptide, an E value below 0.01 and a protein E value smaller than 0.01 were required. Using the above criteria, the rate of false peptide sequence assignment and false protein identification were lower than 1%. Peptide ion intensity values derived from MaxQuant were subjected for label-free quantitation. Unique and razor peptides were considered [121]. Statistical analyses were carried out using R package software. ANOVA test with threshold of 0.05 was applied to identify the significant differences in the protein abundance. Hits were retained if they were quantified in at least three of the four replicates in at least one experiment. Additional candidates that consistently showed absence or presence of LFQ values versus the control, and mean LFQ was only considered if peptides were detected in at least three out of the four biological replicates.

Statistical analysis for phenotypic assays. Unless specified, values are usually expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). Data were analysed for comparison using unpaired Student's t-test with equal variance (homoscedastic) for different samples or paired Student's t-test for similar samples before and after treatment. For comparisons with of ratios of groups of samples with a reference set to 1, analysis of variance (ANOVA) was used.

Data availability. All raw MS data and MaxQuant files generated have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive>) with the dataset identifier PXD023854.

Acknowledgements

We are grateful to L. Sheiner, P. Bradley, B. Striepen, V. Carruthers, S. Lourido, S. Angel and D. Soldati-Favre for providing cell lines, antibodies and plasmids. We thank the developers and the managers of the VeupathDB.org/ToxoDB.org databases, as well as scientists who contributed datasets. We also thank the MRI imaging facility for providing access to their microscopes and flow cytometers, and the Mass Spectrometry Proteomics Platform (MSPP) of the BPMP laboratory. Thanks

to F. Vignols for insights into the biochemistry of Fe-S proteins. This project was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM EQ20170336725), the Labex Parafrap (ANR-11-LABX-0024) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE15-0023).

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Zimorski V, Ku C, Martin WF, Gould SB. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology*. 2014;22: 38–48. doi:10.1016/j.mib.2014.09.008
2. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. 2018;20: 745–754. doi:10.1038/s41556-018-0124-1
3. Rolland N, Bouchnak I, Moyet L, Salvi D, Kuntz M. The main functions of plastids. In: Maréchal E, editor. *Plastids*. New York, NY: Springer US; 2018. pp. 73–85. doi:10.1007/978-1-4939-8654-5_5
4. Inaba T, Ito-Inaba Y. Versatile roles of plastids in plant growth and development. *Plant and Cell Physiology*. 2010;51: 1847–1853. doi:10.1093/pcp/pcq147
5. McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N. Plastid in human parasites. *Nature*. 1996;381: 482–482. doi:10.1038/381482a0
6. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*. 1997;390: 407–409. doi:10.1038/37132
7. Keeling PJ. The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annu Rev Plant Biol*. 2013;64: 583–607. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120144
8. Gould SB, Maier U-G, Martin WF. Protein import and the origin of red complex plastids. *Current Biology*. 2015;25: R515–R521. doi:10.1016/j.cub.2015.04.033
9. van Dooren GG, Striepen B. The algal past and parasite present of the apicoplast. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67: 271–289. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155741
10. Sheiner L, Vaidya AB, McFadden GI. The metabolic roles of the endosymbiotic organelles of *Toxoplasma* and *Plasmodium* spp. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16: 452–458. doi:10.1016/j.mib.2013.07.003
11. van Dooren GG, Hapuarachchi SV. The dark side of the chloroplast: biogenesis, metabolism and membrane biology of the apicoplast. *Advances in Botanical Research*. Elsevier; 2017. pp. 145–185. doi:10.1016/bs.abr.2017.06.007
12. de Souza W, Attias M, Rodrigues JCF. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009;41: 2069–2080. doi:10.1016/j.biocel.2009.04.007

- 899 13. Ovcariakova J, Lemgruber L, Stilger KL, Sullivan WJ, Sheiner L. Mitochondrial behaviour
900 throughout the lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Sci Rep*. 2017;7: 42746.
901 doi:10.1038/srep42746
- 902 14. Seeber F, Limenitakis J, Soldati-Favre D. Apicomplexan mitochondrial metabolism: a story of
903 gains, losses and retentions. *Trends in Parasitology*. 2008;24: 468–478.
904 doi:10.1016/j.pt.2008.07.004
- 905 15. Kobayashi T, Sato S, Takamiya S, Komaki-Yasuda K, Yano K, Hirata A, et al. Mitochondria and
906 apicoplast of *Plasmodium falciparum*: Behaviour on subcellular fractionation and the
907 implication. *Mitochondrion*. 2007;7: 125–132. doi:10.1016/j.mito.2006.11.021
- 908 16. Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma*
909 *gondii*. *J Cell Sci*. 2008;121: 1559–1568. doi:10.1242/jcs.021089
- 910 17. Lill R. Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature*. 2009;460: 831–838.
911 doi:10.1038/nature08301
- 912 18. Roche B, Aussel L, Ezraty B, Mandin P, Py B, Barras F. Iron/sulfur proteins biogenesis in
913 prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -*
914 *Bioenergetics*. 2013;1827: 455–469. doi:10.1016/j.bbabo.2012.12.010
- 915 19. Zheng L, Cash VL, Flint DH, Dean DR. Assembly of Iron-Sulfur Clusters: identification of an
916 iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem*. 1998;273: 13264–
917 13272. doi:10.1074/jbc.273.21.13264
- 918 20. Takahashi Y, Tokumoto U. A third bacterial system for the assembly of Iron-Sulfur clusters
919 with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem*. 2002;277: 28380–28383.
920 doi:10.1074/jbc.C200365200
- 921 21. Boyd ES, Thomas KM, Dai Y, Boyd JM, Outten FW. Interplay between Oxygen and Fe–S cluster
922 biogenesis: insights from the Suf pathway. *Biochemistry*. 2014;53: 5834–5847.
923 doi:10.1021/bi500488r
- 924 22. Tsaousis AD. On the origin of Iron/Sulfur cluster biosynthesis in eukaryotes. *Front Microbiol*.
925 2019;10: 2478. doi:10.3389/fmicb.2019.02478
- 926 23. Couturier J, Touraine B, Briat J-F, Gaymard F, Rouhier N. The iron-sulfur cluster assembly
927 machineries in plants: current knowledge and open questions. *Front Plant Sci*. 2013;4.
928 doi:10.3389/fpls.2013.00259
- 929 24. Lill R, Srinivasan V, Mühlenhoff U. The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron–sulfur
930 protein biogenesis and in cellular iron regulation. *Current Opinion in Microbiology*. 2014;22:
931 111–119. doi:10.1016/j.mib.2014.09.015
- 932 25. Aw YTV, Seidi A, Hayward JA, Lee J, Victor Makota F, Rug M, et al. A key cytosolic iron-sulfur
933 cluster synthesis protein localises to the mitochondrion of *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*.
934 2020; mmi.14651. doi:10.1111/mmi.14651
- 935 26. Gisselberg JE, Dellibovi-Ragheb TA, Matthews KA, Bosch G, Prigge ST. The Suf iron-sulfur
936 cluster synthesis pathway is required for apicoplast maintenance in malaria parasites. Seeber
937 F, editor. *PLoS Pathog*. 2013;9: e1003655. doi:10.1371/journal.ppat.1003655

- 938 27. Haussig JM, Matuschewski K, Kooij TWA. Identification of vital and dispensable sulfur
939 utilization factors in the Plasmodium apicoplast. Waller RF, editor. PLoS ONE. 2014;9: e89718.
940 doi:10.1371/journal.pone.0089718
- 941 28. Kumar B, Chaubey S, Shah P, Tanveer A, Charan M, Siddiqi MI, et al. Interaction between
942 sulphur mobilisation proteins SufB and SufC: Evidence for an iron-sulphur cluster biogenesis
943 pathway in the apicoplast of Plasmodium falciparum. International Journal for Parasitology.
944 2011;41: 991–999. doi:10.1016/j.ijpara.2011.05.006
- 945 29. Charan M, Singh N, Kumar B, Srivastava K, Siddiqi MI, Habib S. Sulfur mobilization for Fe-S
946 cluster assembly by the essential SUF pathway in the Plasmodium falciparum apicoplast and
947 its Inhibition. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58: 3389–3398. doi:10.1128/AAC.02711-13
- 948 30. Charan M, Choudhary HH, Singh N, Sadik M, Siddiqi MI, Mishra S, et al. [Fe-S] cluster assembly
949 in the apicoplast and its indispensability in mosquito stages of the malaria parasite. FEBS J.
950 2017;284: 2629–2648. doi:10.1111/febs.14159
- 951 31. Pala ZR, Saxena V, Saggu GS, Garg S. Recent advances in the [Fe-S] cluster biogenesis (SUF)
952 pathway functional in the apicoplast of Plasmodium. Trends in Parasitology. 2018;34: 800–
953 809. doi:10.1016/j.pt.2018.05.010
- 954 32. Mazumdar J, H Wilson E, Masek K, A Hunter C, Striepen B. Apicoplast fatty acid synthesis is
955 essential for organelle biogenesis and parasite survival in Toxoplasma gondii. Proc Natl Acad
956 Sci USA. 2006;103: 13192–13197. doi:10.1073/pnas.0603391103
- 957 33. Nair SC, Brooks CF, Goodman CD, Sturm A, Strurm A, McFadden GI, et al. Apicoplast
958 isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in
959 Toxoplasma gondii. J Exp Med. 2011;208: 1547–1559. doi:10.1084/jem.20110039
- 960 34. Bergmann A, Floyd K, Key M, Dameron C, Rees KC, Thornton LB, et al. Toxoplasma gondii
961 requires its plant-like heme biosynthesis pathway for infection. PLoS Pathog. 2020;16:
962 e1008499. doi:10.1371/journal.ppat.1008499
- 963 35. Tjhin ET, Hayward JA, McFadden GI, van Dooren GG. Characterization of the apicoplast-
964 localized enzyme TgUroD in Toxoplasma gondii reveals a key role of the apicoplast in heme
965 biosynthesis. J Biol Chem. 2020;295: 1539–1550. doi:10.1074/jbc.RA119.011605
- 966 36. Harb OS, Roos DS. ToxoDB: functional genomics resource for Toxoplasma and related
967 organisms. Methods Mol Biol. 2020;2071: 27–47. doi:10.1007/978-1-4939-9857-9_2
- 968 37. Barylyuk K, Koreny L, Ke H, Butterworth S, Crook OM, Lassadi I, et al. A comprehensive
969 subcellular atlas of the Toxoplasma proteome via hyperLOPIT provides spatial context for
970 protein functions. Cell Host & Microbe. 2020; S193131282030514X.
971 doi:10.1016/j.chom.2020.09.011
- 972 38. Sidik SM, Huet D, Ganesan SM, Huynh M-H, Wang T, Nasamu AS, et al. A Genome-wide CRISPR
973 Screen in Toxoplasma Identifies Essential Apicomplexan Genes. Cell. 2016;166: 1423-
974 1435.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.08.019
- 975 39. Braymer JJ, Freibert SA, Rakwalska-Bange M, Lill R. Mechanistic concepts of iron-sulfur protein
976 biogenesis in Biology. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.
977 2021;1868: 118863. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118863

- 978 40. Outten FW, Djaman O, Storz G. A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during
979 iron starvation in *Escherichia coli*: suf operon role during iron starvation. *Molecular*
980 *Microbiology*. 2004;52: 861–872. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04025.x
- 981 41. Fox BA, Ristuccia JG, Gigley JP, Bzik DJ. Efficient gene replacements in *Toxoplasma gondii*
982 strains deficient for nonhomologous end joining. *Eukaryotic Cell*. 2009;8: 520–529.
983 doi:10.1128/EC.00357-08
- 984 42. Huynh M-H, Carruthers VB. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain
985 lacking Ku80. *Eukaryot Cell*. 2009;8: 530–539. doi:10.1128/EC.00358-08
- 986 43. Sheiner L, Demerly JL, Poulsen N, Beatty WL, Lucas O, Behnke MS, et al. A Systematic Screen
987 to Discover and Analyze Apicoplast Proteins Identifies a Conserved and Essential Protein
988 Import Factor. *PLoS Pathog*. 2011;7. doi:10.1371/journal.ppat.1002392
- 989 44. Pino P, Foth BJ, Kwok L-Y, Sheiner L, Schepers R, Soldati T, et al. Dual targeting of antioxidant
990 and metabolic enzymes to the mitochondrion and the apicoplast of *Toxoplasma gondii*. *PLoS*
991 *Pathog*. 2007;3: e115. doi:10.1371/journal.ppat.0030115
- 992 45. Ollagnier-de-Choudens S, Lascoux D, Loiseau L, Barras F, Forest E, Fontecave M. Mechanistic
993 studies of the SufS-SufE cysteine desulfurase: evidence for sulfur transfer from SufS to SufE.
994 *FEBS Lett*. 2003;555: 263–267. doi:10.1016/s0014-5793(03)01244-4
- 995 46. Narayana Murthy, UM, Ollagnier-de-Choudens S, Sanakis Y, Abdel-Ghany SE, Rousset C, Ye H,
996 et al. Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3: functions in chloroplast iron-
997 sulfur cluster assembly and NAD synthesis. *J Biol Chem*. 2007;282: 18254–18264.
998 doi:10.1074/jbc.M701428200
- 999 47. Meissner M, Brecht S, Bujard H, Soldati D. Modulation of myosin A expression by a newly
1000 established tetracycline repressor-based inducible system in *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids*
1001 *Res*. 2001;29: E115.
- 1002 48. Jelenska J, Crawford MJ, Harb OS, Zuther E, Haselkorn R, Roos DS, et al. Subcellular localization
1003 of acetyl-CoA carboxylase in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the*
1004 *National Academy of Sciences*. 2001;98: 2723–2728. doi:10.1073/pnas.051629998
- 1005 49. Pfefferkorn ER, Nothnagel RF, Borotz SE. Parasitocidal effect of clindamycin on *Toxoplasma*
1006 *gondii* grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant. *Antimicrob Agents*
1007 *Chemother*. 1992;36: 1091–1096.
- 1008 50. He CY, Shaw MK, Pletcher CH, Striepen B, Tilney LG, Roos DS. A plastid segregation defect in
1009 the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J*. 2001;20: 330–339.
1010 doi:10.1093/emboj/20.3.330
- 1011 51. Blader IJ, Coleman BI, Chen C-T, Gubbels M-J. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later.
1012 *Annu Rev Microbiol*. 2015;69: 463–485. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104100
- 1013 52. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and
1014 sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11: 267–
1015 299.

- 1016 53. Cerutti A, Blanchard N, Besteiro S. The bradyzoite: a key developmental stage for the
1017 persistence and pathogenesis of toxoplasmosis. *Pathogens*. 2020;9.
1018 doi:10.3390/pathogens9030234
- 1019 54. Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage.
1020 *Nature*. 1992;359: 82–85. doi:10.1038/359082a0
- 1021 55. Valasatava Y, Rosato A, Banci L, Andreini C. MetalPredator: a web server to predict iron-sulfur
1022 cluster binding proteomes. *Bioinformatics*. 2016;32: 2850–2852.
1023 doi:10.1093/bioinformatics/btw238
- 1024 56. Fuss JO, Tsai C-L, Ishida JP, Tainer JA. Emerging critical roles of Fe–S clusters in DNA replication
1025 and repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2015;1853: 1253–
1026 1271. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.018
- 1027 57. Thomsen-Zieger N, Schachtner J, Seeber F. Apicomplexan parasites contain a single lipoic acid
1028 synthase located in the plastid. *FEBS Lett*. 2003;547: 80–86. doi:10.1016/s0014-
1029 5793(03)00673-2
- 1030 58. Pierrel F, Douki T, Fontecave M, Atta M. MiaB protein is a bifunctional radical-S-
1031 adenosylmethionine enzyme involved in thiolation and methylation of tRNA. *J Biol Chem*.
1032 2004;279: 47555–47563. doi:10.1074/jbc.M408562200
- 1033 59. Imlay L, Odom AR. Isoprenoid metabolism in apicomplexan parasites. *Curr Clin Microbiol Rep*.
1034 2014;1: 37–50. doi:10.1007/s40588-014-0006-7
- 1035 60. Seidi A, Muellner-Wong LS, Rajendran E, Tjhin ET, Dagley LF, Aw VY, et al. Elucidating the
1036 mitochondrial proteome of *Toxoplasma gondii* reveals the presence of a divergent
1037 cytochrome c oxidase. *Elife*. 2018;7. doi:10.7554/eLife.38131
- 1038 61. Hayward JA, Rajendran E, Zwahlen SM, Faou P, van Dooren GG. Divergent features of the
1039 coenzyme Q:cytochrome c oxidoreductase complex in *Toxoplasma gondii* parasites. *PLoS*
1040 *Pathog*. 2021;17: e1009211. doi:10.1371/journal.ppat.1009211
- 1041 62. Maclean AE, Bridges HR, Silva MF, Ding S, Ovcariakova J, Hirst J, et al. Complexome profile of
1042 *Toxoplasma gondii* mitochondria identifies divergent subunits of respiratory chain complexes
1043 including new subunits of cytochrome bc1 complex. *PLoS Pathog*. 2021;17: e1009301.
1044 doi:10.1371/journal.ppat.1009301
- 1045 63. Lanz ND, Booker SJ. Auxiliary iron–sulfur cofactors in radical SAM enzymes. *Biochimica et*
1046 *Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2015;1853: 1316–1334.
1047 doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.002
- 1048 64. Pittman KJ, Aliota MT, Knoll LJ. Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii*
1049 during acute and chronic infection. *BMC Genomics*. 2014;15: 806. doi:10.1186/1471-2164-15-
1050 806
- 1051 65. Hehl AB, Basso WU, Lippuner C, Ramakrishnan C, Okoniewski M, Walker RA, et al. Asexual
1052 expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression
1053 of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes.
1054 *BMC Genomics*. 2015;16: 66. doi:10.1186/s12864-015-1225-x

- 1055 66. Jung C, Lee CY-F, Grigg ME. The SRS superfamily of Toxoplasma surface proteins. International
1056 Journal for Parasitology. 2004;34: 285–296. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.004
- 1057 67. Li L, Brunk BP, Kissinger JC, Pape D, Tang K, Cole RH, et al. Gene discovery in the apicomplexa
1058 as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. Genome Res.
1059 2003;13: 443–454. doi:10.1101/gr.693203
- 1060 68. Tomita T, Bzik DJ, Ma YF, Fox BA, Markillie LM, Taylor RC, et al. The Toxoplasma gondii cyst
1061 wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. PLoS
1062 Pathog. 2013;9: e1003823. doi:10.1371/journal.ppat.1003823
- 1063 69. Yang J, Zhang L, Diao H, Xia N, Zhou Y, Zhao J, et al. ANK1 and DnaK-TPR, two tetratricopeptide
1064 repeat-containing proteins primarily expressed in Toxoplasma bradyzoites, do not contribute
1065 to bradyzoite differentiation. Front Microbiol. 2017;8: 2210. doi:10.3389/fmicb.2017.02210
- 1066 70. Nadipuram SM, Thind AC, Rayatpisheh S, Wohlschlegel JA, Bradley PJ. Proximity biotinylation
1067 reveals novel secreted dense granule proteins of Toxoplasma gondii bradyzoites. PLoS One.
1068 2020;15: e0232552. doi:10.1371/journal.pone.0232552
- 1069 71. Huet D, Rajendran E, van Dooren GG, Lourido S. Identification of cryptic subunits from an
1070 apicomplexan ATP synthase. eLife. 2018;7: e38097. doi:10.7554/eLife.38097
- 1071 72. Bohne W, Heesemann J, Gross U. Reduced replication of Toxoplasma gondii is necessary for
1072 induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage
1073 conversion. Infect Immun. 1994;62: 1761–1767.
- 1074 73. Crack JC, Green J, Thomson AJ, Le Brun NE. Iron-sulfur clusters as biological sensors: the
1075 chemistry of reactions with molecular oxygen and nitric oxide. Acc Chem Res. 2014;47: 3196–
1076 3205. doi:10.1021/ar5002507
- 1077 74. Soete M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. Toxoplasma gondii: kinetics of bradyzoite-
1078 tachyzoite interconversion in vitro. Exp Parasitol. 1993;76: 259–264.
1079 doi:10.1006/expr.1993.1031
- 1080 75. Lacombe A, Maclean AE, Ovciarikova J, Tottey J, Mühleip A, Fernandes P, et al. Identification
1081 of the Toxoplasma gondii mitochondrial ribosome, and characterisation of a protein essential
1082 for mitochondrial translation. Mol Microbiol. 2019;112: 1235–1252. doi:10.1111/mmi.14357
- 1083 76. Tomavo S, Boothroyd JC. Interconnection between organellar functions, development and
1084 drug resistance in the protozoan parasite, Toxoplasma gondii. International Journal for
1085 Parasitology. 1995;25: 1293–1299. doi:10.1016/0020-7519(95)00066-B
- 1086 77. Biddau M, Sheiner L. Targeting the apicoplast in malaria. Biochem Soc Trans. 2019;47: 973–
1087 983. doi:10.1042/BST20170563
- 1088 78. Mather MW, Henry KW, Vaidya AB. Mitochondrial drug targets in apicomplexan parasites.
1089 Curr Drug Targets. 2007;8: 49–60. doi:10.2174/138945007779315632
- 1090 79. Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of toxoplasmosis:
1091 historical perspective, animal models, and current clinical practice. Clin Microbiol Reviews.
1092 2018;31: e00057-17, /cmr/31/4/e00057-17.atom. doi:10.1128/CMR.00057-17

- 1093 80. Goodman CD, Pasaje CFA, Kennedy K, McFadden GI, Ralph SA. Targeting protein translation in
1094 organelles of the Apicomplexa. Trends in Parasitology. 2016;32: 953–965.
1095 doi:10.1016/j.pt.2016.09.011
- 1096 81. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:
1097 1163–1173. doi:10.1128/aac.46.5.1163-1173.2002
- 1098 82. Gross U, Pohl F. Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of
1099 Toxoplasma gondii. Curr Top Microbiol Immunol. 1996;219: 235–245. doi:10.1007/978-3-642-
1100 51014-4_21
- 1101 83. Kennedy K, Crisafulli EM, Ralph SA. Delayed death by plastid inhibition in apicomplexan
1102 parasites. Trends in Parasitology. 2019;35: 747–759. doi:10.1016/j.pt.2019.07.010
- 1103 84. Kawamukai M. Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes. Bioscience, Biotechnology, and
1104 Biochemistry. 2016;80: 23–33. doi:10.1080/09168451.2015.1065172
- 1105 85. Liang X, Cui J, Yang X, Xia N, Li Y, Zhao J, et al. Acquisition of exogenous fatty acids renders
1106 apicoplast-based biosynthesis dispensable in tachyzoites of Toxoplasma. J Biol Chem.
1107 2020;295: 7743–7752. doi:10.1074/jbc.RA120.013004
- 1108 86. Amiar S, MacRae JI, Callahan DL, Dubois D, van Dooren GG, Shears MJ, et al. Apicoplast-
1109 localized lysophosphatidic acid precursor assembly is required for bulk phospholipid synthesis
1110 in Toxoplasma gondii and relies on an algal/plant-like glycerol 3-phosphate acyltransferase.
1111 PLOS Pathogens. 2016;12: e1005765. doi:10.1371/journal.ppat.1005765
- 1112 87. Amiar S, Katris NJ, Berry L, Dass S, Duley S, Arnold C-S, et al. Division and adaptation to host
1113 environment of apicomplexan parasites depend on apicoplast lipid metabolic plasticity and
1114 host organelle remodeling. Cell Reports. 2020;30: 3778–3792.e9.
1115 doi:10.1016/j.celrep.2020.02.072
- 1116 88. Martins-Duarte ÉS, Carias M, Vommaro R, Suroliá N, de Souza W. Apicoplast fatty acid
1117 synthesis is essential for pellicle formation at the end of cytokinesis in Toxoplasma gondii. J
1118 Cell Sci. 2016;129: 3320–3331. doi:10.1242/jcs.185223
- 1119 89. Ramakrishnan S, Docampo MD, Macrae JI, Pujol FM, Brooks CF, van Dooren GG, et al.
1120 Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan
1121 parasite Toxoplasma gondii. J Biol Chem. 2012;287: 4957–4971.
1122 doi:10.1074/jbc.M111.310144
- 1123 90. Dubois D, Fernandes S, Amiar S, Dass S, Katris NJ, Botté CY, et al. Toxoplasma gondii acetyl-
1124 CoA synthetase is involved in fatty acid elongation (of long fatty acid chains) during tachyzoite
1125 life stages. J Lipid Res. 2018;59: 994–1004. doi:10.1194/jlr.M082891
- 1126 91. MacRae JI, Sheiner L, Nahid A, Tonkin C, Striepen B, McConville MJ. Mitochondrial metabolism
1127 of glucose and glutamine is required for intracellular growth of Toxoplasma gondii. Cell Host
1128 Microbe. 2012;12: 682–692. doi:10.1016/j.chom.2012.09.013
- 1129 92. Shukla A, Olszewski KL, Llinás M, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, et al. Glycolysis is important
1130 for optimal asexual growth and formation of mature tissue cysts by Toxoplasma gondii.
1131 International Journal for Parasitology. 2018;48: 955–968. doi:10.1016/j.ijpara.2018.05.013

- 1132 93. Denton H, Roberts CW, Alexander J, Thong KW, Coombs GH. Enzymes of energy metabolism in
1133 the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. FEMS Microbiol Lett. 1996;137: 103–
1134 108. doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb08090.x
- 1135 94. Dzierszinski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation.
1136 Eukaryotic Cell. 2004;3: 992–1003. doi:10.1128/EC.3.4.992-1003.2004
- 1137 95. Watts E, Zhao Y, Dhara A, Eller B, Patwardhan A, Sinai AP. Novel Approaches Reveal that
1138 *Toxoplasma gondii* Bradyzoites within Tissue Cysts Are Dynamic and Replicating Entities In
1139 Vivo. MBio. 2015;6: e01155-01115. doi:10.1128/mBio.01155-15
- 1140 96. McHugh TD, Holliman RE, Butcher PD. The in vitro model of tissue cyst formation in
1141 *Toxoplasma gondii*. Parasitology Today. 1994;10: 281–285. doi:10.1016/0169-4758(94)90148-
1142 1
- 1143 97. Chandel NS. Evolution of mitochondria as signaling organelles. Cell Metab. 2015;22: 204–206.
1144 doi:10.1016/j.cmet.2015.05.013
- 1145 98. Martínez-Reyes I, Diebold LP, Kong H, Schieber M, Huang H, Hensley CT, et al. TCA cycle and
1146 mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions. Mol Cell.
1147 2016;61: 199–209. doi:10.1016/j.molcel.2015.12.002
- 1148 99. Sagot I, Laporte D. The cell biology of quiescent yeast – a diversity of individual scenarios. J
1149 Cell Sci. 2019;132: jcs213025. doi:10.1242/jcs.213025
- 1150 100. Yalamanchili N, Kriete A, Alfego D, Danowski KM, Kari C, Rodeck U. Distinct cell stress
1151 responses induced by ATP restriction in quiescent human fibroblasts. Front Genet. 2016;7:
1152 171. doi:10.3389/fgene.2016.00171
- 1153 101. Waldman BS, Schwarz D, Wadsworth MH, Saeij JP, Shalek AK, Lourido S. Identification of a
1154 master regulator of differentiation in *Toxoplasma*. Cell. 2020; S0092867419313753.
1155 doi:10.1016/j.cell.2019.12.013
- 1156 102. Hassan MA, Vasquez JJ, Guo-Liang C, Meissner M, Nicolai Siegel T. Comparative ribosome
1157 profiling uncovers a dominant role for translational control in *Toxoplasma gondii*. BMC
1158 Genomics. 2017;18: 961. doi:10.1186/s12864-017-4362-6
- 1159 103. Holmes MJ, Augusto L da S, Zhang M, Wek RC, Sullivan WJ. Translational control in the latency
1160 of apicomplexan parasites. Trends in Parasitology. 2017;33: 947–960.
1161 doi:10.1016/j.pt.2017.08.006
- 1162 104. Harvey R, Dezi V, Pizzinga M, Willis AE. Post-transcriptional control of gene expression
1163 following stress: the role of RNA-binding proteins. Biochem Soc Trans. 2017;45: 1007–1014.
1164 doi:10.1042/BST20160364
- 1165 105. Lirussi D, Matrajt M. RNA granules present only in extracellular *Toxoplasma gondii* increase
1166 parasite viability. Int J Biol Sci. 2011;7: 960–967. doi:10.7150/ijbs.7.960
- 1167 106. Liu M, Miao J, Liu T, Sullivan WJ, Cui L, Chen X. Characterization of TgPuf1, a member of the
1168 Puf family RNA-binding proteins from *Toxoplasma gondii*. Parasit Vectors. 2014;7: 141.
1169 doi:10.1186/1756-3305-7-141

- 1170 107. Gissot M, Walker R, Delhay S, Alayi TD, Huot L, Hot D, et al. Toxoplasma gondii Alba proteins
1171 are involved in translational control of gene expression. J Mol Biol. 2013;425: 1287–1301.
1172 doi:10.1016/j.jmb.2013.01.039
- 1173 108. Gastens MH, Fischer H-G. Toxoplasma gondii eukaryotic translation initiation factor 4A
1174 associated with tachyzoite virulence is down-regulated in the bradyzoite stage. Int J Parasitol.
1175 2002;32: 1225–1234. doi:10.1016/s0020-7519(02)00096-6
- 1176 109. Balk J, Pilon M. Ancient and essential: the assembly of iron–sulfur clusters in plants. Trends in
1177 Plant Science. 2011;16: 218–226. doi:10.1016/j.tplants.2010.12.006
- 1178 110. Shanmugasundram A, Gonzalez-Galarza FF, Wastling JM, Vasieva O, Jones AR. Library of
1179 Apicomplexan Metabolic Pathways: a manually curated database for metabolic pathways of
1180 apicomplexan parasites. Nucleic Acids Research. 2013;41: D706–D713.
1181 doi:10.1093/nar/gks1139
- 1182 111. Morlon-Guyot J, Berry L, Chen C-T, Gubbels M-J, Lebrun M, Daher W. The Toxoplasma gondii
1183 calcium-dependent protein kinase 7 is involved in early steps of parasite division and is crucial
1184 for parasite survival. Cell Microbiol. 2014;16: 95–114. doi:10.1111/cmi.12186
- 1185 112. Couvreur G, Sadak A, Fortier B, Dubremetz JF. Surface antigens of Toxoplasma gondii.
1186 Parasitology. 1988;97 (Pt 1): 1–10.
- 1187 113. Agrawal S, van Dooren GG, Beatty WL, Striepen B. Genetic evidence that an endosymbiont-
1188 derived endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) system functions in
1189 import of apicoplast proteins. J Biol Chem. 2009;284: 33683–33691.
1190 doi:10.1074/jbc.M109.044024
- 1191 114. Herm-Gotz A. Toxoplasma gondii myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-
1192 directed motor. The EMBO Journal. 2002;21: 2149–2158. doi:10.1093/emboj/21.9.2149
- 1193 115. Bermudes D, Dubremetz J-F, Achbarou A, Joiner KA. Cloning of a cDNA encoding the dense
1194 granule protein GRA3 from Toxoplasma gondii. Molecular and Biochemical Parasitology.
1195 1994;68: 247–257. doi:10.1016/0166-6851(94)90169-4
- 1196 116. de Miguel N, Echeverria PC, Angel SO. Differential subcellular localization of members of the
1197 Toxoplasma gondii small heat shock protein family. Eukaryot Cell. 2005;4: 1990–1997.
1198 doi:10.1128/EC.4.12.1990-1997.2005
- 1199 117. Plattner F, Yarovsky F, Romero S, Didry D, Carlier M-F, Sher A, et al. Toxoplasma profilin is
1200 essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response.
1201 Cell Host Microbe. 2008;3: 77–87. doi:10.1016/j.chom.2008.01.001
- 1202 118. Tomavo S, Fortier B, Soete M, Ansel C, Camus D, Dubremetz JF. Characterization of
1203 bradyzoite-specific antigens of Toxoplasma gondii. Infect Immun. 1991;59: 3750–3753.
1204 doi:10.1128/IAI.59.10.3750-3753.1991
- 1205 119. Jia Y, Marq J-B, Bisio H, Jacot D, Mueller C, Yu L, et al. Crosstalk between PKA and PKG controls
1206 pH-dependent host cell egress of Toxoplasma gondii. EMBO J. 2017;36: 3250–3267.
1207 doi:10.15252/embj.201796794
- 1208 120. Berger N, Vignols F, Przybyla-Toscano J, Roland M, Rofidal V, Touraine B, et al. Identification of
1209 client iron–sulfur proteins of the chloroplastic NFU2 transfer protein in Arabidopsis thaliana.

1210 Takahashi H, editor. Journal of Experimental Botany. 2020;71: 4171–4187.
1211 doi:10.1093/jxb/eraa166

1212 121. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-
1213 range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol. 2008;26:
1214 1367–1372. doi:10.1038/nbt.1511

1215 Figure legends

1216

1217 **Figure 1. TgNFS2 and TgISU1 are functional homologs of components of iron-sulfur cluster**
1218 **synthesis pathways.**

1219 A) Putative Fe-S cluster synthesis pathways and associated molecular machinery in Toxoplasma. B)
1220 Functional complementation of bacterial mutants for IscU (top) and SufS (bottom). Growth of 'wild-
1221 type' (WT) E. coli K12 parental strain, bacterial mutant strains and strains complemented ('comp') by
1222 their respective T. gondii homologues ('comp'), was assessed by monitoring the optical density at
1223 600 nm in the presence or not of an iron chelator (2,2'-bipyridyl, 'chel'). Values are mean from n=3
1224 independent experiments ±SEM. * denotes $p \leq 0.05$, Student's t-test.

1225

1226

1227 **Figure 2. TgNFS2 and TgISU1 localize to the apicoplast and the mitochondrion, respectively.**

1228 Detection by immunoblot of C-terminally HA-tagged TgNFS2 (A) and TgISU1 (B) in parasite extracts
1229 reveals the presence of both precursor (p) and mature (m) forms of the proteins. Anti-actin (TgACT1)
1230 antibody was used as a loading control. Immunofluorescence assay shows TgNFS2 co-localizes with
1231 apicoplast marker TgCPN60 (C) and TgISU1 co-localizes with mitochondrial marker F1 β ATPase (D).
1232 Scale bar represents 5 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast.

1233

1234 **Figure 3. Efficient down-regulation of TgNFS2 and TgISU1 expression with anhydrotetracyclin**
1235 **(ATc).**

1236 A) Immunoblot analysis with anti-HA antibody shows efficient down-regulation of TgNFS2 after 48h
1237 of incubation with ATc. Anti-SAG1 antibody was used as a loading control. B) Immunoblot analysis
1238 with anti-HA antibody shows efficient down-regulation of TgISU1 after 24h of incubation with ATc.
1239 Anti-SAG1 antibody was used as a loading control. C) and D) Immunofluorescence assays show
1240 TgNFS2 and TgISU1 are not detectable anymore after 48h of incubation with ATc. Scale bar
1241 represents 5 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast.

1241

1242 **Figure 4. Depletion of TgNFS2 or TgISU1 affects in vitro growth of the tachyzoites.** Plaque assays
1243 were carried out by infecting HFF monolayers with the TATi Δ Ku80 cell line, the cKD TgNFS2-HA (A) or
1244 the cKD TgISU1-HA (B) cell lines, or parasites complemented with a wild-type version of the
1245 respective proteins. They were grown for 7 days ± ATc. Measurements of lysis plaque areas are
1246 shown on the right and highlight a significant defect in the lytic cycle when TgNFS2 (A) or TgISU1 (B)
1247 were depleted. Values are means of n=3 experiments ± SEM. Mean value of TATi Δ Ku80 control was
1248 set to 100% as a reference. **** denotes $p \leq 0.0001$, Student's t-test. Scale bars= 1mm. TgNFS2 (C)
1249 and TgISU1 (D) mutant and complemented cell lines, as well as their parental cell lines and the TATi
1250 Δ Ku80 control, were grown in HFF in the presence or absence of ATc for 48 hours, and subsequently
1251 allowed to invade and grow in new HFF cells for an extra 24 hours in the presence of ATc. Parasites
1252 per vacuole were then counted. Values are means ± SEM from n=3 independent experiments for
1253 which 200 vacuoles were counted for each condition. E) Plaque assays for the TgNFS2 and TgISU1
1254 mutants were performed as described in A) and B), but ATc was washed out after 7 days (7 days+ 7
1255 days-) or not (14 days+), and parasites were left to grow for an extra 7 days. Plaque area was
1256 measured. Data are means ± SEM from three independent experiments. *** $p \leq 0.001$, Student's
1257 t-test. Arrowheads show plaques forming in the TgISU1 upon ATc removal. Scale bar= 1mm.

Figure 5. Impact of TgNFS2 and TgISU1 depletion on intracellular tachyzoites.

A) Depletion of TgNFS2 impacts the apicoplast. cKD TgNFS2-HA parasites were kept in the presence of ATc and the aspect of the apicoplast and mitochondrion was evaluated by microscopic observation using specific markers (CPN60 and F1 β ATPase, respectively). After 72 hours, parasites egressed and were used to reinvade new host cells for subsequent timepoints. Scale bar represents 5 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast. B) Quantification of apicoplast loss in vacuoles containing cKD TgNFS2-HA parasites after 72 to 120 hours of incubation with ATc. Data are mean values from n=3 independent experiments $\pm$ SEM. ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$, Student's t-test. C) Depletion of TgISU1 does not impact mitochondrial and overall parasite morphologies, but affects parasite growth. cKD TgISU1-HA parasites were grown in the presence of ATc for up to five days and the aspect of the apicoplast and mitochondrion was evaluated by microscopic observation using specific markers described in A). Growth in the presence of ATc was continuous for up to five days. Scale bar represents 5 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast. D) Egress is not affected by TgISU1 depletion. An egress assay was performed using calcium ionophore A23187. On the left are representative images of vacuoles containing parasites that egressed normally or did not. GRA3 (parasitophorous vacuole marker) staining is shown in green and GAP45 (parasite periphery marker) in red. Scale bars= 10 μ m. On the right is the quantification of egress for cKD TgISU1-HA parasites kept in the presence of ATc or not. Mean values $\pm$ SEM from n=3 independent biological experiments are represented.

Figure 6. Change in protein expression induced by TgNFS2 and TgISU1 depletion. Volcano plots showing the protein expression difference based on label-free quantitative proteomic data from TgNFS2 (A) and TgISU1 (B) mutants grown in the presence of ATc. X-axis shows log₂ fold change versus the TATi Δ Ku80 control grown in the same conditions, and the Y-axis shows -log₁₀(p value) after ANOVA statistical test for n=4 independent biological replicates. Selected variant protein categories are highlighted in color. C) Venn diagram representation of the shared and unique proteins whose expression is affected by the depletion of TgNFS2 and TgISU1. D) and E): mapping of less or more abundant candidates in the TgNFS2 and TgISU1 mutants, respectively, on the spatial proteome map representation of the hyperLOPIT data highlighting clusters denoting putative subcellular localization. Full details available at: <https://proteome.shinyapps.io/toxolopittex/>.

Figure 7. TgNFS2 depletion impacts apicoplast-related pathways and has deleterious effects on parasite replication. A) A decrease in the lipoylation of the E2 subunit of pyruvate dehydrogenase (TgPDH-E2), which depends on the Fe-S-containing lipoyl synthase called LipA in the apicoplast, was observed by immunoblot using an anti-lipoic acid antibody on cell extracts from cKD TgNFS2-HA parasites kept with ATc for an increasing period of time. TgCPN60 was used as a control for apicoplast integrity. TgSAG1 was used as a loading control. Decrease of lipoylated TgPDH-E2 was quantified by band densitometry and normalized with the internal loading control. Data represented are mean $\pm$ SEM of n=3 independent experiments. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ ANOVA comparison. B) cKD TgNFS2-HA parasites that were grown in the presence of ATc for 5 days were co-stained with anti-TgIMC3 (to outline parasites and internal buds) and anti-CPN60 (an apicoplast marker), which highlighted abnormal membrane structures and organelle segregation problems. Scale bar represents 5 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast.

Figure 8. TgISU1 depletion impacts the mitochondrial respiratory chain. A) Schematic representation of the *T. gondii* mitochondrial respiratory chain; listed are the subunits of the different complexes that were found less abundant upon TgISU1 depletion; Fe-S proteins are highlighted in green. SDH: succinate dehydrogenase; CoQ: coenzyme Q B) Immunofluorescence analysis of cKD TgISU1 parasites expressing HA-tagged TgSDHB (top) or TgApiCox13 (bottom)

showing a decrease in expression in the HA-tagged candidates after 3 days of incubation with ATc. Images were taken with the same exposure time for similar channels. TgHSP29 was used as a mitochondrial marker. Scale bar represents 10 μ m. DNA was labelled with DAPI. C) Immunoblot analysis of TgSDHB (top) and TgApiCox13 (bottom) levels upon depletion of TgISU1 after 3 days of incubation with ATc. TgACT1 was used as a loading control. Protein levels were quantified by band densitometry and normalized with the internal loading control. Data represented are mean $\pm$ SEM of n=5 independent experiments. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, ANOVA comparison. D) Impact of TgISU1 depletion on the parasite mitochondrial membrane potential was measured by JC-1 labelling. cKD TgISU1-HA parasites were grown or not in the presence of ATc, mechanically released from their host cells and labelled with the JC-1 dye. This dye exhibits potential-dependent accumulation in the mitochondrion, indicated by a switch from green fluorescence for the monomeric form of the probe, to a concentration-dependent formation of red aggregates (inset, DNA is labelled with DAPI and shown in blue, scale=1 μ m). Parasites were then analysed by flow cytometry. Unlabelled parasites (no JC-1) was used as a control for gating. Numbers represent the percentage of cells in each of the subpopulations (P1, P2, P3). One representative experiment out of n=3 biological replicates is shown.

Figure 9. Depletion of TgISU1 triggers parasite differentiation.

A) cKD TgISU1-HA parasites were grown in the presence of ATc and labelled with anti-TgIMC3 (to outline parasites) and a lectin of *Dolichos biflorus* (DBL) to specifically outline nascent cyst walls. Scale bar represents 10 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast. B) Quantification of DBL-positive vacuoles after 24 hours or 48 hours of culture of 1) the cKD TgISU1-HA and cKD TgNFS2-HA mutants in the presence or absence of ATc 2) the Tati Δ Ku80 cell line, as a negative control, 3) the Tati Δ Ku80 cell line in the presence of 100 μ M nitric oxide (NO), as a positive control. Data are from n=3 independent experiments. Values are mean $\pm$ SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Student's t-test C) Clustering of bradyzoite (Bz) or tachyzoite (Tz)-specific proteins of the SRS family shows specific enrichment of bradyzoite proteins upon TgISU1 depletion. D) The cKD TgISU1-HA mutant was grown for up to 14 days in the presence of ATc and labelled for tachyzoite marker SAG1, or intermediate (P18/SAG4) or late (P21) bradyzoite markers. Scale bar represents 10 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast. E) Measurement of the cyst area size after growing the cKD TgISU1-HA mutant for 7 and 14 days in the presence of ATc and labelling the cyst wall with DBL and measuring the surface of 60 cysts per condition. Mean $\pm$ SD is represented. One representative experiment out of three independent biological replicates is shown. **** denotes $p \leq 0.0001$, Student's t-test.

Figure 10. Other mitochondrial mutants remain viable and initiate stage conversion.

A) Plaque assays for the TgQCR11 and TgmS35 mutants were performed by infecting HFF monolayers with cKD cell lines and letting them grow in absence (7 days -) or presence of ATc (7 days +), after 7 days ATc was washed out (7 days+ 7days-) or not (14 days+), and parasites were left to grow for an extra 7 days. Plaque area was measured. Data are means $\pm$ SEM from three independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, Student's t-test. Arrowheads show small plaques. Scale bar= 1mm. B) Tati Δ Ku80 parasites were grown in the presence of atovaquone and cKD TgQCR11 and TgmS35 parasites were grown in the presence of ATc for up to two days. They were labelled with anti-TgIMC3 (to outline parasites) and *Dolichos biflorus* lectin (DBL) to specifically outline nascent cyst walls. Scale bar represents 10 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast. C) Quantification of DBL-positive vacuoles after 24 hours or 48 hours of culture of 1) the cKD TgQCR11 and cKD TgmS35 mutants in the presence or absence of ATc 2) the Tati Δ Ku80 cell line in the presence or not of 1 μ M atovaquone. Data are from n=3 independent experiments. Values are mean $\pm$ SEM. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, Student's t-test. D) The cKD TgQCR11 and cKD TgmS35 mutants were grown for up to 14 days in the presence of ATc and labelled for tachyzoite marker SAG1, or early (P18/SAG4) or late (P21) bradyzoite markers. Scale bar represents 10 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast.

Supplemental table legends

Table S1. Predicted Toxoplasma homologues of the iron-sulfur cluster synthesis machinery.

Homology searches were conducted in ToxoBD.org using Arabidopsis thaliana proteins as a query.

Putative subcellular localization was obtained from the hyperLOPIT data available on ToxoDB.org, or

by manual annotation. CRISPR fitness score data was obtained from ToxoDB.org.

Table S2. Predicted Toxoplasma iron-sulfur proteome. The Toxoplasma predicted whole proteome

was obtained from the ToxoDB.org database and searched for putative iron-sulfur-containing

proteins with the MetalPredator web server (<http://metalweb.cerm.unifi.it/tools/metalpredator/>).

Putative subcellular localization was obtained from the hyperLOPIT data available on ToxoDB.org, or

by manual annotation. CRISPR fitness score data was obtained from ToxoDB.org.

Table S3. Proteins with lower or higher expression upon depletion of TgNFS2 as found by label-free quantitative proteomics.

For each protein candidate (with www.ToxoDB.org and www.Uniprot.org identifier),

log₂ of the different ratio were calculated between the mean MaxQuant LFQ values

(‘moyLFQ’) found for the TgISU1 (‘Mito’) and TgNFS2 (‘Apicoplast’) mutants, and the TATi ΔKu80

control (‘CTRL’). -log₁₀(pvalue) is also provided. Putative subcellular localization was obtained from

the hyperLOPIT data available on ToxoDB.org, or by manual annotation. CRISPR fitness score and

transcriptomic data for tachyzoites (Tz) and bradyzoites (Bz) were obtained from ToxoDB.org.

Table S4. Proteins with lower or higher expression upon depletion of TgISU1 as found by label-free quantitative proteomics.

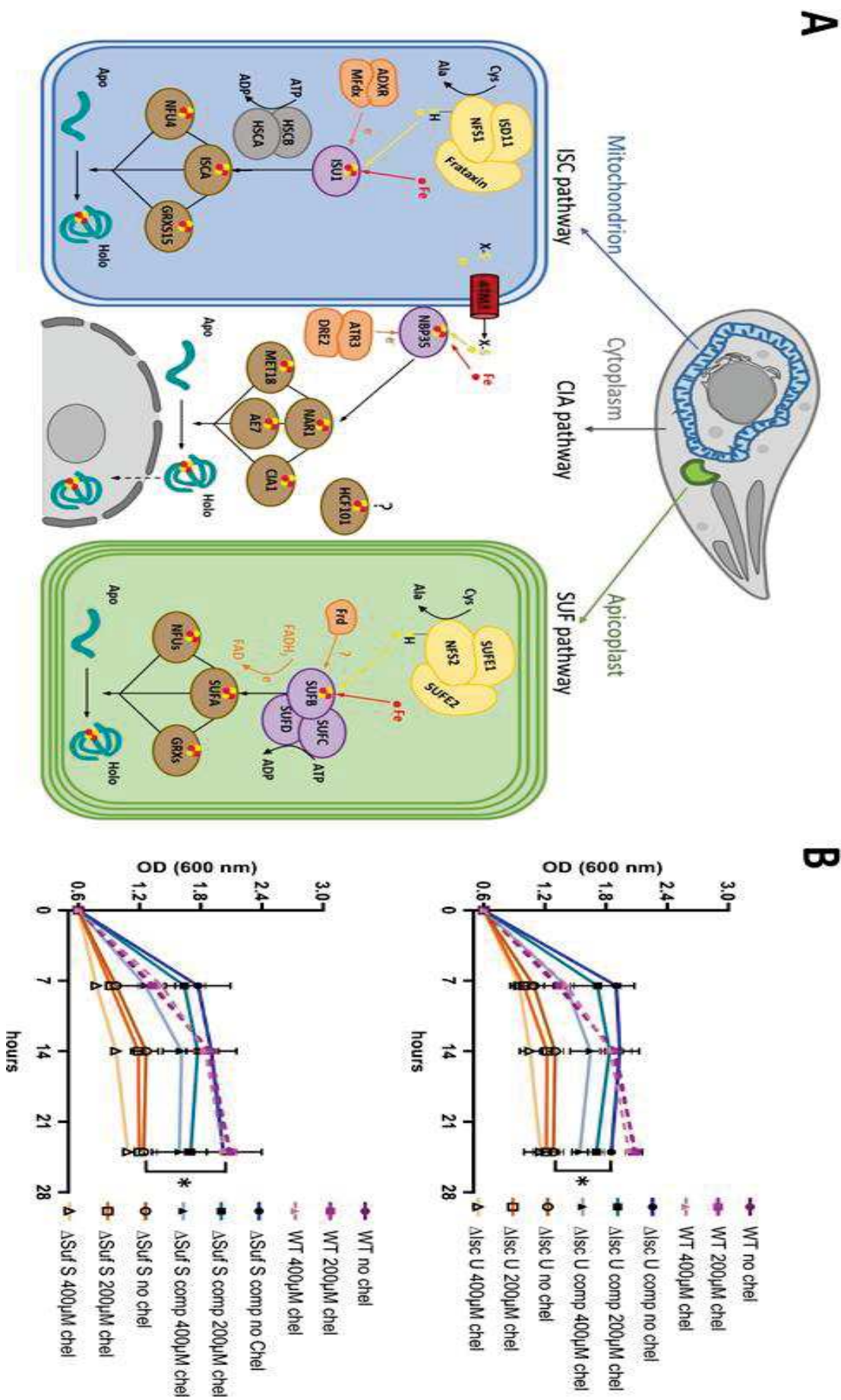
See legend of Table S3. Candidates from the Fe-S proteome (Table S2) that

were found to have a lower expression upon TgISU1 depletion are highlighted in red.

Table S5. Common proteins with lower or higher expression upon depletion of TgNFS2 or TgISU1, as found by label-free quantitative proteomics. See legend of Table S3.

Table S6. Oligonucleotides used in this study.

Figure 1: TgNFS2 and TgISU1 are functional homologs of components of iron-sulfur cluster pathway synthesis



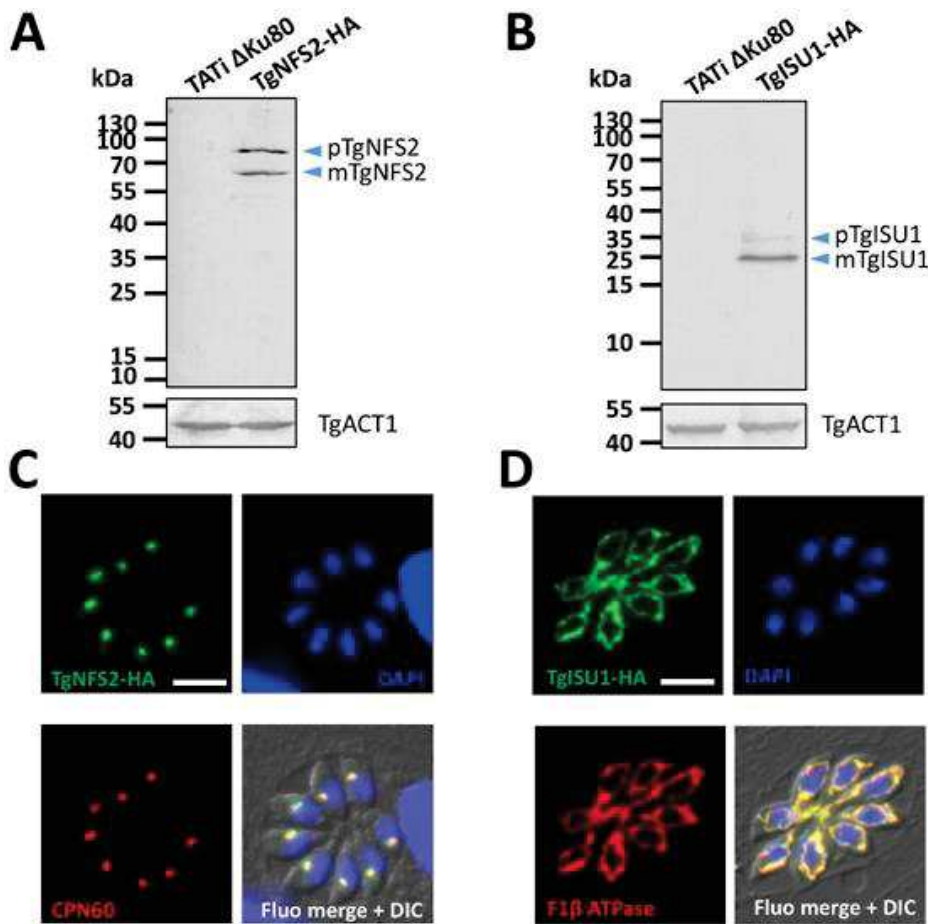


Figure 2: TgNFS2 and TgISU1 localize to the apicoplast and the mitochondrion, respectively.

Figure 3: Efficient down-regulation of TgNFS2 and TgISU1 expression with anhydrotetracyclin (ATc).

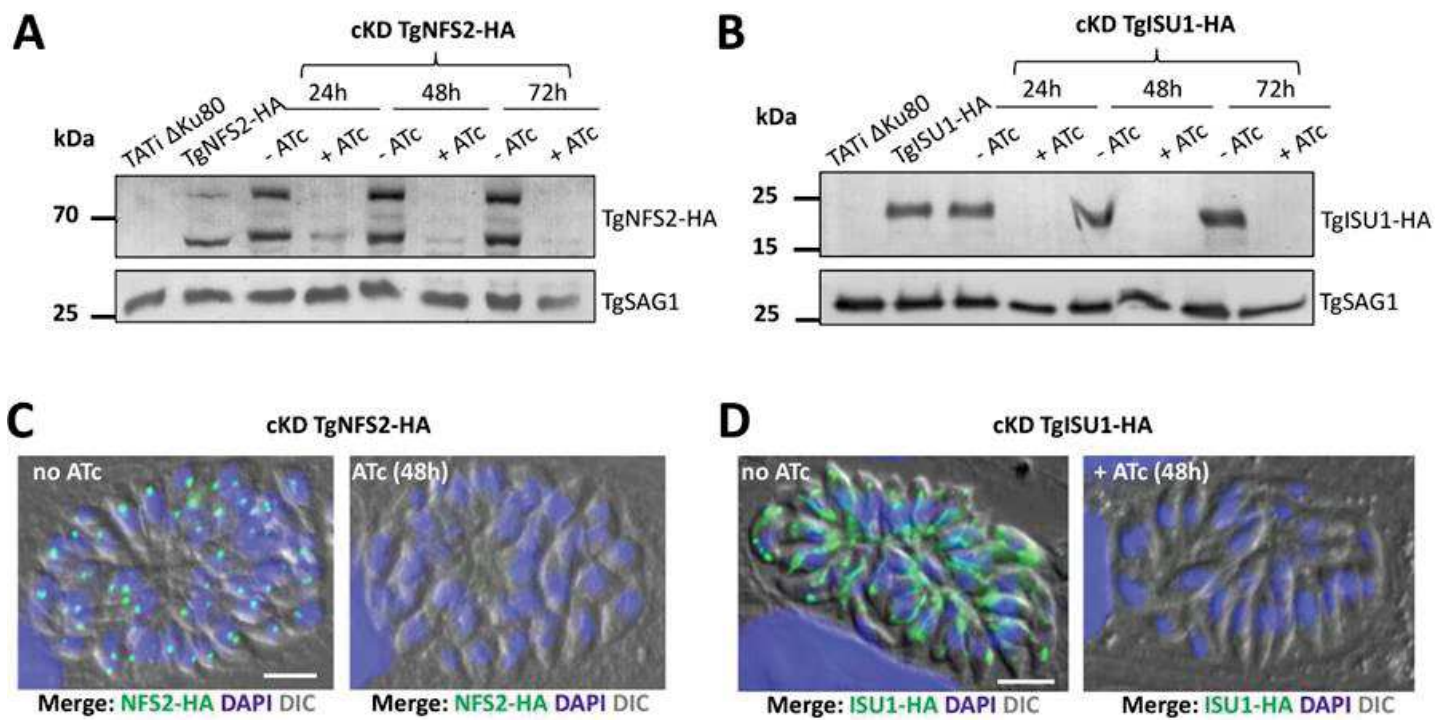


Figure 4: Depletion of TgNFS2 or TgISU1 affects in vitro growth of the tachyzoites .

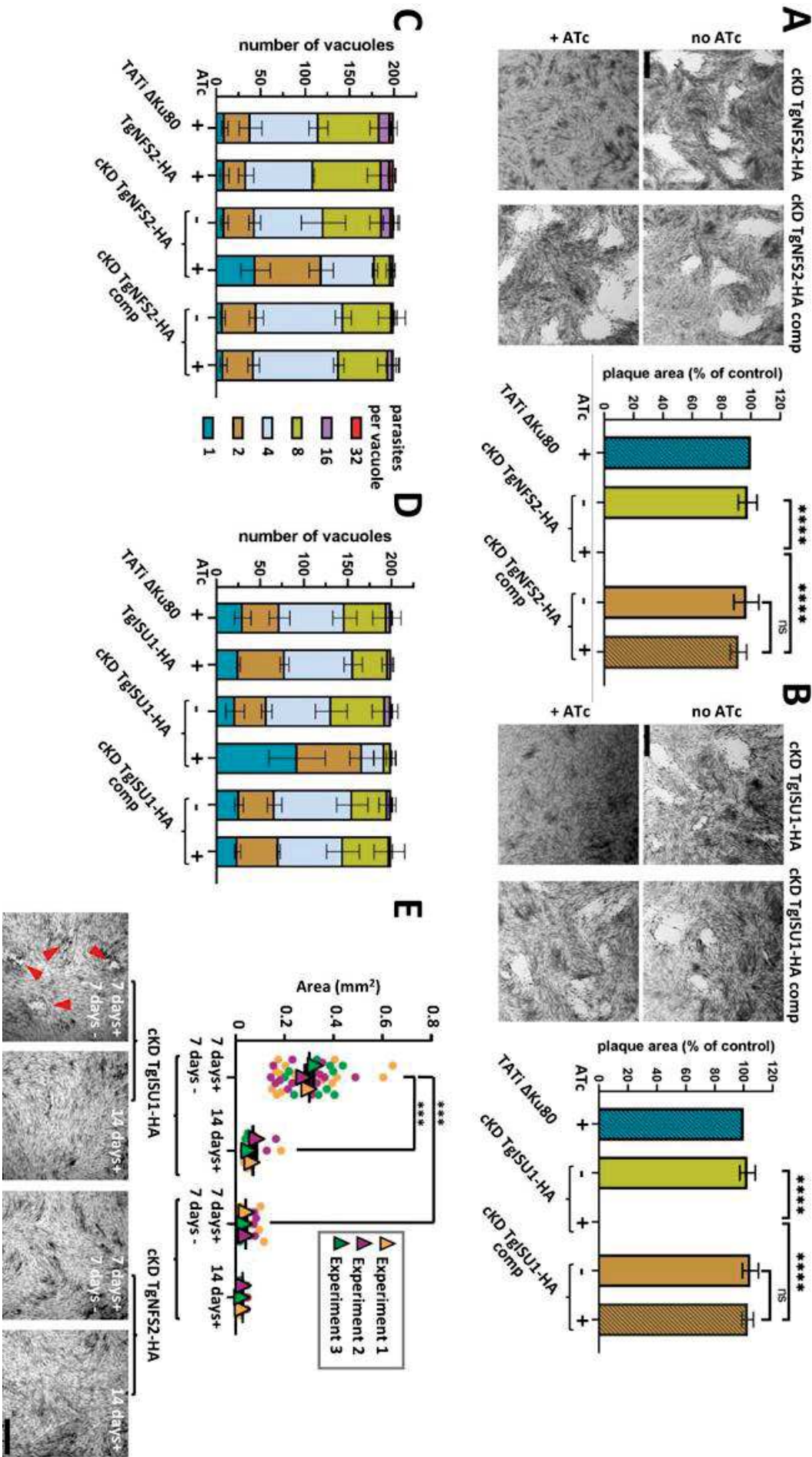


Figure 5: Impact of TgNFS2 and TgISU1 depletion on intracellular tachyzoites.

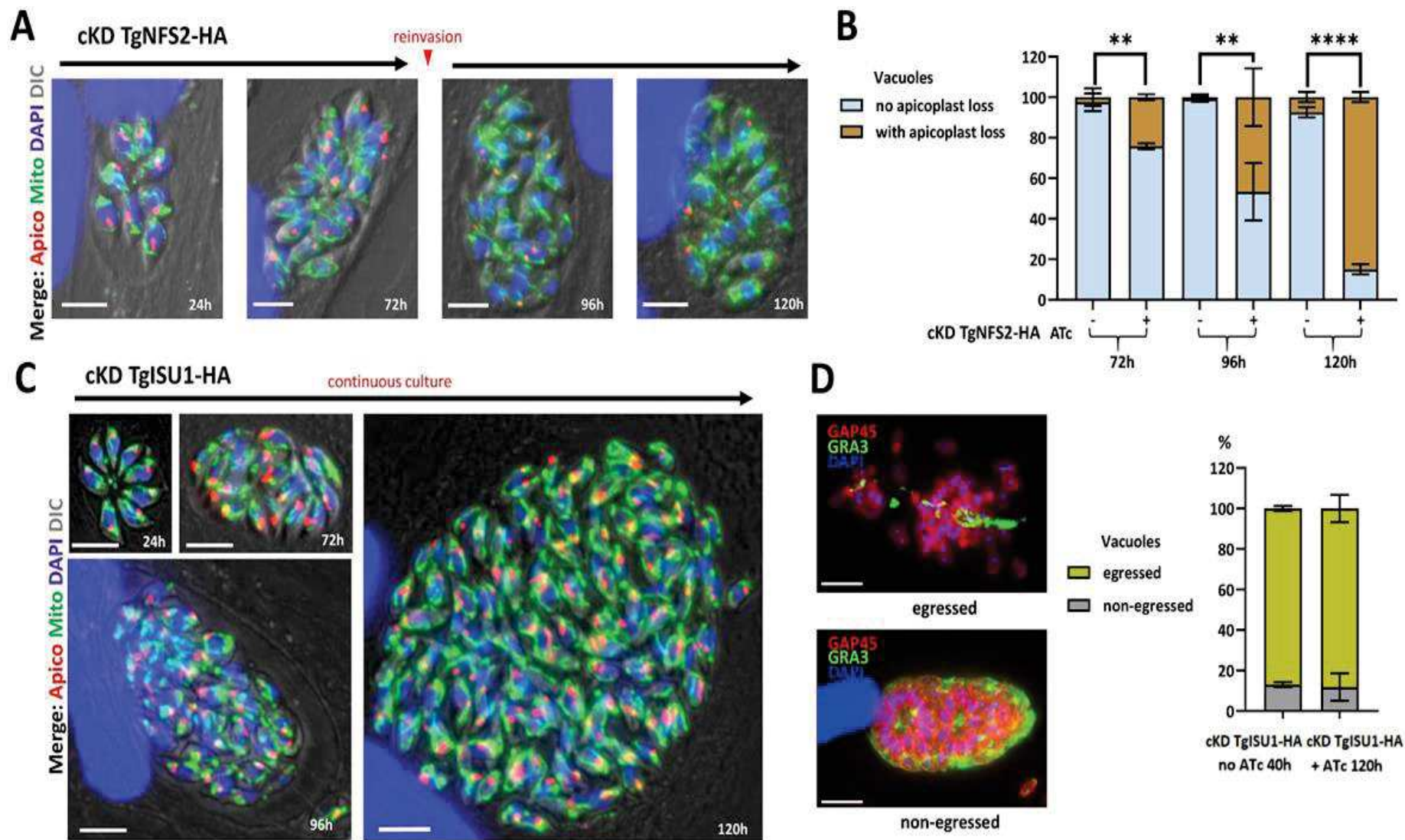


Figure 6: Change in protein expression induced by TgNFS2 and TgISU1 depletion.

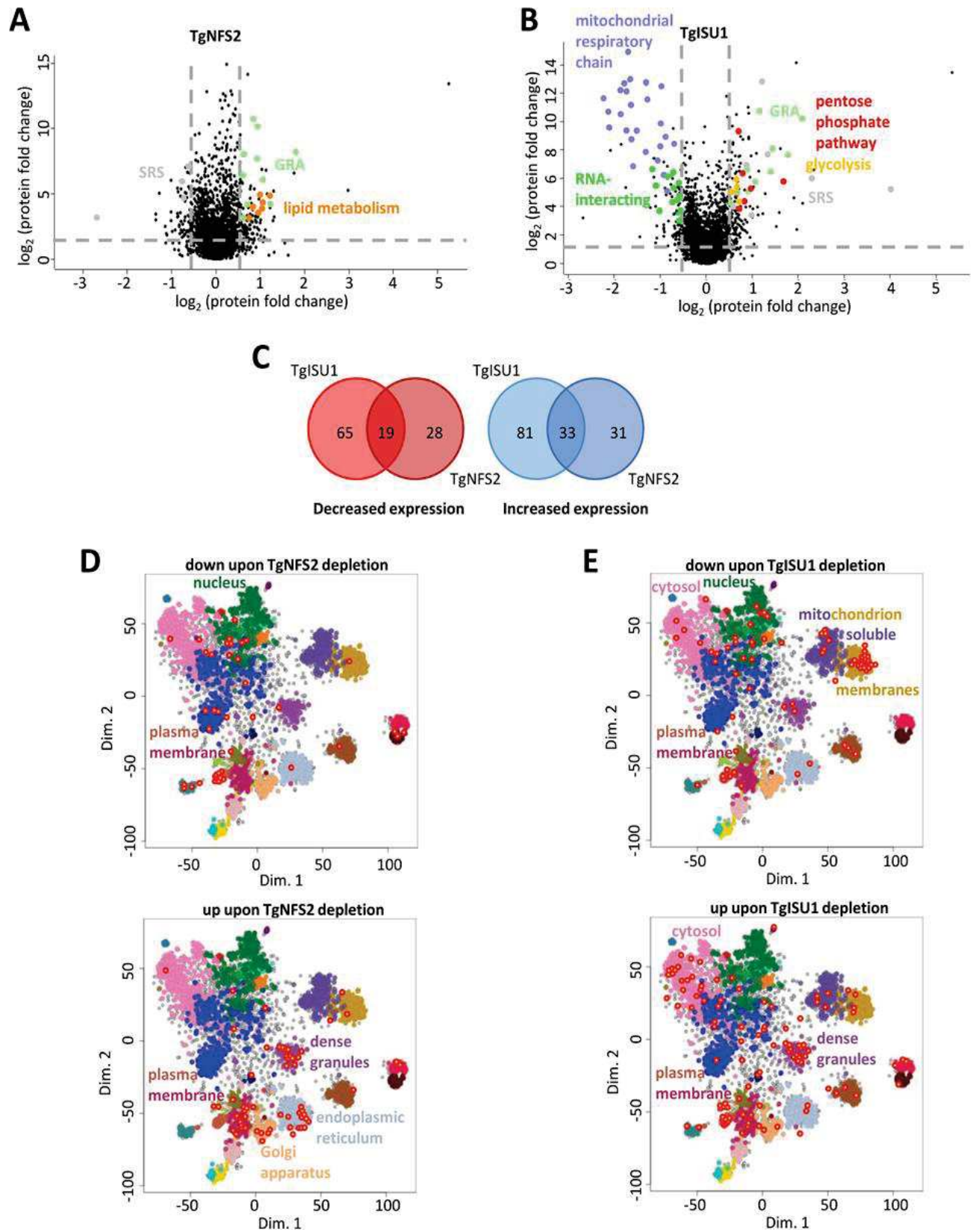


Figure 7: TgNFS2 depletion impacts apicoplast-related pathways and has deleterious effects on parasite replication.

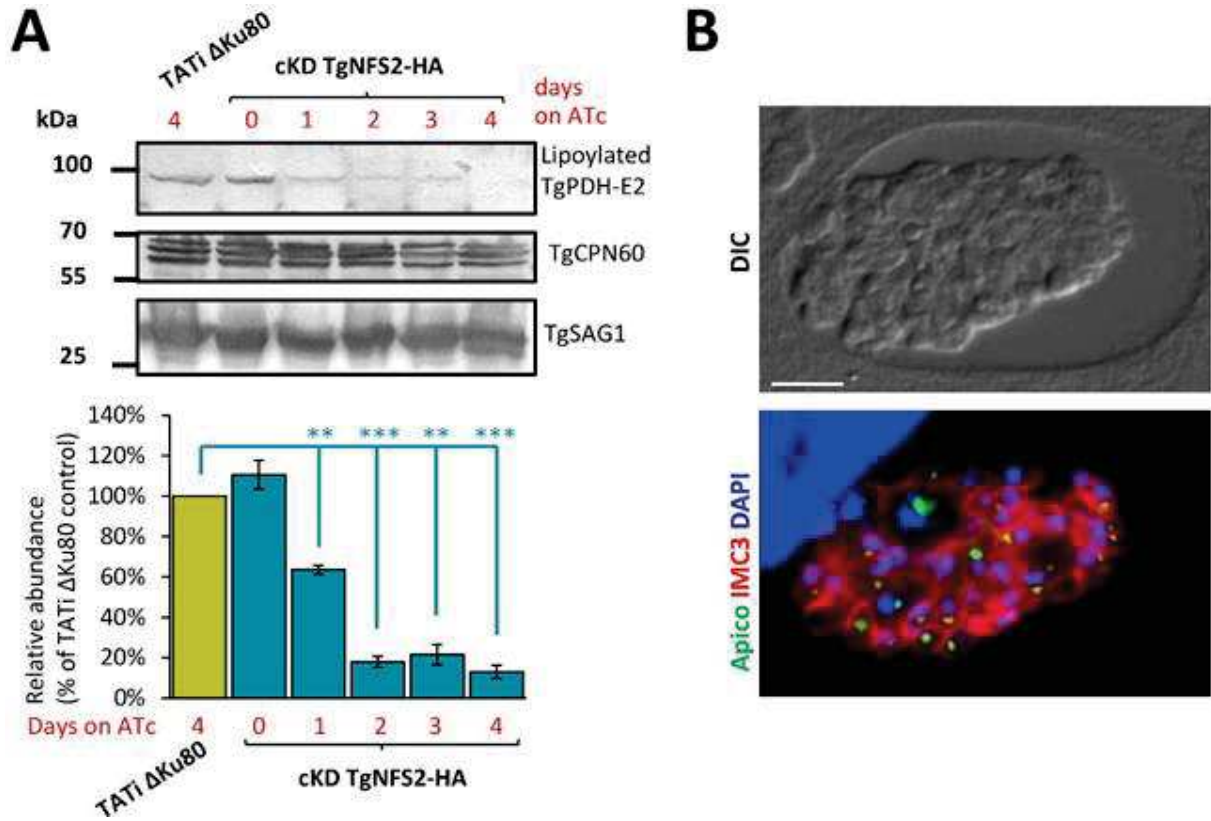


Figure 8: TgISU1 depletion impacts the mitochondrial respiratory chain.

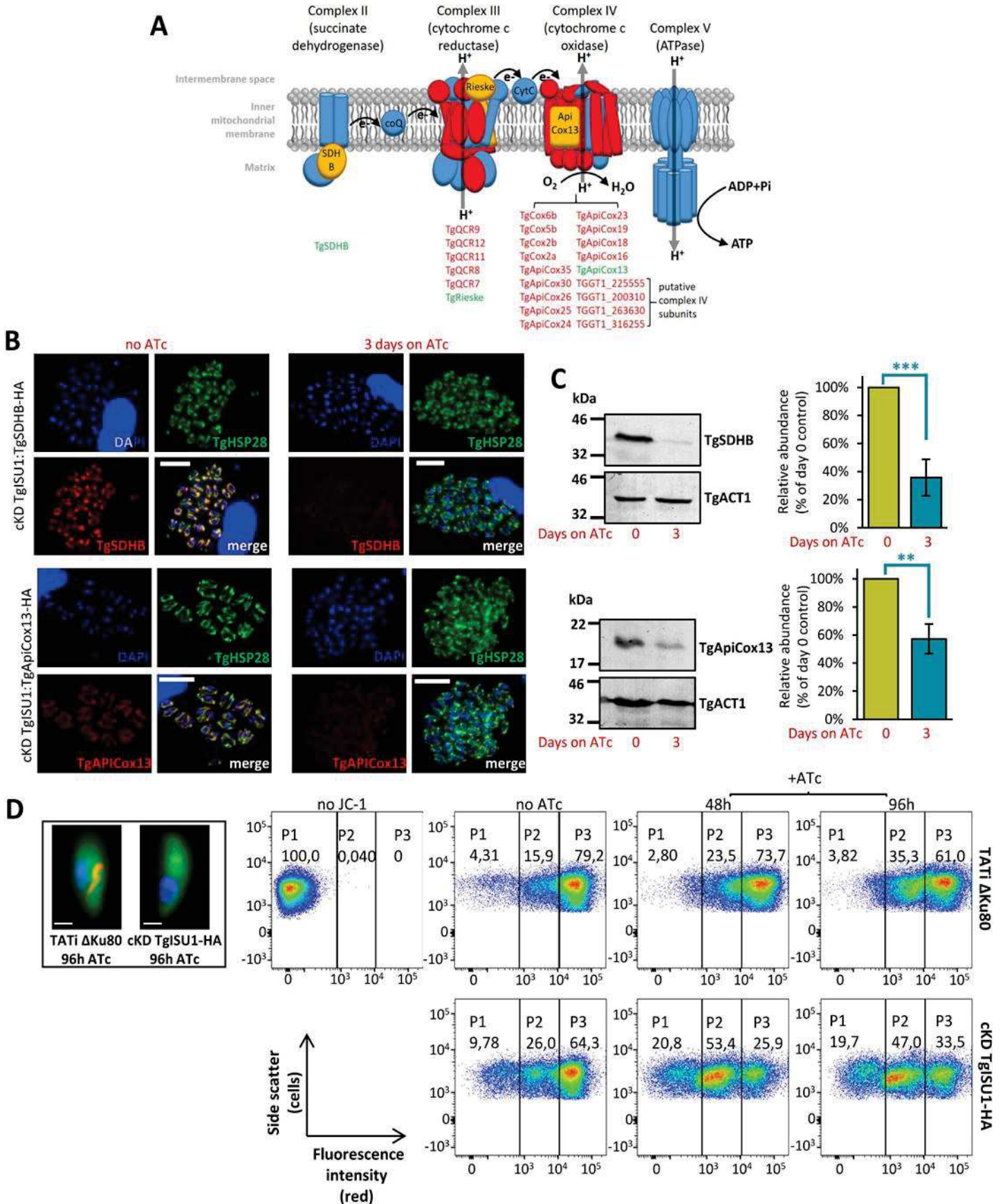


Figure 9: Depletion of TgISU1 triggers parasite differentiation.

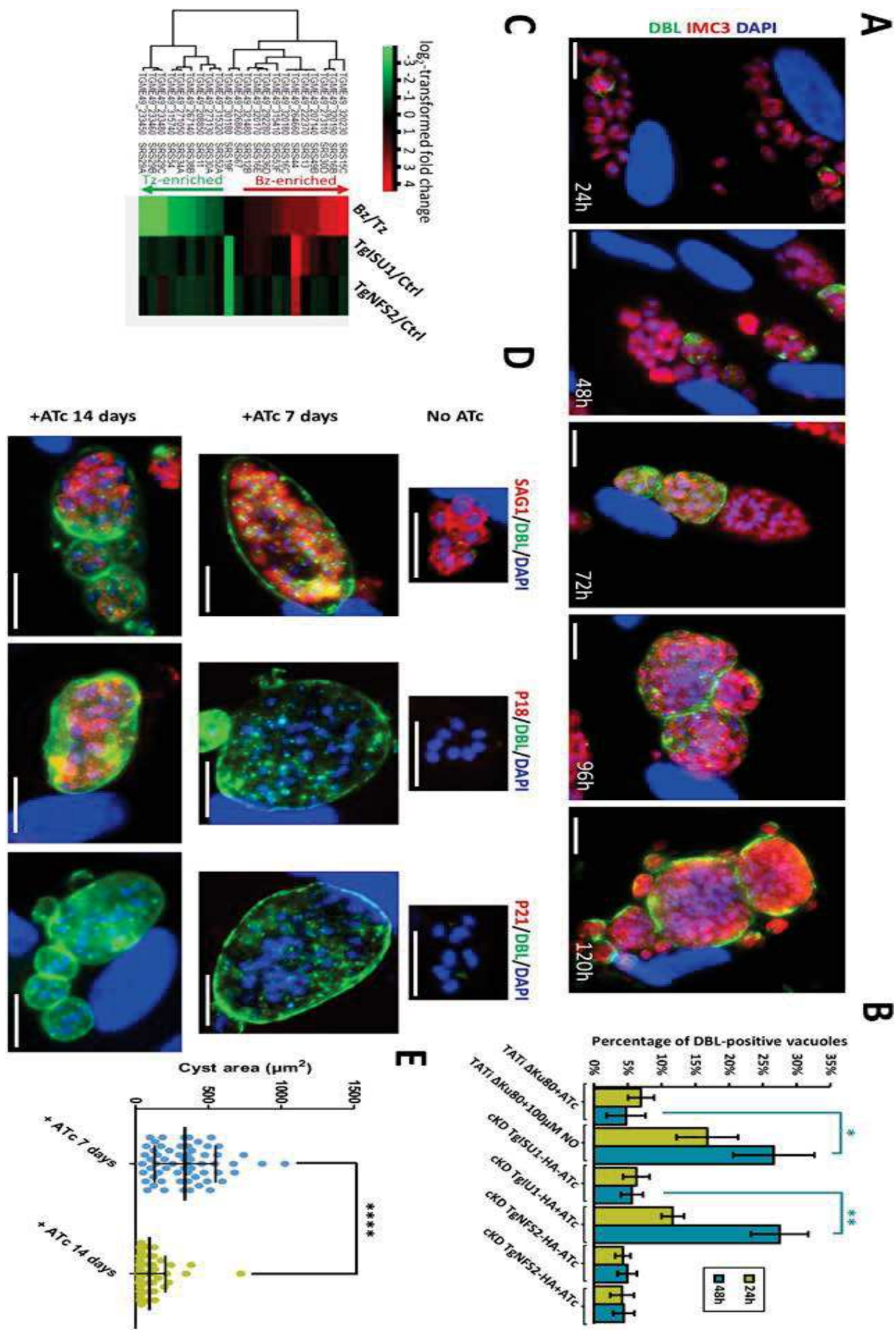


Figure 10: Other mitochondrial mutants remain viable and initiate stage conversion.

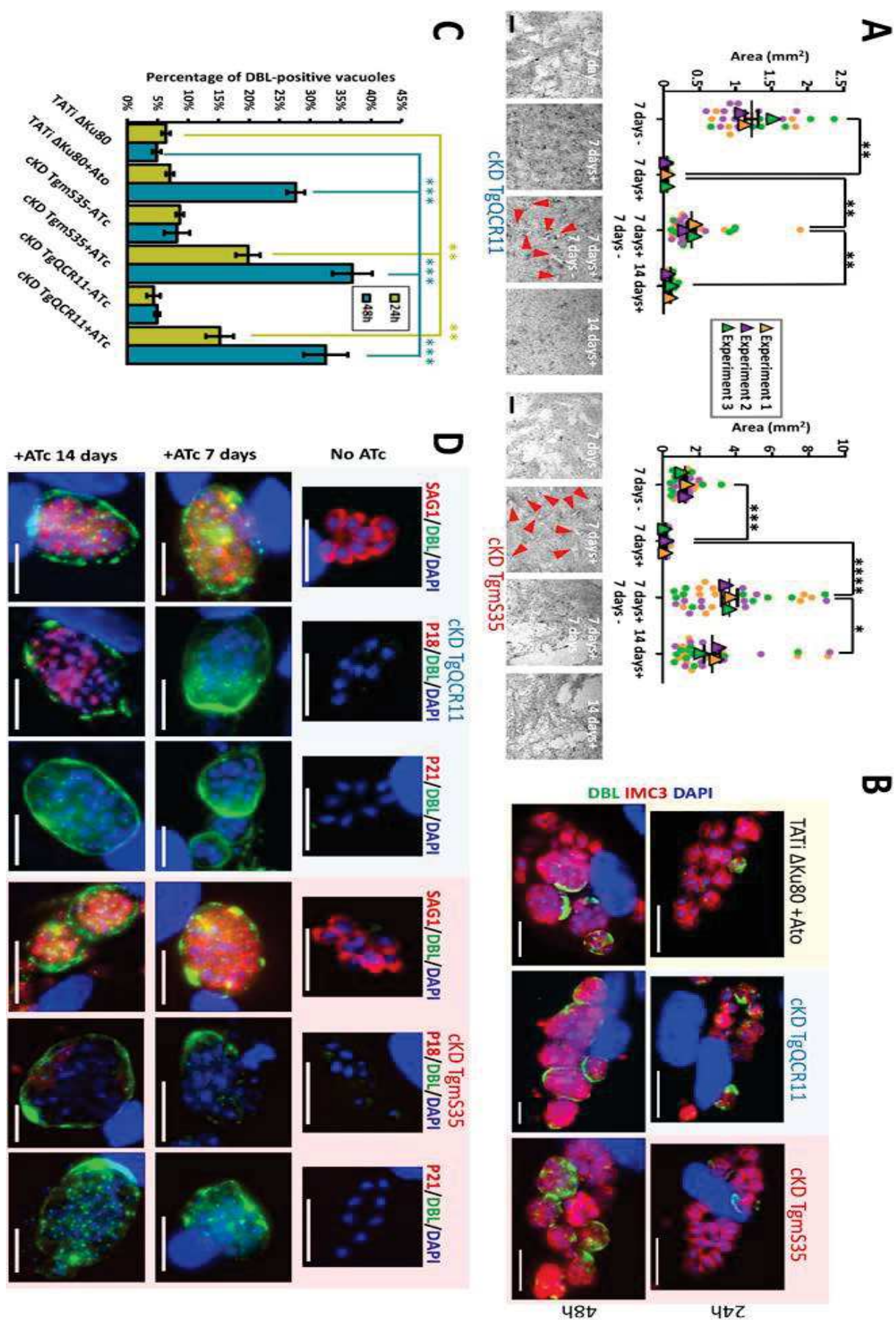


Table S1: Predicted Toxoplasma homologues of the iron-sulfur cluster synthesis machinery.

	Protein name	Gene ID (<i>A. thaliana</i>)	Uniprot ID (<i>A. thaliana</i>)	Gene ID (<i>T. gondii</i>)	BLAST E value	Localization (HyperLOPIT) [§]	CRISPR Fitness score [‡]	proposed function
Plastid SUF pathway	NFS2	AT1G08490	Q93WX6	TGGT1_216170	1,00E-105	Apicoplast	-3.95	cysteine desulfurase
	SUFE1	AT4G26500	Q84W65	TGGT1_239320	4,00E-14	Apicoplast	0.1	necessary for NFS2 activity
	SUFE2	AT1G67810	Q9FGS4	TGGT1_277010	6,00E-04	N/A	-3.31	
	SUFB	AT4G04770	Q9ZS97	TGGT1_300650	9,00E-110	N/A, apicoplast genome-encoded	N/A	part of SUFB/C/D transfer complex, encoded by the apicoplast genome
	SUFC	AT3G10670	Q9CAF5	TGGT1_225800	3,00E-81	Apicoplast	-5.57	part of SUFB/C/D transfer complex, ATPase
	SUFD	AT1G32500	Q9LQK7	TGGT1_273445	2,00E-21	Apicoplast	-5.29	part of SUFB/C/D transfer complex, co-factor
	NFU1	AT4G01940	Q93W77	TGGT1_221922	7,00E-22	Apicoplast/ER	-0.76	Fe-S carrier
	SUFA/CpISCA	AT1G10500	Q9XIK3	TGGT1_297925	9,00E-25	N/A	-4.01	
	GRXS14	AT3G54900	Q84Y95	TGGT1_247580	1,00E-21	Rhoptry	-0.07	Glutaredoxins
	GRXS16	AT2G38270	Q8H7F6	TGGT1_238070	3,00E-24	Cytoplasm	-0.65	
	HCF101	AT3G24430	Q6STH5	TGGT1_318590	2,00E-40	Cytoplasm	-3.24	assembly of Fe-S cluster on selected proteins, ATP dependent
	Frd	AT4G14890	Q23344	TGGT1_215070	8,00E-35	Apicoplast	-4.35	Ferredoxin
Mitochondrion ISC pathway	NFS1	AT5G65720	Q49543	TGGT1_211090	3,00E-174	Mitochondrion	-3.54	cysteine desulfurase
	ISD11	AT5G61220	Q8L9E3	TGGT1_254800	0.006	Mitochondrion	-3.51	necessary for NFS1 activity
	ISU1	AT4G22220	Q49627	TGGT1_237560	8,00E-52	Mitochondrion	-5.99	Fe-S cluster scaffold
	FH (frataxin)	AT4G03240	Q9ZR07	TGGT1_262810	1,00E-08	Mitochondrion	-3.34	putative Fe donor, regulator of NFS1
	HSCA	AT4G37910	Q8GUM2	TGGT1_251780	0.00	Mitochondrion	-5.09	Chaperone
	HSCB	AT5G06410	Q8L7K4	TGGT1_288685	1,00E-14	Mitochondrion	-2.92	co-chaperone
	NFU4	AT3G20970	Q9LIG6	TGGT1_212930	3,00E-29	Mitochondrion	-1.03	Fe-S carrier
	ISCA	AT2G16710	Q8LBM4	TGGT1_213810	1,00E-21	Mitochondrion	-4.52	
	GRXS15	AT3G15660	Q8LBK6	TGGT1_268730	5,00E-14	Mitochondrion	-2.13	Glutaredoxin
	MGE1	AT5G55200	Q9FLP3	TGGT1_265220	3,00E-23	Mitochondrion	-5.29	co-chaperone
	Mfdx1/2	AT4G05450/AT4G21090	Q9MOV0/Q8S904	TGGT1_236000	3,00E-23	Mitochondrion	0.2	Mitochondrial ferredoxin
				TGGT1_240670	8,00E-40	Mitochondrion	-2.45	Mitochondrial ferredoxin
	ADRX	AT4G32360	Q8W3L1	TGGT1_261030	2,00E-60	Mitochondrion	-3.66	Adrenodoxin reductase
Cytoplasm CIA pathway	ATM3	AT5G58270	Q9LVM1	TGGT1_269000	3,00E-146	Mitochondrion	-4.96	transporter of S precursor needed for cytosolic Fe-S assembly
	ATR3	AT3G02280	Q6NPS8	TGGT1_249320	4,00E-27	Mitochondrion	-3.87	reductase
	DRE2	AT5G18400	Q8L7Z3	TGGT1_216900	8,00E-27	Cytoplasm	N/A	electron transfer
	NBP35	AT5G50960	Q8H1Q2	TGGT1_280730	4,00E-96	Mitochondrion	-4.81	Fe-S cluster scaffold, mitochondrial but is involved in the CIA pathway
	CIA1	AT2G26060	Q80990	TGGT1_215740	2,00E-25	Nucleus	-4.92	formation of a complex and association with target Fe-S proteins
	AE7	AT1G68310	Q9C9G6	TGGT1_306590	8,00E-21	N/A	-4.52	
	MET18	AT5G48120	Q6NPS8	TGGT1_222230	3,00E-06	Cytoplasm	-5.39	
	NAR1	AT4G16440	Q94CL6	TGGT1_242580	9,00E-30	Mitochondrion	-4.36	
						§ inferred from (published data or HyperLOPIT prediction -Barylyuk K et al Cell Host & Microbe 2020-)	‡ fitness score data from whole genome CRISPR screen (Sidik SM et al. Cell 2016)	

Table S2: Predicted Toxoplasma iron-sulfur proteome

ToxoDB ID	CRISPR Fitness score κ	Predicted location $\$$	Product Description	Cellular process
TGGT1_209770	-4.09	nucleus	putative helicase	DNA repair and replication
TGGT1_215550	-2.4	-	exonuclease V	DNA repair and replication
TGGT1_216870	-4.33	nucleus	DNA excision repair helicase	DNA repair and replication
TGGT1_258030	-4.45	nucleus (HyperLOPIT)	DNA polymerase	DNA repair and replication
TGGT1_264670	-0.2	nucleus	DNA polymerase	DNA repair and replication
TGGT1_297840	-4.86	nucleus	DNA primase, large subunit	DNA repair and replication
TGGT1_305920	-0.96	nucleus (HyperLOPIT)	DNA glycosylase/endonuclease-like	DNA repair and replication
TGGT1_313470	0.24	nucleus	DNA glycosylase/endonuclease-like	DNA repair and replication
TGGT1_215070	-4.35	apicoplast (HyperLOPIT)	ferredoxin (FD)	Electron transfer
TGGT1_236000	0.2	mitochondrion (HyperLOPIT)	ferredoxin (FD)	Electron transfer
TGGT1_240670	-2.45	mitochondrion (HyperLOPIT)	ferredoxin (FD)	Electron transfer
TGGT1_265230	-2.37	mitochondrion	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	Electron transfer
TGGT1_251390	-0.08	mitochondrion	rieske [2Fe-2S] domain-containing protein	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_320220	-5.76	mitochondrion (HyperLOPIT)	putative ubiquinol cytochrome c oxidoreductase	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_254030	-4.26	mitochondrion (HyperLOPIT)	NEET family, zinc finger CDGSH-type domain-containing protein, TgApiCox13	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_215280	-2	mitochondrion (HyperLOPIT)	succinate dehydrogenase	Mitochondrial respiratory chain/TCA cycle
TGGT1_267330	-3.5	mitochondrion (HyperLOPIT)	fumarate hydratase	TCA cycle
TGGT1_226730	-4.73	mitochondrion (HyperLOPIT)	aconitate hydratase ACN/IRP	TCA cycle/iron sensor
TGGT1_211090	-3.54	mitochondrion (HyperLOPIT)	IscS desuphurase	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_212930	-1.03	mitochondrion (HyperLOPIT)	NifU-like protein	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_213810	-4.52	mitochondrion	IscA	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_216170	-3.95	apicoplast (HyperLOPIT)	SufS subfamily cysteine desulfurase	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_216900	-2.88	mitochondrion (HyperLOPIT)	Anamorsin/DRE2-like	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_221922	-0.76	apicoplast/ER (HyperLOPIT)	NifU family domain-containing protein	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_237560	-5.99	mitochondrion (HyperLOPIT)	IscU	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_239320	0.1	apicoplast (HyperLOPIT)	SufE-like, BolA family protein	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_242580	-4.36	mitochondrion (HyperLOPIT)	Nar1-like Fe-hydrogenase	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_273445	-5.29	apicoplast (HyperLOPIT)	SufD	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_280730	-4.81	mitochondrion (HyperLOPIT)	Mrp/NBP35 subfamily of P loop NTPases	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_297925	-4.01	apicoplast	SufA	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_300650	N/A (apicoplast-encoded)	apicoplast	SufB	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_318590	-3.24	cytoplasm (HyperLOPIT)	Mrp/NBP35 subfamily of P loop NTPases, HCF101-like	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_230070	2.11	cytoplasm	BolA2 family protein	GRX-interacting/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_227150	1.39	apicoplast (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_238070	-0.65	cytoplasm (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_247580	-0.07	rhoptry (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_268730	-2.13	mitochondrion (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_279400	1	cytoplasm (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_288640	2.29	mitochondrion	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like, coproporphyrinogen dehydrogenase, CPDH	Heme biosynthesis
TGGT1_227420	-6.01	apicoplast (HyperLOPIT)	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase, IspH/LytB	Isoprenoid biosynthesis, MEP pathway
TGGT1_262430	-4.41	apicoplast (HyperLOPIT)	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase, IspG/GcpE	Isoprenoid biosynthesis, MEP pathway
TGGT1_226400	-0.97	apicoplast (HyperLOPIT)	lipoic acid synthase LIPA	Lipoic acid synthesis
TGGT1_213780	-2.92	mitochondrion	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like, Molybdopterin cofactor synthesis protein 1, MOCS1	Molybdopterin synthesis
TGGT1_207620	-1.15	mitochondrion (HyperLOPIT)	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein	Oxidative stress response
TGGT1_249630	1.63	mitochondrion (HyperLOPIT)	glutathione S-transferase domain-containing protein	Oxidative stress response
TGGT1_304660	0.74	mitochondrion (HyperLOPIT)	glutathione S-transferase domain containing protein	Oxidative stress response
TGGT1_255910	1.64	mitochondrion (HyperLOPIT)	NEET family, zinc finger CDGSH-type domain-containing protein	Regulation of iron and reactive oxygen metabolism
TGGT1_260870	0.92	mitochondrion (HyperLOPIT)	NEET family, zinc finger CDGSH-type domain-containing protein	Regulation of iron and reactive oxygen metabolism
TGGT1_204540	-0.22	-	DUF367 domain-containing protein	rRNA biogenesis?
TGGT1_209790	-1.82	mitochondrion (HyperLOPIT)	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like	rRNA methyltransferase
TGGT1_252465	-4.12	mitochondrion	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like	rRNA methyltransferase
TGGT1_238190	-4.42	nucleus (HyperLOPIT)	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_249560	-4.38	-	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_261540	-3.54	nucleus (HyperLOPIT)	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_267390	-5.2	nucleus (HyperLOPIT)	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_313120	-4.48	-	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_216790	-4.11	nucleus (HyperLOPIT)	putative ATP-binding cassette sub-family E member 1	Translation
TGGT1_261060	-1.94	-	diphthamide biosynthesis protein 2-related	Translation
TGGT1_272270	0.41	-	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like, demethylwyosine synthase	tRNA modification
TGGT1_273140	-0.23	apicoplast	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like methylthiotransferase, MiaB/RimO family protein	tRNA modification
TGGT1_305480	-3.28	mitochondrion (HyperLOPIT)	elongator complex protein ELP3	tRNA modification
TGGT1_314000	1.1	nucleus (HyperLOPIT)	putative peptide methionine sulfoxide reductase msrB	tRNA modification
TGGT1_315958	0.66	-	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like, demethylwyosine synthase	tRNA modification
TGGT1_213870	-4.83	cytoplasm (HyperLOPIT)	UBA/TS-N domain-containing protein	Ubiquitin associated

Table S3: Proteins with lower expression upon depletion of TgNFS2 as found by label-free quantitative proteomics.

ToxoDB ID	Uniprot ID	Mito/Cyt (log2)	Apicoplast/Cyt (log2)	Apicoplast/Mito (log2)	moyCtRF-LQ	moyMito-LQ	moyApicoplast-LQ	pvalue (log10)	CRISPR score	Localization	Tz expression	Bz expression	Bz/Tz	Protein	Reference	Cellular function
TGGT1_301180	S7VPV0	-2.68965406990051	-2.68964028358459	-0.00598621973767877	479318250	74604250	742953333.3	1.396378755	1.62	PM - peripheral 1	24.41	27.71	1.135190495669848	SAG-related sequence SRS19F, potentially sporozoite-specific		SRS
TGGT1_410610	S7VX54	0.63675384235382	-1.3603196144104	-1.99679493904114	189356666.7	29436000	737536666.7	1.3087885375	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Protein kinase domain-containing protein		Unknown
TGGT1_313690	S7UJUE	-0.6963630213737488	-1.35542297363281	-0.65679258108139	87798250	54097500	343133333.3	1.4945825151	-4.61	apicoplast	22.68	11.22	0.494708994708995	Sell repeat-containing protein		Unknown
TGGT1_295690	AOA125YN53	-0.851312875747681	-1.279823424243195	-0.428510516881943	68255500	378326666.7	28110750	2.1904745101	-3.62	mitochondrion - membr	15.24	30.36	1.99212598425197	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase UbiE/COQ5. Ubiquinone metabolism		Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_294790	AOA125YP57	0.0454948878778385	-1.01879191398621	-1.06428694725037	1132435000	1168715000	558890000	2.6200735566	-0.59	rhoptries 2	223.84	155.98	0.69837026447462	hypothetical protein		Unknown
TGGT1_257470	S7WFA4	-0.30433646699173	-1.01018738746643	-0.705856740474701	46069750	32886500	20162000	1.5787889957	-3.01	PM - peripheral 2	9.12	4.66	0.51096491280702	Cytoskeleton component, TgMyoI	PMID: 28539398	Basal complex constriction
TGGT1_214140	S7VZ47	-0.334176927804947	-0.868143498897552	-0.53396481685638	83101000	65918750	45527000	1.4082280391	-1.87	nucleus - chromatin	17.3	4.44	0.256647398843931	Part of the AP2IX-4 complex, transcriptionally regulating cell cycle progression	PMID: 32938693	RNA-interacting/regulating
TGGT1_266970	S7UHF3	-0.694063067436218	-0.86726039648056	-0.173197358846664	787715000	486895000	431815000	1.5312969684	0.67	PM - peripheral 2	71.92	9.92	0.137931034482759	Ubiquitin domain-containing protein		Unknown
TGGT1_246630	S7W9K7	-1.11214685440063	-0.862397491931915	0.249749451875687	384143333.3	177706666.7	211293333.3	2.3653180599	-5.32	nucleus - non-chromatin	13.76	9.78	0.710755813953488	DNA-directed RNA polymerase		RNA-interacting/regulating
TGGT1_248290	S7V0K5	0.0490309000015259	-0.858825862407684	-0.907856643199921	53483750	553326666.7	29491000	2.2454454898	-2.75	nucleus - chromatin	6.85	3.04	0.443795620437956	WD domain-containing protein		Unknown
TGGT1_226890	S7WDO2	-0.186314895749092	-0.850665152072906	-0.664350271224976	52035750	45731500	28853333.3	1.4367839097	-4.39	nucleolus	5.16	3.06	0.593023255813953	Putative origin recognition complex subunit-like		DNA repair and replication
TGGT1_258660	AOA125YKf2	0.0850631222128868	-0.806744635105133	-0.891807675361633	1248145000	1323950000	713527500	1.5445125101	0.28	rhoptries 2	651.89	270.27	0.41459448679992	ROP6	PMID: 10634041, 16969065	Unknown
TGGT1_212270	AOA125YX33	-0.195551857352257	-0.804212391376495	-0.608660578727722	747572500	5631237500	427085000	2.6070611476	-3.05	micronemes	199.78	189.69	0.949494443888277	hypothetical protein		Unknown
TGGT1_240690	AOA125YMS1	-0.868883695771729	-0.798904955387115	0.0699787363409996	2131000000	1168872500	1224867500	2.062313363	-4.44	cytosol	87.18	36	0.412938747419133	Methionine adenosyl transferase. Methionine metabolism		Amino acid metabolism
TGGT1_294430	S7UJK2	-0.61689430475235	-0.785761833190917	-0.168867528438568	83244750	542816666.7	48285750	2.327384571	-3.87	nucleolus	9.42	11.23	1.19214437367304	SDA1-like, potentially involved in 60S pre-ribosomal subunits export and maturation		Ribosome biogenesis
TGGT1_267140	S7UHF4	-0.734389245510101	-0.782125234603882	-0.0477358922362328	868610000	520297500	505105000	2.6075961548	0.57	PM - peripheral 1	17.24	3.58	0.207656612529002	SAG-related sequence SRS38B		Tz SRS
TGGT1_289620	S7UPV8	-1.10120224952698	-0.771169424057007	0.330032765865326	496298000	231295000	290747500	2.0623133182	0.95	micronemes	108.52	88.69	0.817268706229267	Cathepsin C	PMID: 17164247	Catabolism/peptidase
TGGT1_271050	AOA125YVU5	0.071548290507088	-0.740416765213013	-0.811965107917786	6727950000	7070025000	4027125000	2.0566582675	1.72	PM - peripheral 1	3261.16	585.01	0.179387089256584	SAG-related sequence SRS34A		Tz SRS
TGGT1_315410	S7ULJ3	0.0838769376277924	-0.701882064342499	-0.785758852958679	503530000	53367500	309555000	2.2269246578	1.35	PM - peripheral 1	2.95	10.29	0.48813559322034	SAG-related sequence SRS53F		Bz SRS
TGGT1_261410	S7W6W5	-0.758374214172363	-0.701039254665375	0.0573350414633751	100997250	59705750	621263333.3	2.8923899991	-2.85	N/A	19.86	20.45	1.02970795569893	Protein-tyrosine-phosphatase		Unknown
TGGT1_265010	S7UHV6	-0.0945443138480186	-0.700915992259979	-0.606371521949768	66189000	61990500	40718250	1.9700314998	-3.17	nucleolus	29.09	25.8	0.886902715709866	Glutamate 5-kinase. Glutamate metabolism		Amino acid metabolism
TGGT1_208970	S7V587	-0.284268468618393	-0.69595812931061	-0.41168737411499	129990000	106673333.3	80191000	1.3997696638	1.96	nucleus - non-chromatin	23.99	29.82	1.24301792413506	RNA recognition motif-containing protein		RNA-interacting/regulating
TGGT1_221970	S7UL52	-0.88796055316925	-0.687617361545563	-0.198821246623993	127580000	90916000	792116666.7	3.063252392	-1.85	N/A	19.28	13.79	0.715248962655602	hypothetical protein		Unknown
TGGT1_293770	AOA125YKR7	-0.191466942429543	-0.672216415405273	-0.480749487876892	843262500	738457500	529182500	2.2028117175	0.7	micronemes	50.45	55.16	1.09335976214073	Chitinase-like protein CLP1		Unknown
TGGT1_225320	S7W5C8	-0.115675926208496	-0.658113658428192	-0.5424377322129696	428065000	395082500	271267500	2.0478825566	0.64	rhoptries 2	99.15	57.64	0.581341401916288	hypothetical protein		Unknown
TGGT1_224970	S7UWG5	-1.148842903979376	-0.639941155910492	0.50890177488327	347763333.3	156836666.7	223173333.3	2.898284888	0	nucleolus	13.52	8.5	0.628698224852071	Nop52 protein-like. Ribosome biogenesis		Ribosome biogenesis
TGGT1_315150	S7ULH3	-0.526183545589447	-0.6305171251297	-0.104333661496639	261640000	181680000	169005000	1.4465186599	-1.99	nucleus - non-chromatin	18.75	15.18	0.8096	Putative eukaryotic initiation factor-4E		RNA-interacting/regulating
TGGT1_254490	S7UNJ37	0.296149671077728	-0.620207071304321	-0.91635674238205	156695000	19400000	101942250	3.1221957208	-3.29	ER	13.44					

Table S3 bis: Proteins with higher expression upon depletion of TgNFS2 as found by label-free quantitative proteomics.

ToxoDB ID	Uniprot ID	Mito/Ctrl [log2]	Apicoplast/Ctrl [log 2]	Apicoplast/Mito [log 2]	moyCtrl-LFQ	moyMito-LFQ	moyApicoplast-LFQ	p value [log10]	CRISPR score	Localization\$	Tz expression#	Bz expression#	Bz/Tz	Protein	Reference	Cellular function
TGGT1_216140	ADA125VUL1	5.34013509750366	5.252341178894	-0.0870007486462593	15598400	631860000	594552500	5.84068965911865		1.75	N/A	139.62	1142.46	8.182638590 ANK1, expressed in Bz, do not participate in differentiation	PMID: 29180989	Unknown
TGGT1_264660	SWP87	3.99079394550554	2.98403120040894	-1.00670805923231	107631333.3	171108250	85157250	2.28895807266235		0.85	dense granules	140.35	725.26	5.167509796 Bz cyst wall protein CST1 (initially annotated as SAG-related sequence SR544)	PMID: 24385904	Bz SR5
TGGT1_303930	SW754	3.42434287071228	1.81320333480835	-1.61113965511322	221577000	227142500	74352750	3.56171208650208		-1.13	dense granules	107.99	243.45	2.54375405 GRA56, higher expression in Bz	PMID: 32374791	Bz GRA
TGGT1_201840	SW458	3.24287166594578	1.76575911045074	-0.57711255503845	143745000	792947500	468817500	2.170340597870862		-0.36	endomembrane vesic	105.67	250.07	2.3665184065 ASP1, VAC-localized, upregulated in Bz	PMID: 25240600, PMID: 32051238	Catabolism/peptidase
TGGT1_225850	SW75H3	1.0085084438324	1.30855822563171	0.300049751996994	85772500	127569250	212465000	1.4137823867798		-5.02	ER	22.66	25.01	1.103706972 M28 metallo peptidase, found in MAGI IP	PMID: 32374791	Catabolism/peptidase
TGGT1_253930	SWN63	4.00861460560562	1.30314433574677	0.894529819488525	141683750	188072500	349627500	2.265517950053067		-0.92	N/A	7.17	34.63	4.8298465826 Glucan 1,3-alpha-glucosidase (GANAB), N-Glycan biosynthesis		Sugar metabolism
TGGT1_249580	SW701	0.85835815760406	1.22133660316467	0.362981051206589	129790666.7	23530666.7	302623333.1	1.7236732444916		0.47	PM - integral	12.36	9.56	0.77462783 General substrate transporter		Channel/transporter
TGGT1_251910	SWJL51	2.09510111880777	1.21168665618896	-0.878114461898804	172292500	543865000	295950000	1.8436723947525		-0.79	dense granules	30.55	38.27	1.254754098 Putative GRA, possibly upregulated in Bz	PMID: 25240600	GRA
TGGT1_257510	SWJZ3	0.36044511189975	1.20049738889372	0.8400552247047424	32134000	924533333	73850000	2.13097953796387		-0.29	ER	86.37	27.49	0.1370881810 Diacylglycerol choline phosphotransferase. Phosphatidylcholine metabolism	PMID: 24423285	Lipid metabolism
TGGT1_233480	SWW8	-0.57498765847931	1.15701198577881	1.73199880123138	137725000	912537500	307120000	2.14660971374561		1.51	PM - peripheral 1	2756.33	211.09	0.0765837185 SAG-related sequence SR529C		Tz SR5
TGGT1_219240	SWJ25	0.724562455729828	1.12648012053906	0.405195366702267	298015000	492427500	650642500	2.9505321502686		1.31	N/A	14.32	25.4	1.77343016 Peptidyl-RNA hydrolase PTH2 domain-containing protein		RNA-interacting/regulating
TGGT1_240860	ADA125WPH8	0.365964740514755	1.05630147457123	0.69037670425415	324402500	418187500	674812500	1.9125760025143		-2.54	ER	54.54	37.93	0.695453878K 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase, AGPAT. Production and recycling of phospholipids		Lipid metabolism
TGGT1_316250	SWJLD1	-1.14098143577576	1.05221843719482	2.19319987297058	165567500	75076750	343340000	2.6481631863403		1.15	dense granules	120.86	75.83	0.6724020555 GRA45, involved in translocation of dense granule effectors. Higher expression in Tz	PMID: 30377279	Tz GRA
TGGT1_215490	SW572	0.0471646934747696	1.03256356716156	0.985398828993307	23275500	24049000	476136666.7	2.96809455223999		-3.91	Golgi	105.57	126.41	1.1974045655 NPT1, Arginine transporter	PMID: 28205520	Channel/transporter
TGGT1_283710	ADA125YW31	0.301033645868301	1.02287518978119	0.72184163319855	225092500	27732000	457380000	1.69656848907471		-1.09	ER	162.1	35.95	0.2217766811 Sphingosine N-acyltransferase. Sphingomyelin metabolism		Lipid metabolism
TGGT1_231000	SWZ88	0.346877008676529	1.01494872570038	0.668071687221527	30495250	38784000	61625750	2.13672828674316		-2.33	Golgi	23.51	14.02	0.5963419821 START domain-containing protein, potentially lipid-binding		Lipid metabolism
TGGT1_247195	SWJ07	0.29553285214127	1.00723934173584	1.71706459522247	177170000	217447500	35612500	1.83478487474121		-3.31	micronemes	46.46	22.43	0.482780886 MIC15		Unknown
TGGT1_315940	SWJ44	0.224215164780617	0.965925693511963	0.741710543632507	4609750	52635000	88014000	1.5616526342343		0.39	ER	17.82	9.89	0.554994388 Putative lipase maturation factor		Lipid metabolism
TGGT1_209800	ADA125VSC6	1.90726515737976	0.965333998203278	-0.941929459571838	165654250	625115000	325395000	2.00076079368591		1.1	PM - integral	30.64	16.54	0.538917322 FNT1-1, PM-localized formate/lactate transporter	PMID: 30237165	Channel/transporter
TGGT1_236890	ADA125YMN9	2.1108283995862	0.945395052433014	-1.16543328762054	154142500	654010000	29157500	4.4221578759766		2.1	dense granules	176.97	187.12	0.05949556 GRA37, expressed in Tz and Bz	PMID: 32374791	GRA
TGGT1_301210	SWJH6	-0.57232382629641	0.94464684931793	0.387324512004852	385626666.7	56746333.3	7422250	1.41358363628387		-1.91	PM - integral	30.77	257.42	1.006007208 Pyridine nucleotide transhydrogenase. Nicotinate and nicotinamide metabolism		NAD/NADP synthesis
TGGT1_216180	ADA125Z87	0.27519413828498	0.93894401728973	0.663749814033508	881020000	1066172500	168902500	1.4417780299315		2.17	ER	280.78	514.06	1.8308284065 hypothetical protein		Unknown
TGGT1_305610	SWJ56	1.5921945718994	0.921490559825897	-0.670214056968688	43113750	129991250	11688250	1.52951931951943		-0.34	N/A	4.32	17.29	4.002314814 hypothetical protein		Unknown
TGGT1_268790	SWJ40	1.78530542420265	0.917925596237183	-0.867379605701111	72217500	248927500	13647500	3.1732035974884		1.63	dense granules	261.86	519.51	1.9839272065 GRA58, higher expression in Bz	PMID: 32374791	Bz GRA
TGGT1_289880	SWJ43	0.2313163173732758	0.88335173732758	0.652036726474761	132787500	155880000	24494500	1.37022057282257		1.8	Golgi	41.79	36.79	0.880354151 Protein with Alpha/Beta hydrolase fold		Unknown
TGGT1_283730	ADA125VSL5	0.110573157668114	0.866523087024689	0.755949914455414	82739000	89327500	150855000	1.73697551921844		-0.78	Golgi	38.83	7.29	1.074174437 Transmembrane 9 superfamily member		Channel/transporter
TGGT1_241820	SWJRK6	0.0394582678035736	0.865349308305736	0.825876777403717	5560000	57141666.7	10129000	2.38077767943		-0.5	Golgi	71.65	59			

Table S4: Proteins with lower expression upon depletion of TgSU1 as found by label-free quantitative proteomics.

ToxoDB ID	Uniprot ID	Mito/Ctrl (log2)	Apicoplast/Ctrl (log 2)	Apicoplast/Mito (log 2)	myoCtrl-LFQ	myoMito-LFQ	myoApicoplast-LFQ	pvalue (-log10)	CRISPR score	Localization	Tz expression#	Rz expression Bz/Tz	Protein	Reference	Cellular function
TGGT1_254030	ADL25VCF1	-3.20579551131553	0.00419202094950617	3.2098753226543	373722500	40505000	374810000	2.9485002168009		-4.26	mitochondrion - membi	531.02	349.75 0.6586380927 TgApCoX3, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_301180	SVWV0	-2.68362408900051	-2.68962408358469	-0.00598621973767877	4793318250	742953333	1.39637857556946			0.55	PM - peripheral 1	24.66	26.32 1.0673154905 SUH19, potentially sporozoite-specific	PMID: 1263875	SRS
TGGT1_215190	ADL25VH7	-2.2319870260139	0.1416160849686	2.3735837084014	150235000	31802500	1657302500	5.027764663501		-5.76	mitochondrion - membi	45.72	5.765 0.3804549450m complex II subunit		Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_316255	SVWME7	-2.1712523666272	0.324630379676819	2.43715286254883	764604250	783547500	4.65032379190063			0.07	mitochondrion - membi	645.83	1526.01 0.362865388C Co-migrates with complex I	Biorxiv DOI: 10.1101/2020.08.17.252163	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_265370	SVWU5	-2.0940749645232	0.554991195401009	2.640007019042497	954185000	223487500	1393075000	1.43905143737792		-4.47	mitochondrion - membi	114.28	99.39 0.869705985 TgApCoX5, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_290980	ADL25VY9	-2.084304571511573	-0.160373404622078	1.92393124103546	205223333	483936667	183632500	3.46541976928711		0.19	ER	34.83	1.54 0.0442147572 Serine C-palmitoyltransferase. Vitamin B6-dependent enzyme, Sphingomyelin and ceramide metabolism		Lipid metabolism
TGGT1_286530	ADL25VG8	-1.86527550220409	0.0910109505057335	1.95628654956818	629220000	172702500	760192500	5.2843155860909		1.15	mitochondrion - membi	184.86	265.78 1.4377366657 TgApCoX4, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_247770	SVWXX4	-1.86514651835632	0.311554878950119	2.17674914210876	210450000	261047500	2.56103450411011			-4.61	mitochondrion - membi	107.49	132.76 1.2350916361 TgApCoX9, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_265470	SVWVC3	-1.8541639928586	0.42652567317009	2.27768989535828	101362500	28089750	136205000	1.64148139953613		0.62	mitochondrion - soluble	17.48	10.38 0.373381294f hypothetical protein		Unknown
TGGT1_299020	SVWU4	-1.7670155844404	0.3623140802355499	2.1365205814991	321050000	94036000	412945000	5.4774699937388		-4.18	mitochondrion - membi	177.4	125.67 0.7803989086 TgApCoX5, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_297810	SVWU8	-1.747068143521047	0.206179112129569	1.9532375515207	235725000	7011952500	2715532000	5.27640674898413		-3.68	mitochondrion - membi	163.47	238.96 1.4617297214 TgApCoX3, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_294980	ADL25VGY1	-1.74661135673523	-0.588016211886542	1.15859508514404	355287500	105876000	236357500	2.3326723575592		-2.67	dense granules	11.71	3.29 0.280556447f hypothetical protein		Unknown
TGGT1_306670	SVWQY2	-1.72716569900513	0.220656126737595	1.94782173633575	1517275000	458285000	176802500	4.03903770466777		1.62	mitochondrion - membi	168.69	251.61 1.4915522552 TgApCoX26, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_264040	SVUUX8	-1.6880595680513	0.244057461619377	1.93211710453033	3286425000	101992500	3892175000	6.47439861297607		-3.64	mitochondrion - membi	174.57	180.69 1.0350557500 TgApCoX25, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_226590	ADL25VNU6	-1.6684707403183	0.329693853855133	1.99816453456879	367723700	304280000	1215557500	5.61110488378		-3.62	mitochondria - soluble	91.53	69.44 0.758658363 TgCoX2a	PMID: 18036550	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_221510	ADL25VP8	-1.63771569728851	0.240047842264175	1.87776350975037	875150000	28142500	103358000	1.3784674072256		2.06	mitochondrion - membi	186.82	64.13 0.343271598f TgApCoX18, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_263630	SVUW8	-1.62379062175751	0.38203230236525	2.00584120414804	81860000	286147500	1149232000	1.4933186237233		-3.87	mitochondrion - membi	188.35	335.67 1.702160807C Co-migrates with complex IV	Biorxiv DOI: 10.1101/2020.08.17.252163	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_262640	SVWU5	-1.58115577597154	0.22647379387413	1.80762958526611	124050000	14592500	145135000	2.953165159027		-4.82	mitochondrion - membi	179.18	157.89 0.88180935f TgApCoX3, component of the cytochrome c oxidase	PMID: 30204084	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_225555	SVWUW2	-1.4954006852829	0.3269930768013	1.82510626316071	360757500	127953750	453382500	4.05697059631348		-0.62	mitochondrion - membi	275.49	600.36 2.179244255f Co-migrates with complex IV	Biorxiv DOI: 10.1101/2020.08.17.252163	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_306670	SVUQY2	-1.32044005273438	-0.0536343790590763	1.26676964759827	1717275000	500807500	1224977500	3.42077708244324		-0.87	mitochondrion	170.11	273.97 1.6105461177 TgCoX6b		Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_209260	ADL25VRQ4	-1.30798065662384	0.161218479275703	1.46919906139374	371095000	149880000	3892175000	5.49456739425659		0.95	mitochondrion - membi	215.73	166.98 0.774023084f TgCoX2b		Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_310470	ADL25VMT4	-1.27982270717621	0.437151610851288	1.71697473763214	140890000	580250000	1907550000	5.0091947408447		-4.04	mitochondrion	241.35	123.68 0.5124507977 TgCoX5b	PMID: 18036550	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_217530	SVWUW6	-1.20679945559369	0.06069642688439	1.81349611282349	113804250	4993250	173297500	1.7010096115692		-4.32	dense granules	36.31	104.6 0.880749104f hypothetical protein		Unknown
TGGT1_224870	SVUW8	-1.140841398510422	0.15086145910492	1.5086145910492	347763333	15688667	223788333	1.4031386237233		-2.85	nucleus - non-chromati	14.94	10.4 0.367150150f NucleoX1-like, believed to be involved in the generation of 28S rRNA	PMID: 30377279	Mitochondrial/regulating
TGGT1_316250	SVUJ1	-1.14086145910492	0.15086145910492	1.05234837139482	105234000	7507500	34334000	2.568135823403		-0.48	dense granules	116.05	70.0 0.2813677638f GH45		RNA-interacting/regulating
TGGT1_262630	SVUHT														

Table S4 bis: Proteins with higher expression upon depletion of TgISU1 as found by label-free quantitative proteomics.

[illegible][illegible]

	\$ inferred from published data or HyperLOPIT prediction - CRISPR Baryluk K et al. Cell Host & Microbe 2016)			
π fitness score data from whole genome screen (Sidik SM et al. Cell 2016)		# RNAseq data from Hehl AB et al BMC Genomics 2015		

Table S5: Common proteins with lower expression upon depletion of TgNFS2 or TgISU1, as found by label-free quantitative proteomics.

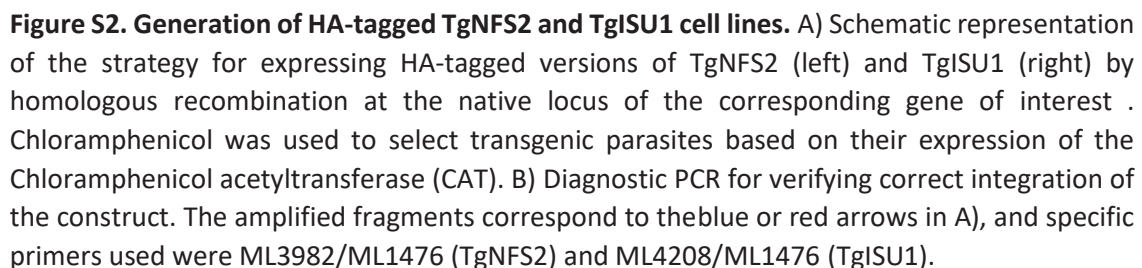
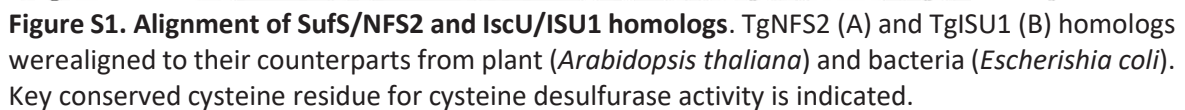
ToxoDB ID	Uniprot ID	Mito/Ctrl (log2)	Apicoplast/Ctrl (log 2)	Apicoplast/Mito (log 2)	moyCtrl-LFQ	moyMito-LFQ	moyApicoplast-LFQ	pvalue (log10)	CRISPR scoreK	Localization\$	Tz expression#	Bz expression#	Bz/Tz	Protein	
TGGT1_301180	S7VPV0	-2.68365406990051	-2.68964028358459	-0.00598621973767877	479318250	74604250	742953333.3	1.39637875556946		1.62 PM - peripheral 1	24.41	27.71	1.1351904954	SAG-related sequence SRS19f, potentially sporozoite-specific	SRS
TGGT1_313690	S7UUI6	-0.698630213737488	-1.35542297363281	-0.65679258108139	87798250	54097500	343133333.3	1.4945582151413		-4.61 apicoplast	22.68	11.22	0.494708994	Sell repeat-containing protein	Unknown
TGGT1_295690	A0A12SVN53	-0.851312875747681	-1.27983242243195	-0.428510516881943	68255500	378326666.7	28110750	2.19047451019287		-3.62 mitochondrion - membranes	15.24	30.36	1.992125894	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase UbiE/COQ5. Ubiquinone metabol	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_266970	S7UHF3	-0.694063067436218	-0.86726039648056	-0.173197358846664	787715000	486895000	431815000	1.53129696846008		0.67 PM - peripheral 2	71.92	9.92	0.137931034	Ubiquitin domain-containing protein	Unknown
TGGT1_246630	S7WIK7	-1.11214685440063	-0.862397491931915	0.249749451875687	384143333.3	177706666.7	211293333.3	2.36531805992126		-5.32 nucleus - non-chromatin	13.76	9.78	0.710755813	DNA-directed RNA polymerase	RNA-interacting/regulating
TGGT1_240690	A0A12SVN51	-0.868883609771729	-0.798904955387115	0.0699787363409996	2131000000	1166872500	1224867500	2.10652613639832		-4.44 cytosol	87.18	36	0.412938747	Methionine adenosyl transferase. Methionine metabolism	Amino acid metabolism
TGGT1_294430	S7UIK2	-0.61689430475235	-0.785761833190917	-0.168867528438568	83244750	542816666.7	48285750	2.32733845710754		-3.87 nucleolus	9.42	11.23	1.192144373	SDA1-like, potentially involved in 60S pre-ribosomal subunits export and maturation	Ribosome biogenesis
TGGT1_267140	S7UHK4	-0.734389245510101	-0.782125234603882	-0.0477358922362328	868610000	522097500	505105000	2.60759615898132		0.57 PM - peripheral 1	17.24	3.58	0.207666612	SAG-related sequence SRS38B	Tz SRS
TGGT1_289620	S7UPV8	-1.10120224952698	-0.771169424057007	0.330032765865326	496205000	231295000	290747500	2.06231331825256		0.95 micronemes	108.52	88.69	0.817268706	Cathepsin C	Catabolism/peptidase
TGGT1_261410	S7WIK5	-0.758374214172363	-0.701039254665375	0.0573350414633751	100997250	59705750	621263333.3	1.92283999919891		-2.85 N/A	19.86	20.45	1.029707955	Protein-tyrosine-phosphatase	Unknown
TGGT1_224970	S7UWG5	-1.14884293079376	-0.639941155910492	0.50890177488327	347763333.3	156836666.7	223173333.3	2.89828848838806		0 nucleolus	13.52	8.5	0.628688224	Nop52 protein-like. Ribosome biogenesis	Ribosome biogenesis
TGGT1_319720	S7UK66	-0.76755887689738	-0.617857038974761	0.149701848626137	55649750	32689250	36263500	2.41169834136963		-4.47 nucleus - chromatin	8.86	1.85	0.208803611	hypothetical protein	Unknown
TGGT1_294980	A0A12SYGY1	-1.74661135673523	-0.588016211986542	1.15859508514404	355287500	105876000	236357500	2.3326723575592		2.06 dense granules	10.47	2.88	0.275071633	hypothetical protein	Unknown
TGGT1_224330	S7WIW24	-0.74552583694458	-0.560373246669769	0.185152485966682	130650000	77926250	88597250	1.87797522544861		0.18 cytosol	35.55	30.44	0.856258790	Proteasome activator pa28 beta subunit	Catabolism/peptidase
No LFQ values in TgNFS2 and TgISU1 mutants, but LFQ values in control															
TGGT1_285860	S7UINY4	0	0	N/A	66018000	0	0	N/A		1.72 PM - peripheral 1	9.39	1.97	0.209797657	SAG-related sequence SRS20C	Tz SRS
TGGT1_272770	S7V3A5	0	0	N/A	23139666.6	0	0	N/A		-4.32 N/A	45.86	46.47	1.013301351	Ltv1 Low temperature viability protein-like motif	Ribosome biogenesis
TGGT1_251410	S7V016	0	0	N/A	16610000	0	0	N/A		0.25 N/A	19.7	6.9	0.350253807	Tetratricopeptide repeat-containing protein	Unknown
TGGT1_275420	S7W518	0	0	N/A	13814666.6	0	0	N/A		-2.47 N/A	26.2	14.09	0.537786259	Histone demethylase (polyamine salvage)	Unknown
TGGT1_255310	S7WIK60	0	0	N/A	9955600	0	0	N/A		0.7 nucleus - non-chromatin	59.36	10.41	0.175370619	CCCH zinc finger-containing hypothetical protein	Unknown
										x fitness score data \$ inferred from (published data or from whole genome HyperLOPIT prediction -Banyluk K CRISPR screen (Sidik et al Cell Host & Microbe 2020)- SM et al. Cell 2016)	# RNAseq data from Hehl AB et al BMC Genomics 2015				

Table S5 bis: Common proteins with higher expression upon depletion of TgNf52 or TgISU1, as found by label-free quantitative proteomics.

Toxodb ID	Uniprot ID	Mito/Ctrl (log2)	Apicoplast/Ctrl (log 2)	Apicoplast/Mito (log 2)	moyCtrl-LFQ	moyMito-LFQ	moyApicoplast-LFQ	pvalue (log10)	CRISPR scorex	Localization\$	Tz expression#	Bz expression#	Bz/Tz	Protein	Reference	
TGGT1_216140	A0A125U1U1	5.34013509759366	5.2523941178894	-0.0878007486462593	1558400	63180200	594552500	5.8406865911865		1.75 cytosol	139.62	1142.46	8.18263859045982	ANK1, expressed in Bz but does not participate in differentiation	PMID: 18061287, 29180899	Unknown
TGGT1_264660	STVP87	3.990739345550164	2.98403120040894	-1.00670802599231	107631333	171108250	85157250	2.28895807266235		0.85 dense granules	140.35	725.26	5.16750879659623	Bz cyst wall protein CST1 (Initially annotated as SAG-related sequence SRS44)	PMID: 24385904	Bz SRS
TGGT1_309930	STW754	3.42434287071228	1.81320333480835	-1.61113865511322	21457700	227442500	74352750	3.56172108650208		-1.13 dense granules	107.99	243.45	2.2543754051301	GRA56, higher expression in Bz	PMID: 32374791	Bz GRA
TGGT1_201840	STUW48	2.34287166595458	1.76575914045074	-0.57711255503845	143747500	73247500	408817500	2.87034058570862		-0.36 VAC	105.67	250.07	2.36651840635942	ASPI, VAC-localized, upregulated in Bz	PMID: 25240600, 30051238	Carabonol/peptidase
TGGT1_236890	A0A125VNW9	2.1108283995682	0.945935052433014	-1.16543328762054	151412500	654010000	29157500	4.42215728759766		2.1 dense granules	176.97	187.42	1.0594955642199	GRA37, expressed in Tz and Bz	PMID: 32374791	GRA
TGGT1_215910	STU1S1	2.09510111808777	1.216966561896	-0.87811446189804	127292500	543865000	295905000	1.8436723947525		-0.79 dense granules	30.5	38.27	1.25475409836066	hypothetical protein, potentially upregulated in Bz	PMID: 25240600	Unknown
TGGT1_249180	A0A125XYX2	1.96048051538386	0.713495067405701	-1.24703538417816	426287500	1659075000	698990000	6.14134836196899		N/A nucleus-non-chromatin	133.2	38.57	0.289564564564565	Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. Folate metabolism. Upregulated in Tz	PMID: 25240600	Folate metabolism
TGGT1_200800	A0A125YSC6	1.90726351737976	0.965323998032028	-0.941929459571838	16664250	625115000	325385000	2.00078079360591		1.1 Golgi	30.64	16.54	0.159812232175979	FNT-1, PM-localized formate/lactate transporter	PMID: 30237165	Channel/transporter
TGGT1_268790	STV4L0	1.78530514240285	0.917935596237183	-0.867379605770111	72217500	248927500	136447500	3.3733635974884		1.63 dense granules	261.86	519.51	1.98392270678989	GRA58, higher expression in Bz	PMID: 32374791	Bz GRA
TGGT1_270240	STW482	1.61908733844757	0.660394430160522	-0.958692967891693	790772500	2429100000	1249827500	3.51634883880615		1.25 dense granules	870.6	2433.61	2.79532506317482	MAG1, cyst matrix antigen, upregulated in Bz	PMID: 7808478	Bz GRA
TGGT1_305610	STU1S6	1.59219455718994	0.921980559805897	-0.670214056968688	43113750	129991250	81688250	1.55395193195343		-0.34 N/A	4.32	17.29	4.00231481481481	hypothetical protein		Unknown
TGGT1_225120	STUW30	1.42969179153442	0.605309188365936	-0.824382662773132	59675750	160760000	90785000	3.48011136054993		0.64 dense granules	192.72	160.82	0.834474885844749	Putative GRA, expressed in Tz and Bz		GRA
TGGT1_251540	A0A125YWK4	1.415295839393969	0.581027448177338	-0.834268450737	722317500	1926525000	108055000	2.8017976284027		1.52 dense granules	252.54	528.97	2.09459887542568	GRA9, higher expression in Bz	PMID: 32374791	Bz GRA
TGGT1_268520	STUVP6	1.14152121543884	0.820777893066406	-0.320743381977081	110010250	242697500	194317500	4.6646327972121		1.9 dense granules	79.49	79.5	1.00012580158767	CST6/GRAS3, cyst wall component but potentially expressed in Tz and Bz	PMID: 32374791	GRA
TGGT1_201630	STW862	1.03427338601159	0.771023631095886	-0.2632494995301056	114534000	234575000	195450000	2.34060287475386		1.63 rhoptries1	53.39	64.24	1.20322157707436	Phosphatase TgPMBH	PMID: 28556455	Unknown
TGGT1_225850	STW5H3	1.0085084483824	1.308538622563171	0.30049751996994	85777250	17569250	212465000	1.41337823867798		-5.02 ER	22.66	25.01	1.10370697263901	M28 metallo peptidase, found in MAG1 P	PMID: 32374791	Carabonol/peptidase
TGGT1_268310	A0A125U1U7	0.99224835634216	0.769039690494537	-0.22320865847778	59250000	117865000	100970000	1.49347734451294		0.69 Golgi	10.6	2.68	0.252830188679245	ABC transporter		Channel/transporter
TGGT1_294200	A0A125YWK6	0.982857286890084	0.556925117969513	-0.423932139158249	157042500	3103750000	231030000	2.26548218727112		1.49 dense granules	213.45	68.69	0.326493323963457	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase. Pentose phosphate pathway. Upregulated in Tz	PMID: 25240600	Pentose phosphate pathway
TGGT1_293810	A0A125Y237	0.956510066986083	0.551496088504791	-0.40501394867897	473395000	918675000	693801000	2.64519810676575		-0.6 cytosol	31.19	160.41	5.1429454953511	Carboxyvinyl- carboxyphosphonate phosphonimutase. Phosphonate and phosphinate metabolism, upregulat	PMID: 25240600	Organophosphorus compound synthesis
TGGT1_249580	STV071	0.858935581760406	1.22133660316467	0.362981051206589	12979666.7	23530666.7	302623333.3	1.7236732444916		0.47 PM-integral	12.36	9.56	0.77346278371521	General substrate transporter	PMID: 25240600	Channel/transporter
TGGT1_275460	STUQV5	0.84938052768707	0.550823330879211	-0.298571920871713	88701000	159815000	129940000	2.84133386611938		2.32 dense granules	63.43	83.31	1.3134163644963	Putative GRA expressed in Tz and Bz	PMID: 25240600	GRA
TGGT1_293470	A0A125Y206	0.748073346002197	0.554047405791957	-0.192025780677795	705282500	1182915000	1035495000	1.73872303962708		1.52 PM-peripheral2	71.69	82.07	1.14479008384984	Immune mapped protein 1, TgIMP1	PMID: 27888074	Unknown
TGGT1_251490	STV032	0.734762012958527	0.652404978717803	-0.0815209597349167	24537250	40833000	385896666.7	1.33415234088998		0.11 nucleus-chromatin	22.45	32.28	1.43786191536748	SOS response associated peptidase (SRAP)		DNA repair and replication
TGGT1_218240	STV235	0.724526345729828	1.12648010253906	0.401953667402267	298015000	49247500	650642500	2.95005321502686		1.31 N/A	14.32	25.4	1.77374301675978	Aminoacyl-tRNA hydrolase		RNA-interacting/regulating
TGGT1_244550	STVNMW7	0.702784597873688	0.556319057941437	-0.146465510129929	42335750	68807500	62255250	1.49713885784149		-0.35 ER	13.19	4.6	0.34874905212358	hypothetical protein		Unknown
TGGT1_292020	STUW15	0.661832749843597	0.724787890911102	0.062955230474472	92529750	146390500	152920000	1.70618069171906		-3.64 micronemes	3.94	3.4	0.862944162436548	GCC2 and GCC3 Tyrosine-protein kinase ephrin type A/B receptor-like		Unknown
TGGT1_224820	STW544	0.635936498641968	0.772736489772797	0.136799976229668	43562000	67693000	74425000	2.03762745857239		0.71 mitochondrion-membranes	16.22	31.56	1.9457499290173	hypothetical protein		Unknown
TGGT1_300350	STVP37	0.604513168334961	0.825931489467621	0.221418380737305	134677500	204772500	238740000	1.65349471569061		0.45 ER	14.27	11.09	0.777154870357393	Cysteine desulfurase. Folate metabolism		Folate metabolism
TGGT1_301210	STUWH6	0.557322382926941	0.944646894931793	0.387324512004852	38562666.7	56746333.3	74222250	1.41338363628387		-1.91 PM-integral	24.97	25.12	1.00600720865038	Pyridine nucleotide transhydrogenase. Nicotinate and nicotinamide metabolism		NAD/NADP synthesis
TGGT1_208370	STU1T6	0.51288843154907	0.690403342474709	0.139114439487457	1300725000	1906075000	2099025000	1.83155822753906		1.79 dense granules	46.22	127.59	2.76049329294678	GRA46, higher expression in Bz	PMID: 30372729	Bz GRA
No LFQ values in control, but LFQ values in TgNf52 and TgISU1 mutants																
TGGT1_224190	STUVS1	N/A	N/A	-0.11271425367	0	20276333.3	21924000	N/A		-5.24 Golgi	46.22	11.84	0.256166161837404	Lipid flippase TgFLP2	BioRxiv: 10.1101/2020.06.19.160341	Lipid metabolism
TGGT1_317705	STUFF2	N/A	N/A	-0.75161181616	0	26330333.3	44331666.6	N/A		-0.45 N/A	103.44	104.55	1.01073085946868	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein		Lipid metabolism
TGGT1_261650	STUV15	N/A	N/A	0.20880937503	0	57346750	49619333.3	N/A		1.61 PM - peripheral 2	110.47	389.39	3.52484837512447	Cyst wall protein TgCST4	PMID: 31040239	Bz cyst wall protein
										α fitness score data from whole genome CRISPR screen (Sidik Barylyuk K et al Cell Host & SM et al. Cell 2016)	\$ inferred from (published data from whole genome CRISPR screen (Sidik Barylyuk K et al Cell Host & SM et al. Cell 2016)	# RNAseq data from Hehl AB et al BMC Genomics 2015				

Table S6. Oligonucleotides used in this study.

Primer name	Primer sequence
ML687	GTTTGAATGCAAGGTTTCGTGCTGTCTG
ML841	ATGTTCCGTGGTCGCATGT
ML842	TTCATGTTGTTGGGAATCCAC
ML843	GCGCGACATCAAGGAGAAGC
ML844	CATCGGGCAATTCATAGGAC
ML1041	CGGATCATTGAAAACATCGTGAGGCTGG
ML1476	CAGCGTAGTCCGGGACGTCGTAC
ML1771	CTGCTTTCGTCTGTCTTC
ML1774	TACGACTCACTATAGGGC
ML2087	AAGTGCTCCCACGTCCCTCACCAT
ML2088	AAAAATGGTGAGGGACGTGGGAGC
ML2866	CGTTCATTGAAACAAGGAC
ML3445	aagtCAGGGCTTCTAAAATGGCGC
ML3446	aaaaGCGCCATTTTAGAAGCCCTG
ML3948	aagtGCATCGTGCTGGCGTGGAATG
ML3949	aaaaCATTCCACGCCAGCACGATGC
ML3978	GTAGGCGCGCTGAAAATTTACAAAGCAGCTACCCGTACGACGTCC
ML3979	CTCCGAATATGCCGCCGATAAACGCTGCTTCTAGAACTAGTGATCCCC
ML3982	CCAGCCAGGTTTGAGGCAGGAAC
ML4012	GCCGGATCCCTAGCTGCTTTGTA
ML4023	CTGCTGCGAGTGCGGACAAGGGCAAAGTCTACCCGTACGACGTCC
ML4101	CTCTCCTGGATAATCAGCTCGAGG
ML4154	TTGTGTGTCAGCGGTGGCTTTGCGTGCTTCCCAAGCTTCGCCAGGCTGTA
ML4155	GAGAAGGAAGGCAACGGCGCCAGAAGCCATAGATCTGGTTGAAGACAGAC
ML4156	aagtGAAGATGCCCTGGAAGAACCG
ML4157	aaaaCGGTTCTTCCAGGGCATCTTC
ML4158	GTTGACGAGATGTTTCCGCG
ML4159	GTAAGCCTCGGCTCCTCG
ML4160	aagtGTTTTCCCAGAGTACAGTTG
ML4161	aaaaCAACTGTACTCTGGGGAAAAC
ML4162	TACACGTTCTGCGTCTTTGCCTTGTCTCGCTCTAGAACTAGTGATCCCC
ML4201	GCCAAGCTTCATGAAAGAACAGGACGAAATG
ML4204	CTTGCATGCAATGCGACGGTACAGCAAAAAAG
ML4205	CGGGGATCCTTAGGTTGTCTTCTGCTTC
ML4208	TACTTCCAATCCAATTTAATGCGCAAGACATGCGATGACGCCC
ML4209	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCCTGGGCAGGTGCAGCGGATGC
ML4212	TTTAGATCTATGGCGCTGACACGCG
ML4213	TTTGCGGCCGCCACATCGCTGCATCTTTC
ML4387	GAGGACCTCAAAAGCTAG
ML4388	TCAGAACTGCGGGCAATC
ML4455	TTTAGATCTATGGCGCTGACACGCGTTC
ML4456	tttCCTAGGCTGGGCAGGTGCAGCGGATG
ML4576	TTGAATTCATGGCTTCTGGCGCCGTTG
ML4577	gggGCTAGCGCTGCTTTGTAAATTTTTCAG
ML4684	GAGACTAGGTCCAAGGTC
ML4685	TTGATGAGTTCCGTGGCG
ML4686	TCGAGCAGCGTATGCAAG
ML4687	GCGACAAGATTGATAACGTC
ML4984	aagtGCATGGTTAATTCCTCATGGA
ML4985	aaaaTCCATGGGAATTAACCATGC
ML4986	aagtGACCTCGGCTCGCCGTACACT
ML4987	aaaaAGTGACGCGAGCCGAGGTC
ML5006	ACGGCACTCACTTGTGGG
ML5013	TGCGTTTGTCTCTAGCAC
ML5114	GGCGTCGCCTCCACGTACCTGATGCATGGTTACCCGTACGACGTCCCGGA
ML5115	AACCGGGTGAGAGACCACAGGGCCTACCGGCGCCGCTCTAGAACTAG
ML5116	AAGCTCGCGAAGGACCTTGGCCTCGCTGCGTACCCGTACGACGTCCCGGA
ML5117	GGCATGCCTAGGTCCCCACATCGACTGCTCGGCGCCGCTCTAGAACTAG



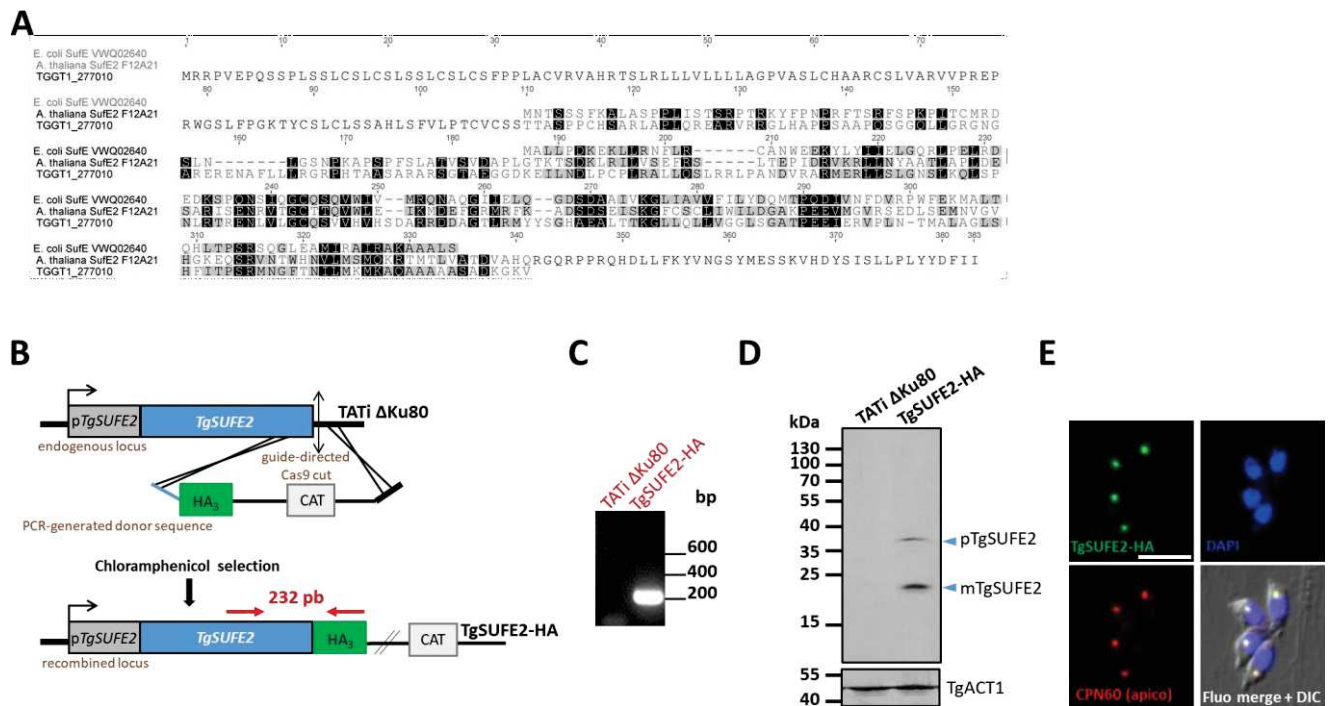


Figure S3. HA-tagging of TgSUF2 shows it is an apicoplast protein. A) Sequence alignment of TgSUF2 (TGGT1_277010) with plant (*A. thaliana*) and bacterial (*E. coli*) homologues. B) Schematic representation of the strategy for expressing an HA-tagged version of TgSUF2 by double homologous recombination at the native locus. Chloramphenicol was used to select transgenic parasites based on their expression of the Chloramphenicol acetyltransferase (CAT). C) Diagnostic PCR for verifying correct integration of the construct. The amplified fragment corresponds to the red arrows in B), and specific primers used were ML4101/ML1476. D) Detection by immunoblot of C-terminally HA-tagged TgSUF2 in parasite extracts reveals the presence of both precursor and mature forms of the protein. Anti-actin antibody (TgACT1) was used as a loading control. E) Immunofluorescence assay shows TgSUF2 co-localizes with apicoplast marker TgCPN60. Scale bar represents 5 μ m. DNA was labelled with DAPI. DIC: differential interference contrast.

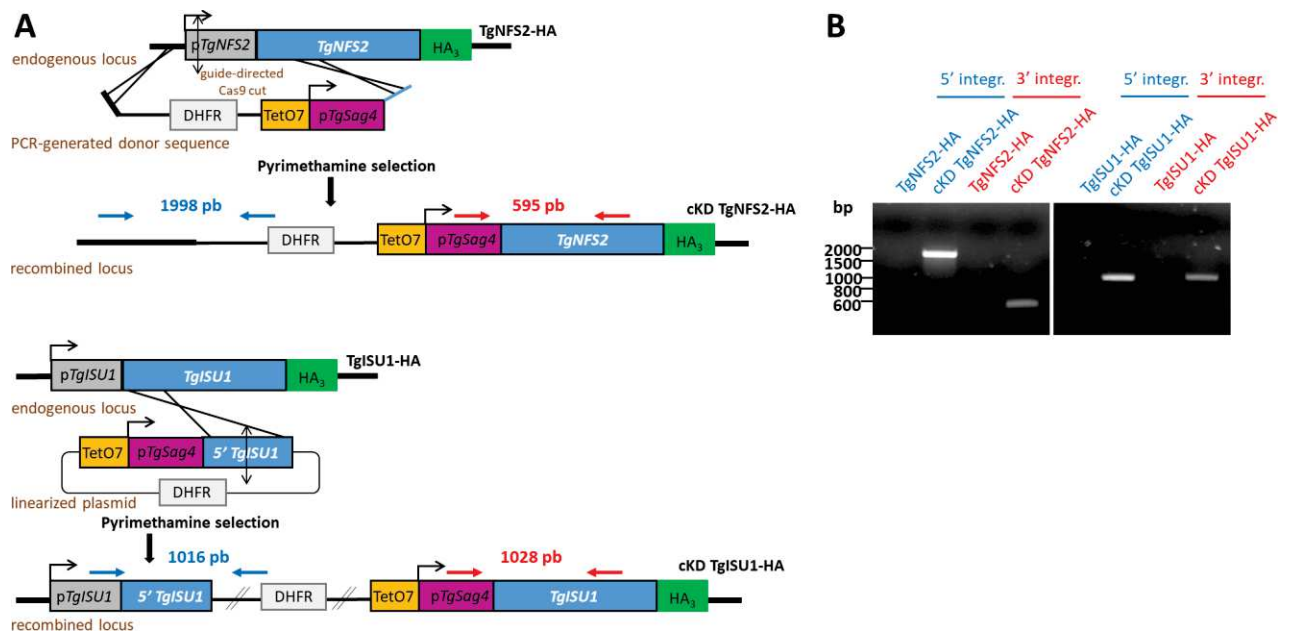


Figure S4. Generation of TgNFS2 and TgISU1 conditional mutants. A) Schematic representation of the strategy for generating TgNFS2 (top) and TgISU1 (bottom) conditional knock-down cell lines by homologous recombination at the native locus. Pyrimethamine was used to select transgenic parasites based on their expression of Dihydrofolate reductase (DHFR). B) Diagnostic PCR for verifying correct integration of the construct. The amplified fragments confirming 5' and 3' integration correspond to the blue and red arrows displayed in A), respectively, and specific primers used were: ML4158/ML687 (TgNFS2 5' integration), ML1041/ML4159 (TgNFS2 3' integration), ML1774/ML4388 (TgISU1 5' integration), ML1771/ML4387 (TgISU1 3' integration).

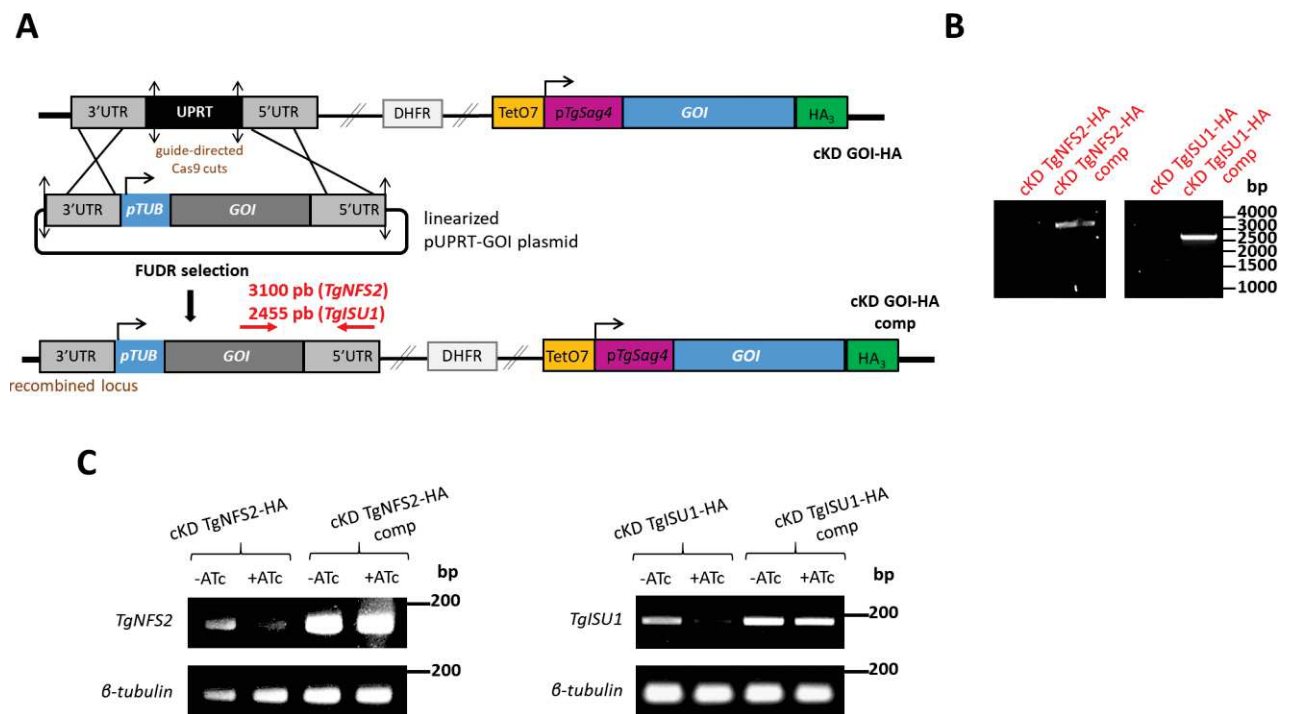


Figure S5. Generation of *TgNFS2* and *TgISU1* complemented cell lines. A) Schematic representation of the strategy for generating *TgNFS2* and *TgISU1* complemented cell lines by integrating an extra copy of the gene of interest (GOI) by double homologous recombination at the *Uracil Phosphoribosyltransferase* (UPRT) locus. Negative selection with 5-fluorodeoxyuridine (FUDR) was used to select transgenic parasites based on their absence of UPRT expression. B) Diagnostic PCR for verifying correct integration of the construct.

The amplified fragments confirming integration correspond to the red arrows displayed in A), and specific primers used were: ML2866/ML4686 (*TgNFS2* integration), ML2866/ML4455 (*TgISU1* 5' integration). C) Semi-quantitative RT-PCR analysis from cKD *TgNFS2*-HA, cKD *TgISU1*-HA and their respective complemented cell lines grown for three days in the presence or absence of ATc, using specific primers couples ML4686/ML4687 (*TgNFS2*) and ML4684/ML4685 (*TgISU1*). It shows complemented cell lines express high levels of the corresponding mRNA. Specific β -tubulin primers (ML841/ML842) were used as controls.

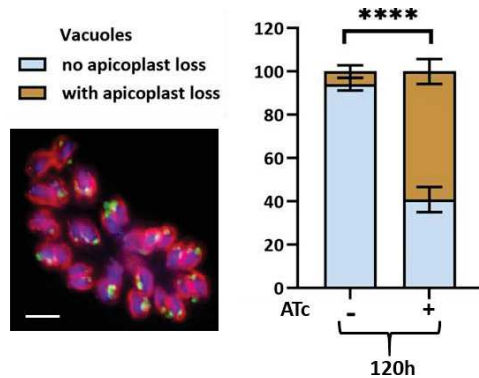


Figure S6. Quantification of apicoplast loss upon TgNFS2 depletion using streptavidin. Percentage of cKD TgNFS2-HA parasites-containing vacuoles displaying a loss of apicoplast signal when labeled with streptavidin-Fluorescein Isothiocyanate after culture in the presence or absence of ATc for 120 hours. Data are mean values from $n=3$ independent experiments $\pm$ SEM. **** $p \leq 0.0001$, Student's t -test. Inset : typical streptavidin labeling of the apicoplast (green) in a tachyzoites-containing vacuole, the inner membrane complex was stained with anti-TgIMC3 (red) and the DNA with DAPI (blue); scale bar=5 μ m.

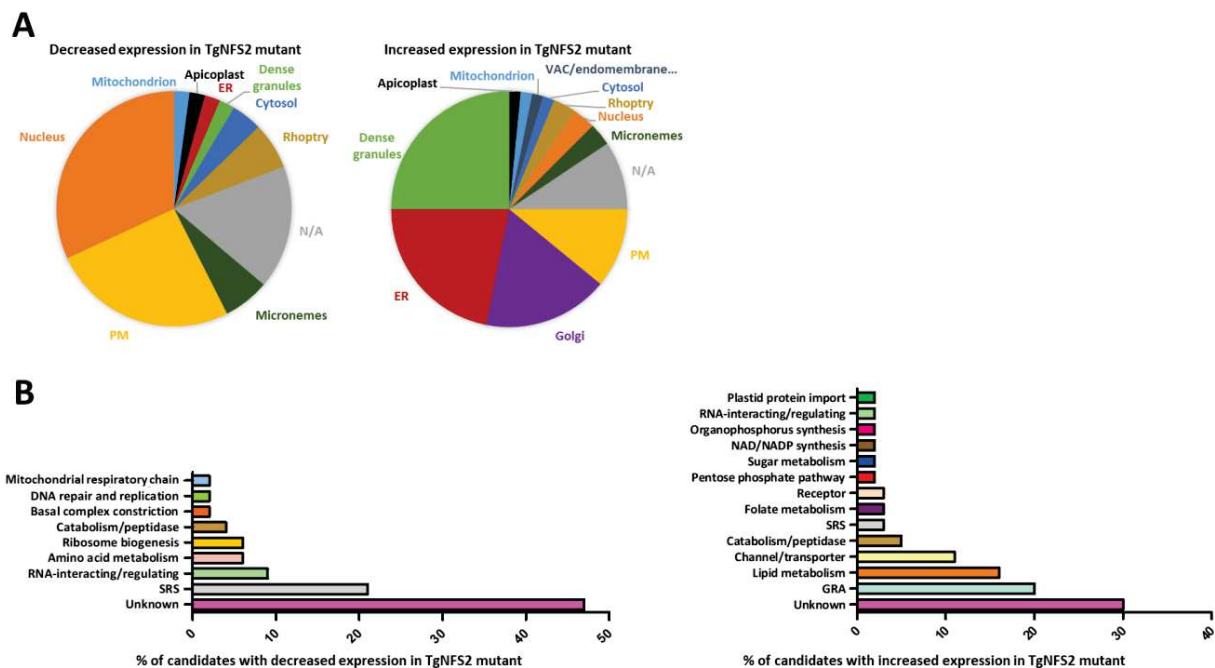


Figure S7. Quantitative proteomics shows depletion of TgNFS2 does not have a global impact on the apicoplast, but may suggest compensatory response from other cellular pathways in response to specific apicoplast-related lipid synthesis defects. Classification of variant proteins according to their putative cellular localization (A) and function (B). N/A: not available; ER: endoplasmic reticulum; PM: plasma membrane; VAC: vacuolar compartment; GRA: dense granule protein; SRS: SAG-related sequence. In particular, the increased expression of ER-located lipid metabolism enzymes suggests possible compensation for loss of apicoplast-related lipid synthesis function.

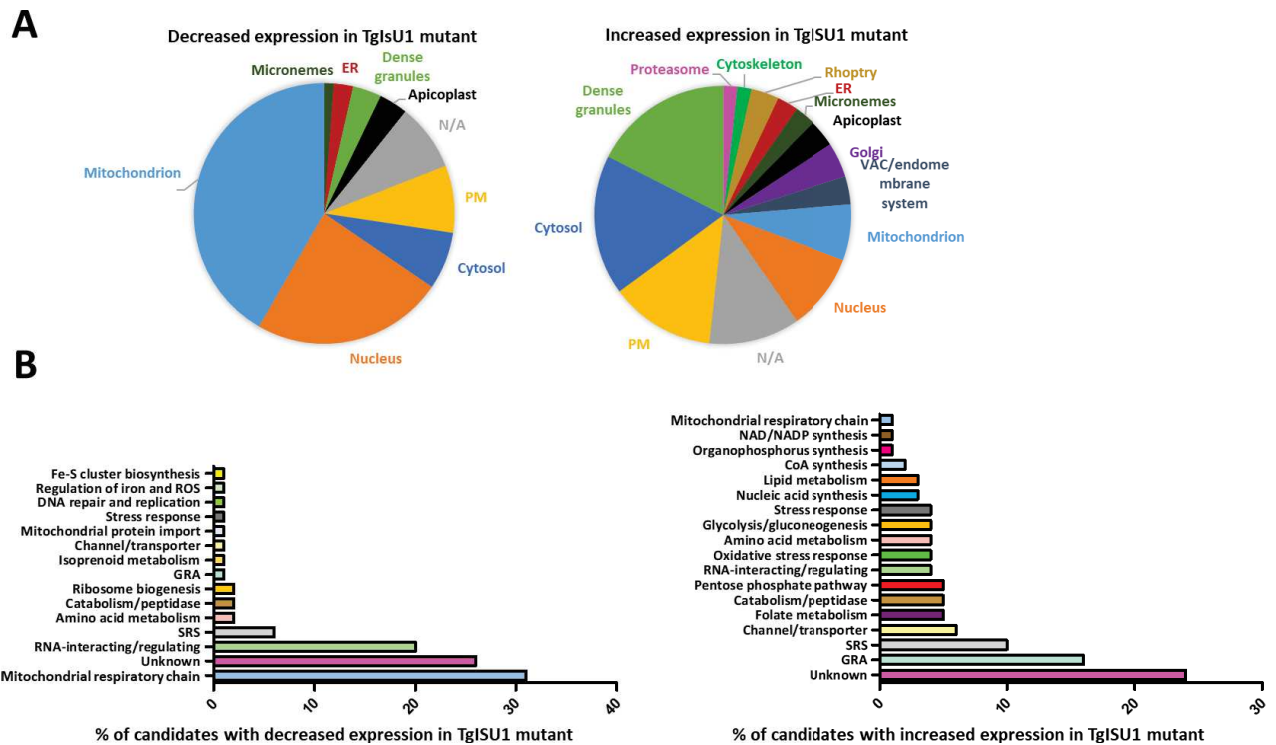


Figure S8. TgISU1-depleted parasites show a marked decrease in proteins related to mitochondrial respiration, and a strong increase in bradyzoite-specific dense granules proteins and surface antigens. Classification of variant proteins according to their putative cellular localization (A) and function (B). N/A: not available; ER: endoplasmic reticulum; PM: plasma membrane; VAC: vacuolar compartment; GRA: densegranule protein; SRS: SAG-related sequence. A large proportion of components of complexes II, III and IV of the mitochondrial respiratory chain, which involve Fe-S proteins, were found to be less abundant.

Conversely, the abundance of many bradyzoite-specific dense granule proteins of plasma membrane-located surface antigens increased.

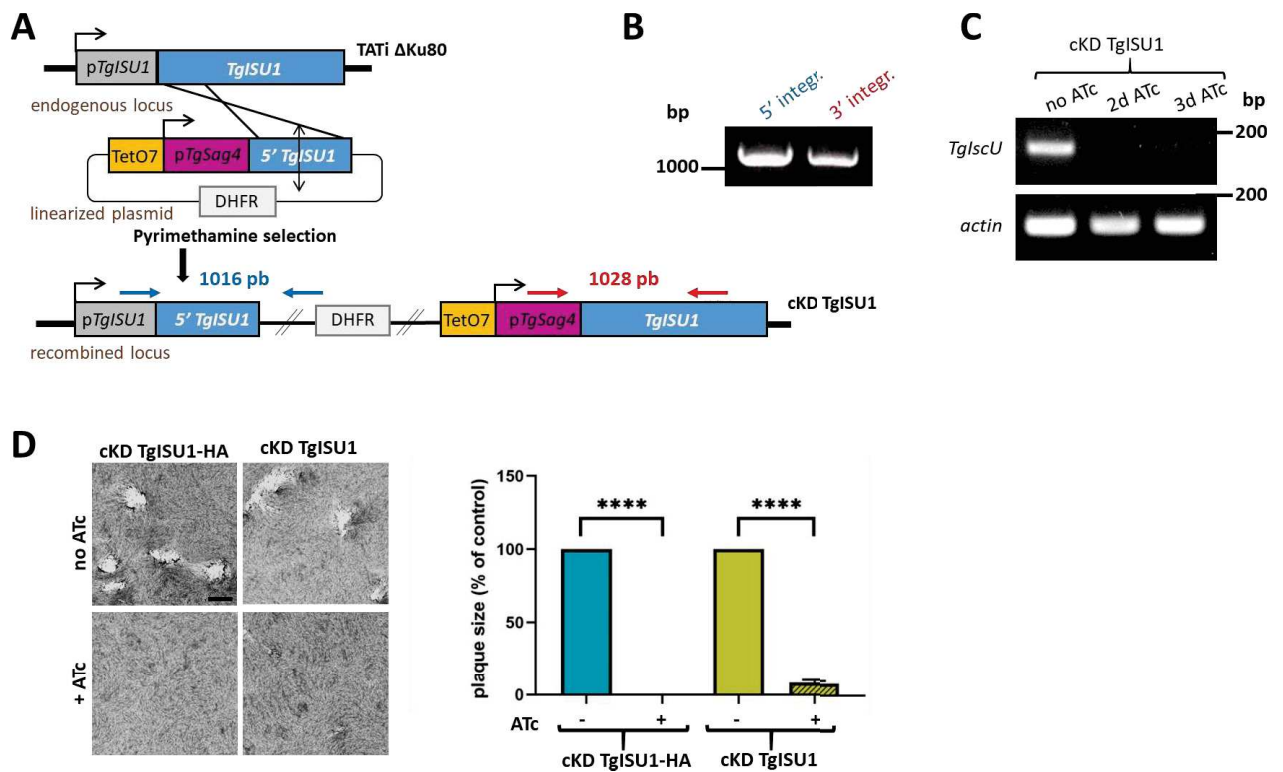


Figure S9. Generation of a tag-free cKD TgISU1 cell line. A) Schematic representation of the strategy for generating the conditional knock-down cell line by homologous recombination at the native locus.

Pyrimethamine was used to select transgenic parasites based on their expression of Dihydrofolate reductase (DHFR). B) Diagnostic PCR for verifying correct integration of the construct. The amplified fragments confirming 5' and 3' integration correspond to the blue and red arrows displayed in A), respectively, and specific primers used were ML1774/ML4388 (5' integration), and ML1771/ML4387 (3' integration). C) Semi-quantitative RT-PCR analysis of the cKD TgISU1 cell line grown for up to three days in the presence or absence of ATc, using specific primers couple ML4684/ML4685, showing efficient down-regulation of *TgISU1* expression. Specific *actin* primers (ML843/ML844) were used as controls. D) Plaque assays were carried out by infecting HFF monolayers with the newly generated cKD TgISU1 cell line or the original cKD TgISU1-HA mutant cell line as a control. They were grown for 7 days ± ATc. Measurements of lysis plaque areas are shown on the right and confirm a significant defect in the lytic cycle in the two mutant cell lines upon ATc addition. Values are means of n=3 experiments ± SEM. **** denotes $p \leq 0.0001$, ANOVA. Scale bar = 1mm.

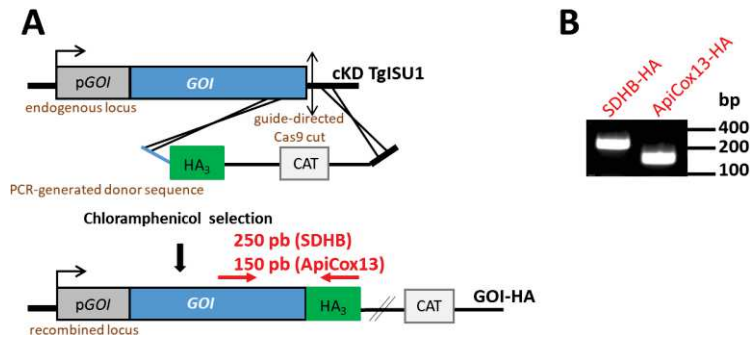


Figure S10. Tagging of mitochondrial candidates in the cKD TgISU1 background. A) Schematic representation of the strategy for expressing HA-tagged versions of TgSDHB and TgApiCox13 by homologous recombination at the native locus of the corresponding gene of interest. Chloramphenicol was used to select transgenic parasites based on their expression of the Chloramphenicol acetyltransferase (CAT). B) Diagnostic PCR for verifying correct integration of the construct. The amplified fragment corresponds to the red arrows in A), and specific primers used were ML1476/ML5013 (TgSDHB), ML1476/ML5006 (TgApiCox13).

C. Conclusions et perspectives

Dans cette étude, nous avons mis en évidence la présence de voies de biosynthèse des protéines fer-soufre au sein de la mitochondrie (ISC) et de l'apicoplaste (SUF) de *T. gondii*. Nous avons aussi découvert qu'impacter ces voies par dérégulation d'une de leurs protéines clés (TgSufS pour la voie plastidique et TgIscU pour la voie mitochondriale), mène à une perturbation du cycle replicatif du parasite. Cependant, la dérégulation de ces protéines n'aboutit pas à des phénotypes équivalents.

Ainsi, la protéine SufS est essentielle à la survie du parasite. En effet, sa déplétion semble entraîner une perte de l'apicoplaste, quoi que partielle et tardive, ainsi que des défauts visibles et irréversibles dans le cycle replicatif du parasite jusqu'à engendrer la mort. La perturbation de la cystéine désulfurase SufS semble impacter directement la voie de biosynthèse des protéines à centres [Fe-S] de l'apicoplaste. Nous avons par exemple démontré que LipA, une protéine responsable de la lipoylation de la sous-unité E2 de la pyruvate déshydrogénase (PDH) plastidique n'était plus fonctionnelle. Etant donnée l'importance de la PDH pour la voie de synthèse de l'acétyl coA, qui est notamment un précurseur important de la synthèse des acides gras, on peut supposer que cela peut conduire à de graves dysfonctionnements métaboliques, notamment par rapport au maintien de l'homéostasie lipidique du parasite.

A contrario, perturber l'expression de la protéine d'assemblage IscU n'engendre pas de phénotype particulier visible au niveau subcellulaire, mais ralentit la croissance de façon réversible. Nous avons montré que la capacité respiratoire des parasites est fortement impactée, ce qui peut être expliqué par le fait que trois protéines à centres [Fe-S] font partie des complexes II, III et IV, (sous-unité Fe-S du complexe succinate déshydrogénase, protéine Rieske et TgApiCox13). L'analyse de protéomique quantitative a démontré que trois protéines à centres [Fe-S], respectivement des complexes II, III et IV, ainsi que la plupart des composants des complexes III et IV sont spécifiquement impactés par la perte d'IscU. Comme l'ont montré d'autres études^{85,199} réalisées sur *T. gondii*, la déplétion d'un membre d'un complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale peut entraîner une altération dans l'assemblage ou la stabilité du complexe. De façon intéressante, l'analyse protéomique a également suggéré que la perte de la capacité respiratoire pourrait être compensée par une augmentation de la capacité glycolytique des parasites pour générer de l'ATP. Par conséquent, contrairement à ce que l'on observe pour le mutant SufS, le stress métabolique subi par les parasites n'est pas léthal et semble déclencher un processus de différenciation, identifié à l'aide de marqueurs spécifiques ainsi que par l'analyse protéomique. Comme mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, les formes tachyzoïtes de *T. gondii* ont la capacité de se différencier en formes bradyzoïtes, qui ont une croissance ralentie et sont contenues dans des kystes pouvant persister et survivre dans des conditions défavorables. Cette capacité à former des kystes diffère en fonction des souches et en l'occurrence le mutant IscU a été

généré dans une souche de type I qui est peu propice à la différenciation. Il est donc particulièrement marquant de voir que la perte d'IscU entraîne une différenciation spontanée dans ce contexte. La question est maintenant de savoir si ce phénomène est général pour les mutants métaboliques mitochondriaux, ou spécifique au mutant IscU. De plus, il est nécessaire de garder à l'esprit que la voie mitochondriale de synthèse des centres [Fe-S] est importante également pour la fonction de protéines [Fe-S] cytoplasmiques et nucléaires, dont certaines pourraient jouer un rôle dans le déclenchement de la différenciation.

Il reste donc de nombreuses inconnues concernant le fonctionnement et l'impact de ces deux voies de biosynthèses. Le stress engendré par la perturbation de la voie mitochondriale nécessite d'être étudié de façon approfondie afin de comprendre les mécanismes moléculaires qui sont impliqués. De plus, le mutant IscU pourrait être un bon modèle pour identifier de nouveaux facteurs de différenciation.

De même, une meilleure compréhension de l'implication de la voie SUF sur le fonctionnement des voies métaboliques importantes de l'apicoplaste pourrait ouvrir des perspectives intéressantes pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques anti-parasitaires.

De ce point de vue, comme décrit dans le chapitre suivant, nous avons cherché à mieux caractériser les perturbations métaboliques liées à la perte de la voie SUF. Pour cela, nous avons généré un nouveau mutant pour cette voie afin de l'analyser en détail en parallèle du mutant SufS.

Chapitre II : Caractérisation de l'ATPase SufC

A. Conservation de la fonction ATPase au cours de l'évolution.

Comme vu dans l'introduction de ce manuscrit, les protéines d'assemblage telles que IscU ou le complexe SufB/C/D, permettent l'interaction du fer et du soufre afin de former le centre [Fe-S]. Notre analyse bio-informatique a permis d'identifier une ATPase putative potentiellement homologue de SufC (TGGT1_225800). La protéine putative SufC de *T. gondii* est prédite comme étant plastidique à 95% d'après l'algorithme Deeploc V1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>). Par rapport à la SufC bactérienne, la protéine de *T. gondii* possède une extension en N-terminale (**Figure 26**) qui comporte probablement la séquence d'adressage au plaste ainsi qu'une extension C-terminale riche en acides aminés chargés (D, E, R) dont la fonction reste inconnue.

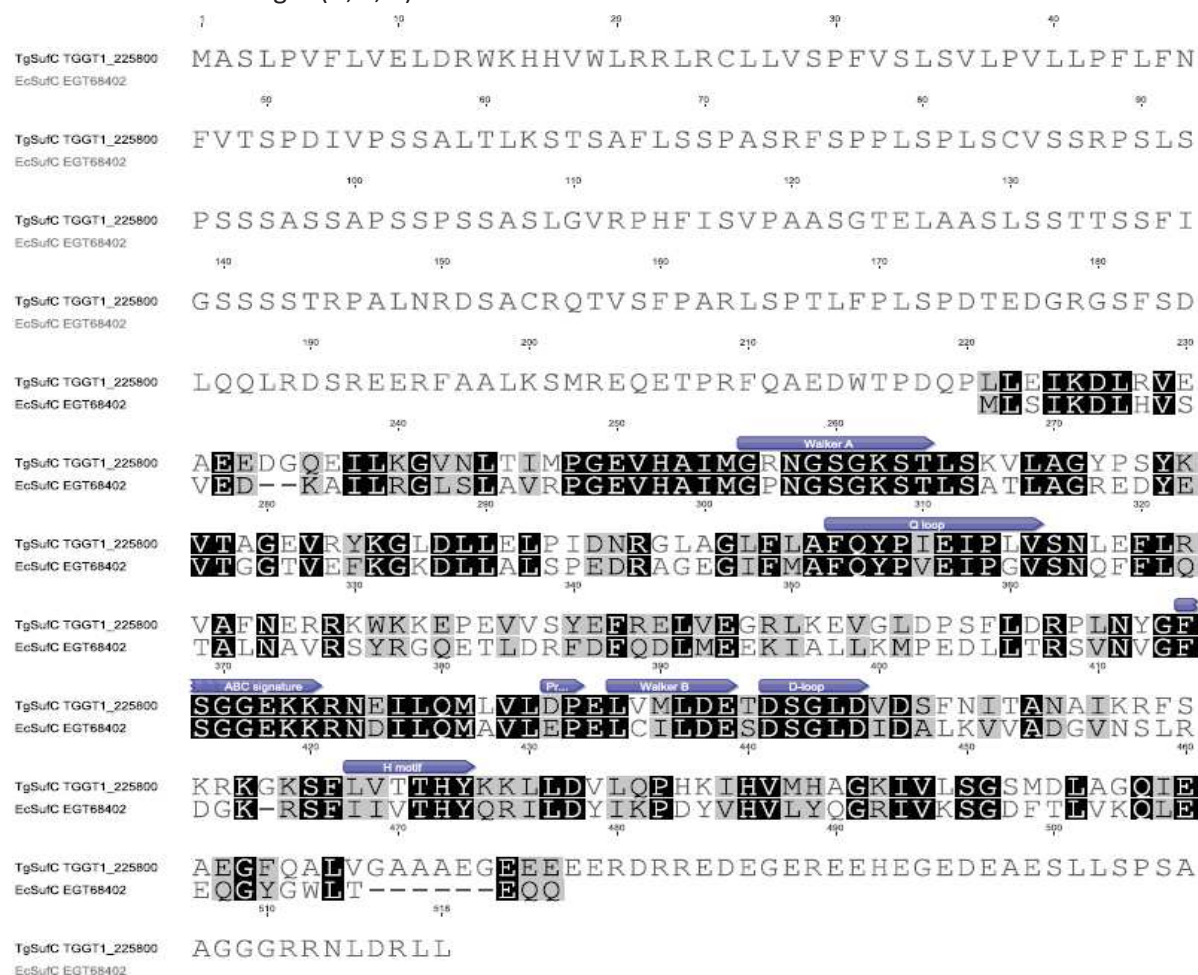


Figure 26: Alignement de séquences codant pour l'ATPase SufC de *E. coli* ainsi que son homologue putatif chez *T. gondii*

Walker A : domaine catalytique de liaison aux nucléotides permettant l'hydrolyse de l'ATP ; Q loop et motif H : motifs catalysant l'hydrolyse de l'ATP ; ABC signature : motif représentatif des transporteurs de la famille ABC (ATP-binding-cassette) ; Walker B : domaine d'hydrolyse de l'ATP contenant un aspartate pouvant interagir avec du magnésium ; D loop : boucle participant au contrôle de l'hydrolyse de l'ATP.

Dans un premier temps, afin de vérifier la fonction de cette protéine candidate, nous avons effectué la complémentation d'un mutant bactérien de *E. coli* avec la séquence codant pour le domaine fonctionnel de la protéine putative TgSufC (acides aminés 220 à 518). Les cinétiques de croissance bactériennes ont été réalisées dans un milieu minimum en présence de différentes concentrations en chélateur de fer (2,2'-bipyridyl). L'expression du domaine ATPase a permis de restaurer la croissance bactérienne que cela soit en présence ou non de chélateur. Cela suggère que TGGT1_225800 (que nous appelons désormais TgSufC), n'est pas uniquement similaire par sa séquence mais bien un homologue fonctionnel de SufC (**Figure 27**).

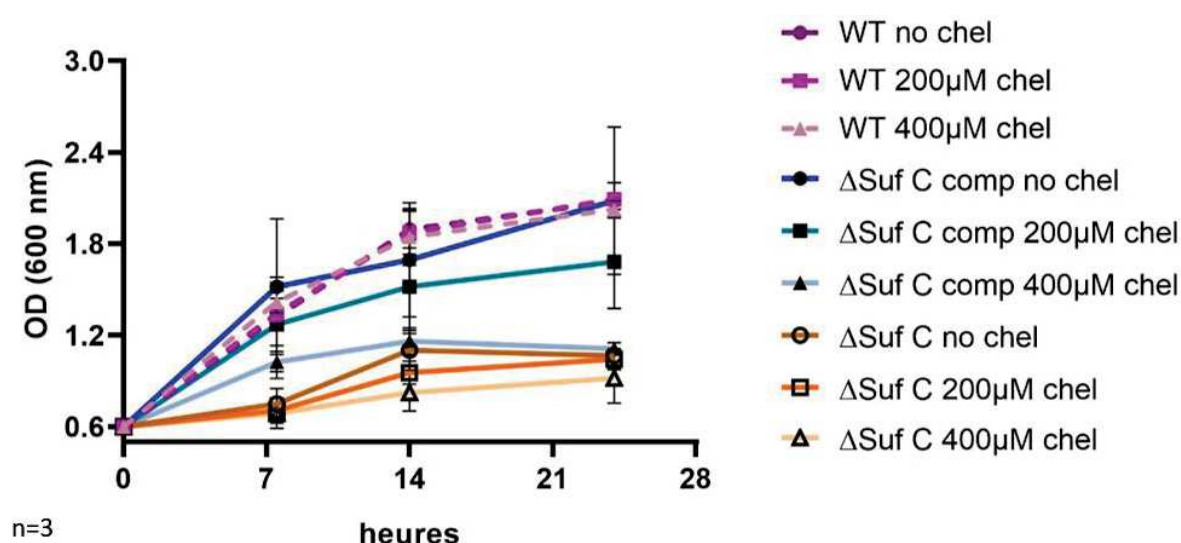


Figure 27: Cinétique de croissance des bactéries *E. coli* mutantes et complémentées.

WT : souche de *E. coli* K12 ; Δ SufC : souche bactérienne K12 délétée en SufC ; Δ SufC comp : souche mutante complémentée ; chel (chélateur de fer) : 2,2'-bipyridyl.

B. Localisation et impact sur le cycle lytique de *T. gondii*.

1) Localisation de la protéine TgSufC

Afin de commencer à caractériser cette protéine nous avons voulu déterminer sa localisation pour vérifier si elle était adressée à l'apicoplaste. Aude Cerutti, la post-doctorante de l'équipe, a généré une souche transgénique dans laquelle une séquence codant pour une étiquette triple hémagglutinine (HA) a été insérée en 3' du gène (**Figure 28 A**). L'intégration de la construction a été vérifiée par PCR (**Figure 28 B**). Par microscopie en immunofluorescence, à l'aide d'anticorps anti-HA, nous avons pu confirmer la localisation de TgSufC à l'apicoplaste (**Figure 28 C**).

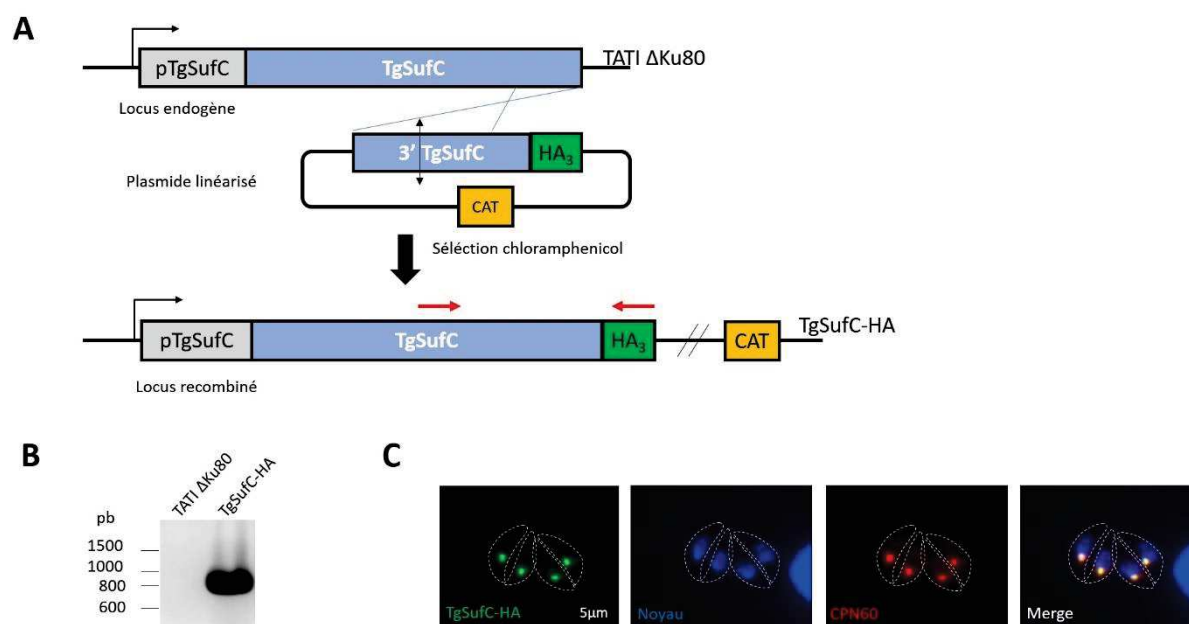


Figure 28: Génération d'un mutant *TgSufC* étiqueté triple HA

A : schéma représentant la stratégie pour obtenir une protéine *TgSufC* exprimant un triple tag Ha en C-term par recombinaison homologue au locus natif du gène d'intérêt. Sélection des parasites transgéniques positifs par chloramphénicol acétyltransférase (CAT). **B** : PCR diagnostic afin de vérifier intégration de la construction, avec un fragment correspondant aux flèches rouges en (A) de 923 pb amplifié avec les amorces ML3984 et ML1476. **C** : Immunofluorescence de vérification de l'expression et de la localisation de la protéine étiquetée *TgSufC*-HA

2) Génèse d'un mutant conditionnel de *TgSufC*

Nous avons démontré précédemment que perturber la biogénèse des protéines à centres [Fe-S] en diminuant drastiquement l'expression de la cystéine désulfurase *TgSufS* induit un défaut dans le cycle lytique de parasite. Nous nous sommes alors demandé si perturber l'expression de *TgSufC* impacterait de façon similaire le développement du parasite.

Nous avons entrepris de générer un mutant conditionnel en remplaçant le promoteur natif par un promoteur SAG4 régulable par l'anhydrotétracycline (ATc) (**Figure 29 A**). Dans cette souche (ckDSufC), qui a été générée par la post-doctorante Aude Cerutti, le remplacement de promoteur a été vérifié par PCR (**Figure 29 B**).

Par la suite, des immunoblots nous ont permis de vérifier la régulation de l'expression de la protéine. Avant le remplacement du promoteur, nous avons pu voir que deux produits sont détectés. Ils correspondent très probablement à la forme précurseur (à ~50kDa, avant le clivage de peptide transit) ainsi qu'à la forme mature (à 38kDa) présent dans la matrice de l'apicoplaste (**Figure 29 C**). De plus, notre lignée étant taguée HA, une analyse par immunofluorescence nous a permis de vérifier la bonne régulation, par ajout ou non d'ATc, du marquage HA en C-terminal de notre protéine d'intérêt *TgSufC* (**Figures 29 C et D**).

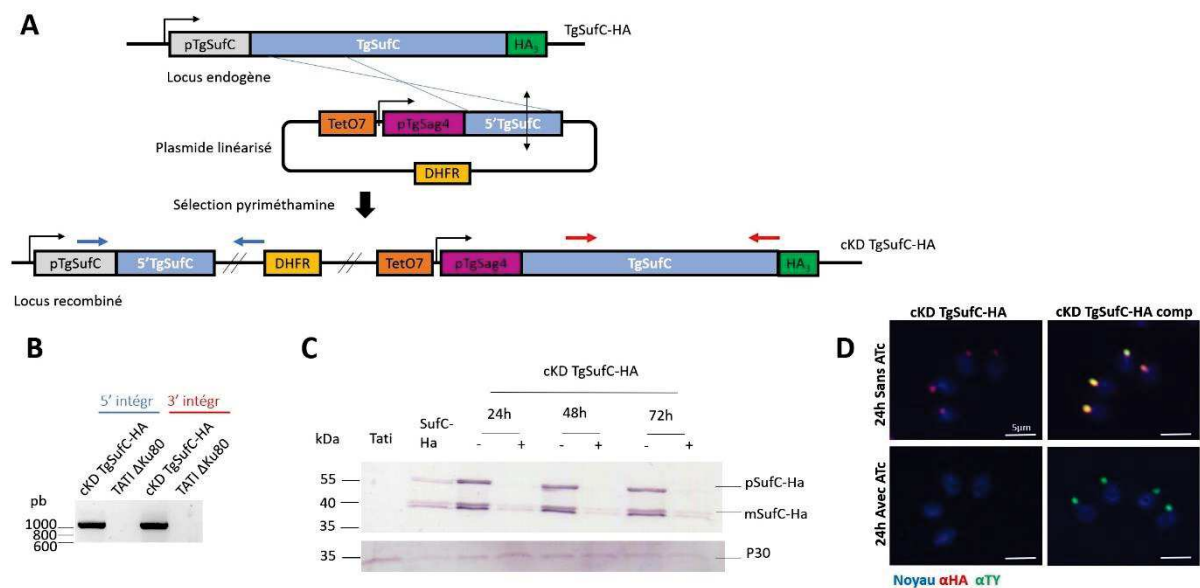


Figure 29: Génération d'une lignée de parasites mutants conditionnels cKD TgSufC-HA

A : schéma représentant la stratégie pour obtenir un mutant conditionnel (cKD) TgSufC par recombinaison homologue au locus natif du gène d'intérêt. Sélection des parasites transgéniques positifs par expression de la Dihydrofolate réductase (DHFR) qui leur confère une résistance à la pyriméthamine. **B** : PCR diagnostic afin de vérifier intégration de la construction. Le fragment correspondant aux flèches bleues en (A) pour l'intégration 5' et aux flèches rouges en (A) pour l'intégration 3'. Respectivement réalisés par les couples d'amorces ML4111/ML687 (TgSufC 5' intégration de 1273 pb) et ML1041/ML4112 (TgSufC 3' intégration de 1158 pb). **C** et **D** : Vérification de l'expression et de la régulation de la protéine cKD TgSufC-HA par immunoblot (**C**) et immunofluorescence (**D**). Utilisation, pour le western blot, comme contrôle d'expression de la lignée parentale TATI, la lignée mutante (cKD TgSufC-HA) mise en culture sur une cinétique de 3 jours dans du milieu contenant ou non l'anhydride de tétracycline (ATc). Marquage de la protéine de surface P30 comme expression control. Concernant l'IFA, utilisation de la lignée mutante (cKD TgSufC-HA) ainsi que de la lignée comprenant construction de complémentation (cKD TgSufC-HA comp) après 24h de culture dans du milieu avec ou sans ATc. La Fluorescence rouge indique un marquage du tag HA (régulé par l'ATc) alors qu'une fluorescence verte indique la présence du tag Ty (issu de la complémentation et non régulé par l'ATc).

Dans un même temps, nous avons voulu nous assurer de la spécificité des futures analyses phénotypiques. Nous avons donc généré une lignée complémentée exprimant au locus *UPRT* (uracile phosphoribosyltransférase) une copie supplémentaire de TgSufC. Ainsi les phases initiales de l'analyse décrites ci-après ont pu être réalisées sur la souche mutante (cKD TgSufC) mais aussi, servant de contrôle, sur la souche TatiΔku80 (dont est issues la lignée mutante) qui permet la régulation par l'ATc ainsi que sur la souche complémentée (**Figure 30**). L'expression et la bonne localisation à l'apicoplaste de la copie additionnelle de TgSufC, étiquetée avec un épitope Ty, a été vérifiée par immunofluorescence (**Figure 29 D**).

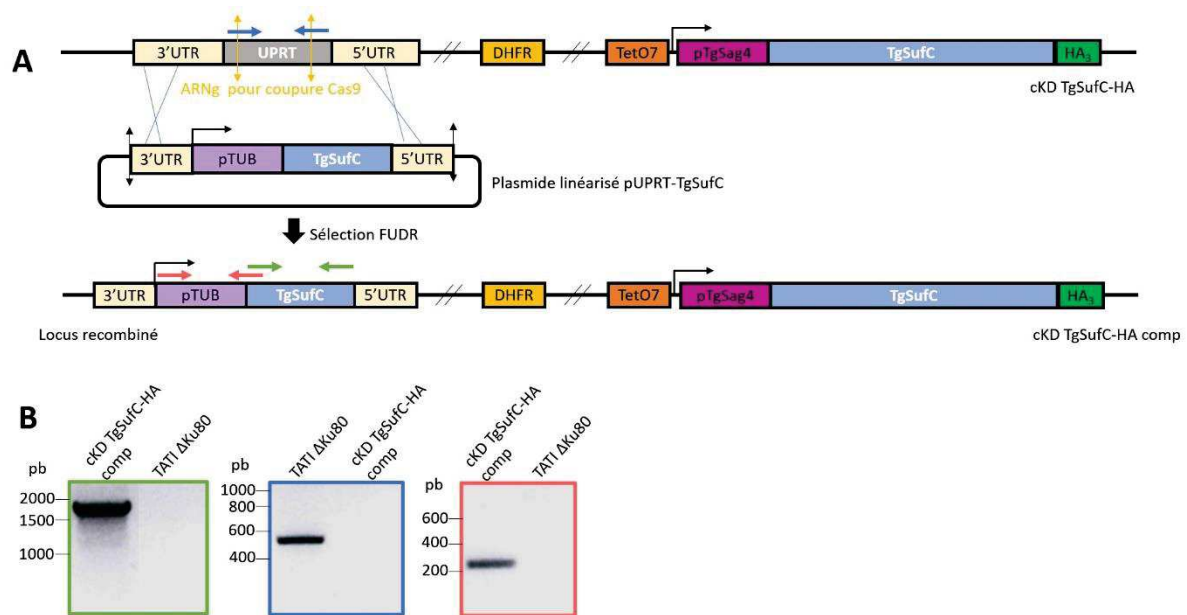


Figure 30: Génération de la lignée complétée de TgSufC

A : schéma représentant la stratégie pour obtenir une lignée complétée (cKD TgSufC-HA comp) par addition d'une extra-copie, du gène codant pour SufC, par recombinaison au locus Uracil phosphoribosyltrasferase (UPRT). Nous avons utilisé la CAS9 couplé à des ARNg spécifiques (flèches jaunes) pour perturber le gène de l'UPRT. La perte de l'UPRT engendre une résistance à la 5-fluorodeoxyuridine (FUDR), nous permettant de sélectionner les parasites transgéniques. **B** : PCR de vérification de la complémentation par les amorces : ML801/4816 (gène SufC, flèches vertes) ; ML1432/1433 (UPRT natif flèches bleues) et ML3636/3190 (promoteur tubuline et début du gène SufC, flèches roses).

C. La perturbation de l'expression de SufC impacte la réplication du parasite.

1) Impact de la perte de TgSufC sur la croissance et la réplication

Dans le but de mesurer et comprendre l'impact de la déplétion de SufC sur le cycle lytique de *T. gondii* *in vitro*, nous avons réalisé des expériences de plaque de lyse (**Figure 31 A**). Ce test permet d'évaluer le bon déroulement du cycle lytique du parasite. En effet, le développement (les étapes d'invasion/réplication/sortie) sur un tapis de cellules hôtes confluentes va créer des plaques de lyses quantifiables et mesurables. Après un traitement de 7 jours (en présence ou absence d'ATc dans le milieu de culture), les plaques de lyse sont dénombrées et leur aire est mesurée (**Figure 31 B**). Le résultat est semblable à celui obtenu précédemment avec TgSufS : la condition comprenant la lignée mutante inductible en présence d'ATc ne montre aucune plaque de lyse contrairement aux diverses autres conditions. Cela suggère donc que perturber l'expression de SufC induit un défaut dans le cycle lytique du parasite.

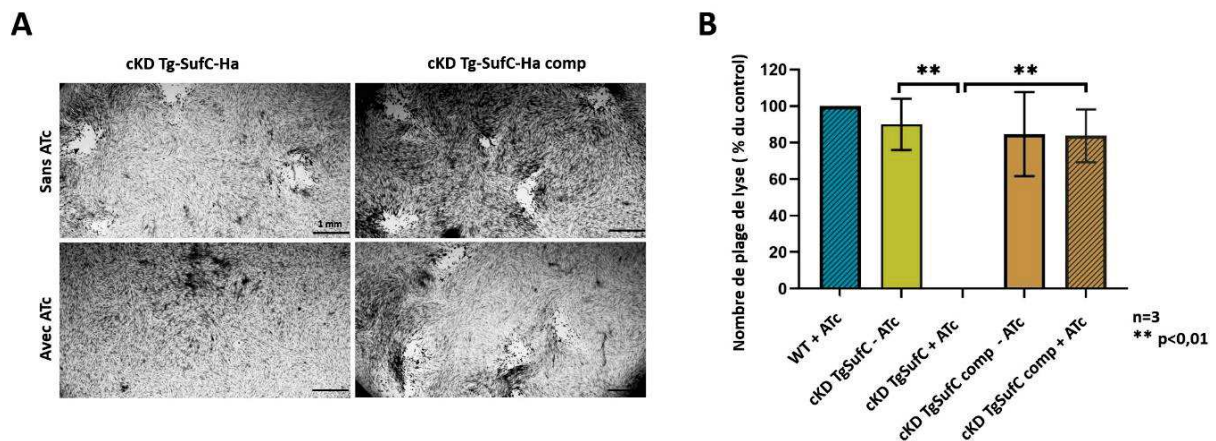


Figure 31: Régulation de l'expression de SufC et impact sur le cycle lytique de *T. gondii*.

A : Test de plaque de lyse avec les parasites issus de la lignée mutante conditionnelle et de la lignée complétée en présence ou absence d'anhydride de tétracycline (ATc) pendant sept jours consécutifs. **B** : dénombrement des plaques de lyse pour chaque condition de cultures. Test de Student ** $p < 0.01$ $n=3$

Une perturbation du cycle lytique peut avoir lieu à une ou plusieurs de ses étapes qui sont l'invasion de la cellule hôte, la réplication au sein de la cellule hôte, pour terminer avec la sortie ce qui entraîne la lyse de la cellule hôte. Le mutant SufS était perturbé au niveau de la réplication, nous avons donc voulu évaluer si c'était également le cas pour le mutant SufC (**Figure 32**).

Pour cela après 48h de préincubation en présence ou non d'ATc, les parasites sont utilisés pour réenvahir des cellules

hôtes toujours dans les mêmes conditions. Nous effectuons ensuite des marquages en immunofluorescence afin de d'identifier et de quantifier le nombre de parasites par vacuoles 24h post ré-invasion. Comme représenté dans la **figure 32** ci-dessus, pour les trois conditions

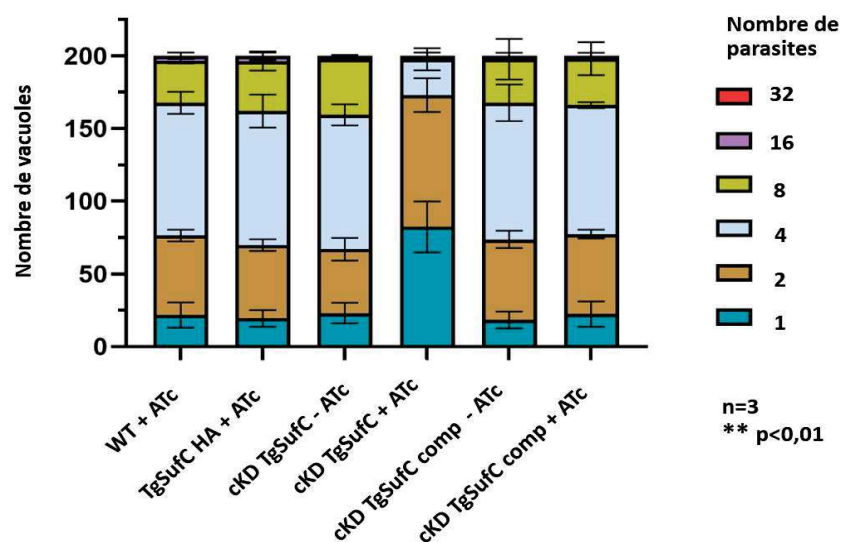


Figure 32: Test de réplication et décompte de parasites par vacuoles

Les valeurs représentées sont la moyenne $\pm$ erreur type. Les comptages sont réalisés sur un total de 200 vacuoles pour chaque condition.

contrôles (WT +ATc/ HA +ATc/ ckD -ATc) ainsi que pour la souche complétée, la plupart des vacuoles contiennent en majorité 4 parasites. Au contraire, lorsque la protéine SufC est déplétée par ajout d'ATc, les vacuoles contiennent en majorité 1 ou 2 parasites, ce qui indique un ralentissement ou une perturbation du cycle replicatif des parasites.

2) TgSufC est importante pour l'intégrité de l'apicoplaste.

Comme nous l'avons démontré précédemment, la protéine TgSufC, tout comme TgSufS, est localisée à l'apicoplaste. Il est donc possible que l'impact sur le cycle réplcatif soit dû à un défaut au niveau de cette organelle essentielle à la survie des tachyzoïtes. De plus, la perte de viabilité des mutants TgSufS et TgSufC est compatible avec le phénotype de 'mort retardée' qui est caractéristique de défauts de l'apicoplaste (d'où la nécessité de pré-incuber les parasites pendant 48h avec l'ATc avant d'observer les défauts de croissance). Ainsi, pour évaluer s'il y a ou non une perte d'intégrité de l'apicoplaste, nous avons réalisés des quantifications de l'organelle par immunofluorescence sur des parasites incubés jusqu'à cinq jours avec de l'ATc. Nous avons utilisé comme marquage de l'apicoplaste un anticorps dirigé contre la chaperonine CPN60 (**Figure 33 A et B**). On note la perte progressive de l'organelle suite à la déplétion de TgSufC, mais elle semble lente et incomplète. Après cinq jours d'incubation, près de la moitié des vacuoles comportent des parasites ayant perdu leur apicoplaste. Ce résultat a été confirmé avec un deuxième marquage indépendant utilisant de la streptavidine fluorescente, qui reconnaît essentiellement l'acetyl-CoA carboxylase (ACC) une protéine de l'apicoplaste naturellement biotinylée (**Figure 33 C et D**).

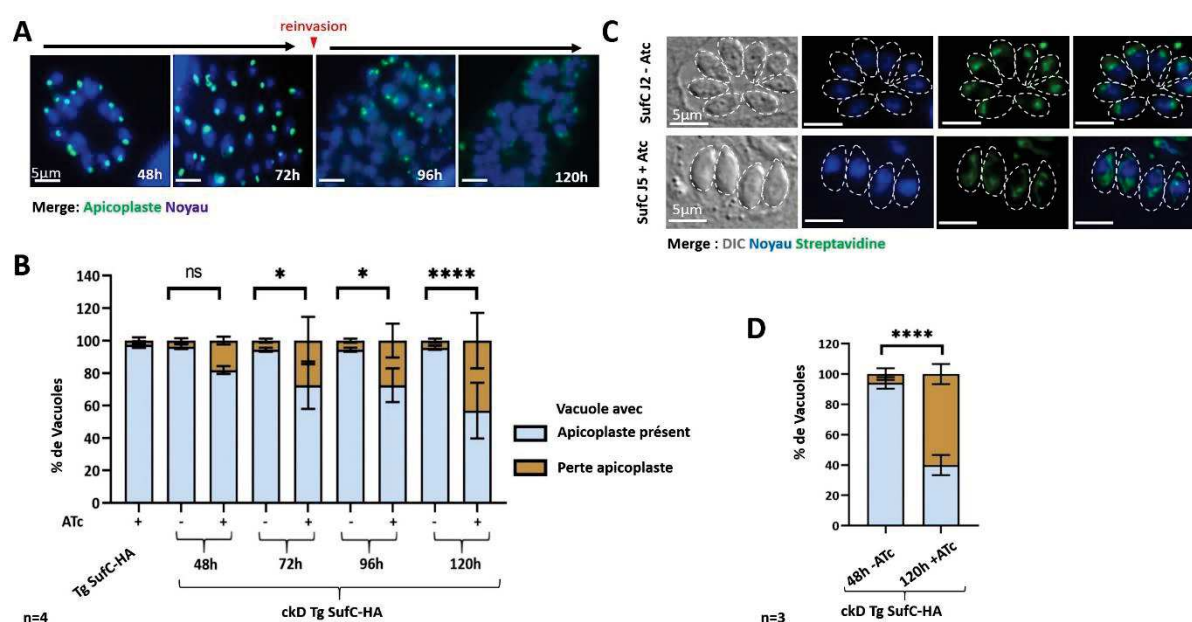


Figure 33: La perte de SufC entraîne un défaut d'intégrité de l'apicoplaste.

A et C : immunofluorescences évaluant la perte de l'apicoplaste à l'aide de différents marquages : la protéine de lumen CPN60 (reconnue de façon spécifique par un anticorps) et la protéine ACC (protéine biotinylée majoritairement reconnues par la streptavidine couplée à un fluorochrome). **B et D :** Représentations graphiques du dénombrement de vacuoles comportant des parasites ayant un apicoplaste présent ou une perte d'apicoplaste à partir des immunofluorescences, décrites respectivement en **A** et **C**. 40 vacuoles ont été comptées par conditions et utilisation du test statistique « T-test » de Student: ns : non significatif, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

D. SufS et SufC : un impact sur les lipides et les membranes ?

1) La dérégulation de la voie SUF entraîne une perturbation de lipoylation de la sous-unité E2 de la PDH apicoplastique

Une des protéines classiquement connues comme possédant un centre [Fe-S] et résidant dans l'apicoplaste est la lipoyl synthase LipA. Dans l'organelle, elle a pour substrat la sous-unité E2 de la pyruvate déshydrogénase (PDH)²⁰⁰, dont elle assure la lipoylation (ajout d'un acide lipoïque), qui est essentielle à sa fonction. Nous avons utilisé un anticorps spécifique de l'acide lipoïque pour évaluer par immunoblot l'impact de la perte de TgSufC sur la lipoylation de LipA. Nous avons pu voir que la lipoylation de PDH-E2 est rapidement affectée en présence d'ATc (**Figure 34**). Contrairement à d'autres protéines lipoylées du parasite, comme les sous-unités E2 de la « branched-chain alpha-keto dehydrogenase » (BCDH) et de la « α -ketoglutarate dehydrogenase » (KGDH)²⁰¹, qui sont mitochondriales et ne sont pas affectées. La diminution de la lipoylation de la PDH-E2 semble spécifique car elle est antérieure aux pertes partielles de l'apicoplaste lui-même, comme montré avec le marqueur Cpn60 dont les quantités varient peu (**Figure 34**).

L'apicoplaste est connu pour être le siège de nombreuses voies métaboliques indispensables au bon fonctionnement du parasite. Parmi celles-ci se trouve la voie FASII de synthèse d'acide gras. Cette voie de biosynthèse dépend de précurseurs comme l'acetyl-CoA, lui-même synthétisé grâce à la PDH. Le mutant TgSufS que nous avons précédemment caractérisé (voir chapitre I) est lui aussi impacté pour

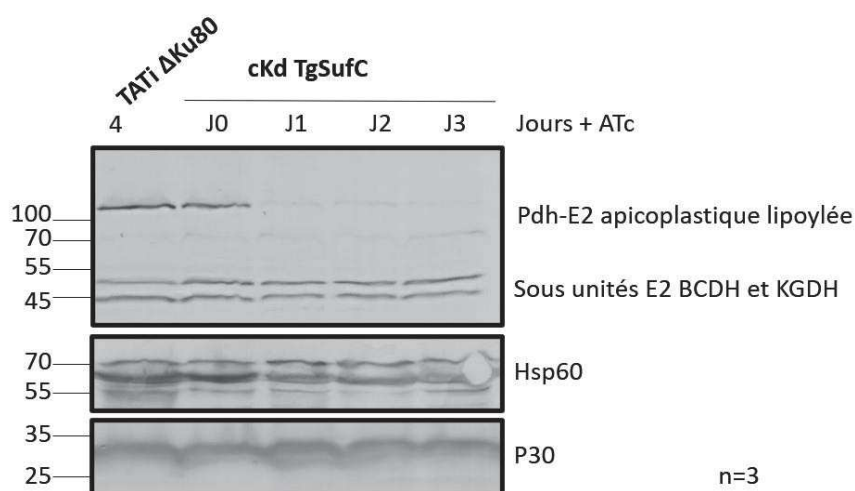


Figure 34: Immunoblot attestant de l'état de lipoylation de la sous unité E2 de la pyruvate déshydrogénase (PDH) chez *T. gondii*.

la lipoylation de la PDH-E2. L'analyse de protéomique quantitative, faite sur ce mutant, a montré une augmentation de l'expression qu'un certain nombre d'enzymes localisées dans l'ER et impliquées dans la synthèse de plusieurs phospholipides et céramides. Ces lipides sont généralement synthétisés dans le ER à partir précurseurs issus de l'apicoplaste, ces précurseurs peuvent également être récupérés à partir de la cellule hôte, donc cela peut clairement indiquer un mécanisme compensatoire.

Par conséquent nous pouvons supposer que les deux mutants de protéines impliqués dans la biosynthèse des centres [Fe-S] (TgSufS et TgSufC) se comportent de manière similaire. Les protéines à

centre [Fe-S] de l'apicoplaste semblent donc nécessaires au parasite puisque leur dysfonctionnement pourrait entraîner des perturbations d'autres voies biologiques indispensables, en particulier l'homéostasie lipidique des parasites.

Afin d'évaluer l'importance de cette voie SUF sur la biosynthèse des lipides et donc de façon concomitante la formation des membranes de *T. gondii*, une analyse lipidique spécifique de l'apicoplaste a été menée par nos collaborateurs de l'institut de bioscience de Grenoble. Dans un même temps, nous avons effectué des analyses complémentaires par microscopie électronique à transmission et en microscopie photonique afin de voir si nos mutants peuvent être associés à un phénotype morphologique spécifique attestant de dysfonctions au niveau lipidique, lors de la formation des membranes nécessaires au développement du parasite.

2) Analyse morphologique et lipidomique et de *T. gondii*.

a) Intégrité membranaire des mutants TgSufS et TgSufC.

Lors des précédentes analyses en microscopie des mutants apicoplastiques (TgSufS et TgSufC) il nous a semblé voir une division non synchronisée des parasites au sein des vacuoles. Afin de vérifier cela, nous avons effectué un marquage du complexe membranaire interne (IMC), permettant de visualiser le stade de division des parasites, notamment l'initiation de la formation des cellules filles (**Figure 35 A et B**). Il semble en effet que les mutants, lorsqu'ils sont déplétés de leur protéine d'intérêt respective, aient un problème précoce dans la synchronisation de la division au sein d'une même vacuole et, plus tard, dans la formation de l'IMC. L'effet est particulièrement marqué pour le mutant TgSufC qui au bout de seulement deux jours de traitement à l'ATc contient approximativement 80% de vacuoles comportant des parasites asynchrones. Nous avons également évalué l'effet à plus long terme au niveau morphologique (nous avons vu précédemment par exemple que l'apparition du phénotype de perte de l'apicoplaste est progressive et arrive tardivement). Nous avons donc décidé de refaire une analyse de l'IMC après sept jours de traitement à l'ATc (**Figure 35 C**). En plus du défaut de synchronisation de la division des parasites, il semble que le complexe membranaire interne s'élargisse et perde son intégrité, accompagné d'un défaut de ségrégation du noyau tout comme d'une perte importante de l'apicoplaste (que nous avons auparavant décrite). Une analyse ultrastructurale par microscopie électronique du mutant TgSufS (**Figure 35 D**), après quatre jours de traitement à l'ATc, a également révélé de nombreuses malformations dans la continuité du réseau membranaire (membrane plasmique et IMC). De façon intéressante, ce phénotype rappelle celui observé dans le mutant de l'acyltransférase TgATS2²⁰⁰, impliquée dans la synthèse d'acide phosphatidique dans l'apicoplaste, un précurseur de la synthèse de nombreux autres phospholipides. Ainsi, il semblerait que dépler les tachyzoïtes des protéines TgSufS et TgSufC, engendre potentiellement un défaut de

synthèse lipidique conduisant à de multiples perturbations membranaires, impactant à leur tour la division cellulaire et la biogenèse d'organelles.

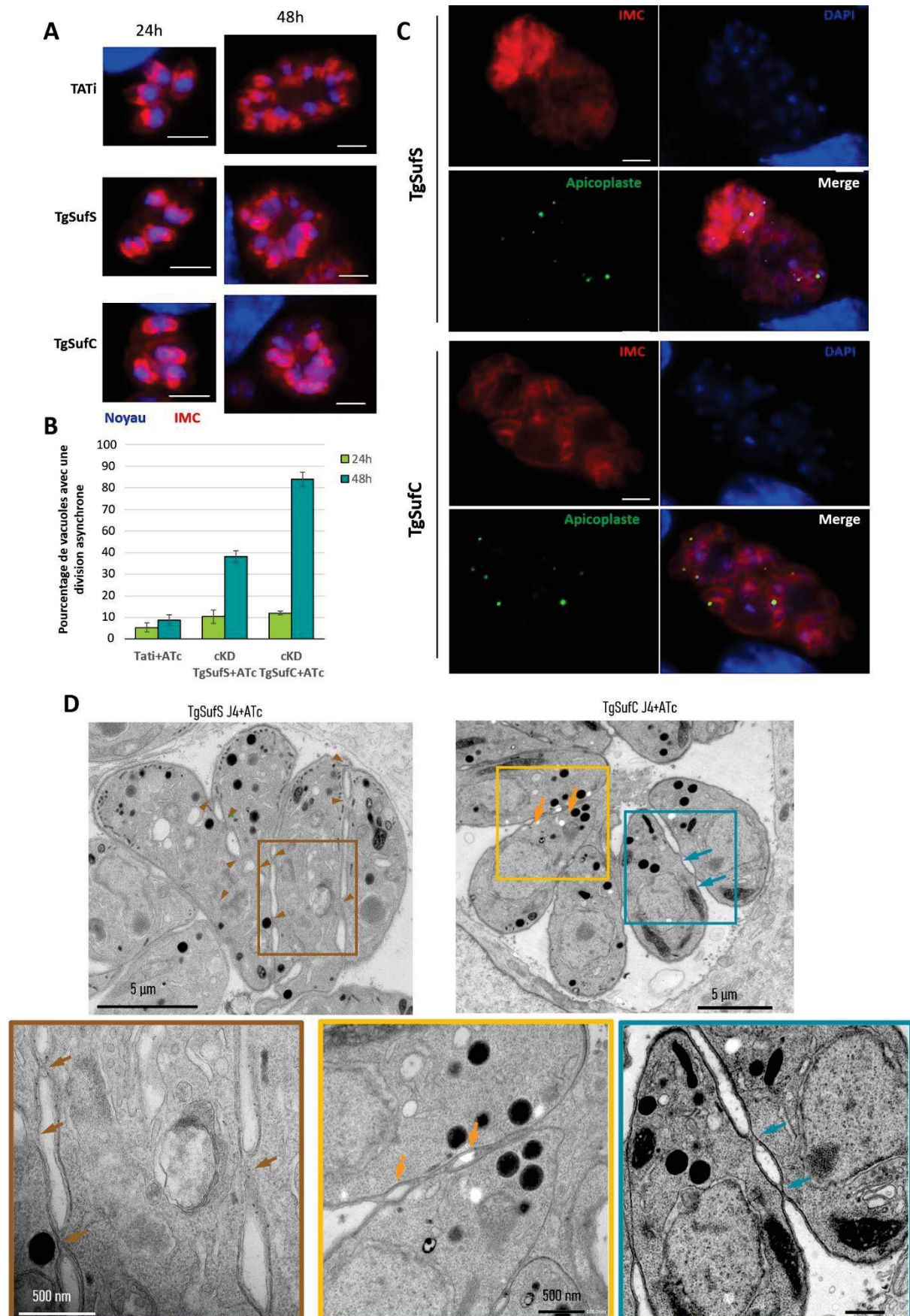


Figure 35: Analyses morphologiques des membranes de *T. gondii* : déplétion de TgSufC/SufS et défauts membranaires.

A : Immunofluorescence de l'IMC par marquage de la protéine IMC3 (en rouge) attestant d'une désynchronisation de la division des parasites mutants TgSufS et TgSufC après deux jours de traitement à l'ATc. L'ADN est marqué en bleu avec le DAPI. Echelle= 5µm. **B** : Quantification de vacuoles comportant des divisions asynchrones de cellules filles, sur la base du marquage IMC3 montré en **A**. Les valeurs sont la moyenne +/- erreur standard. n=3. **C** : Immunofluorescence effectuée après sept jours de traitement + ATc par marquage du complexe membranaire interne (protéine IMC3, en rouge) ; du noyau (DAPI, en bleu) ainsi que de l'apicoplaste (protéine ATRX1, en vert). Echelle=5 µm. **D** : Analyse par microscopie électronique des mutants TgSufS et Tg SufC après quatre jours +ATc. Les défauts dans la séparation et continuité des membranes sont indiqués par des flèches vertes sur les images initiales (images du haut) ainsi que sur le zoom qui en découle (images du bas).

b) Biosynthèse des acides gras et analyse lipidomique pour le mutant TgSufC.

Au vu des défauts membranaires observés précédemment et parce-que l'apicoplaste contient la voie FASII de biosynthèse des acides gras, nous avons, avec l'aide de nos collaborateurs de Grenoble, voulu savoir si ces perturbations pouvaient être corrélées avec un défaut dans la synthèse d'acides gras. Les résultats préliminaires de l'analyse lipidomique, du mutant TgSufC montrent que la proportion de certains acides gras fluctue lors de la déplétion de la protéine TgSufC, mais n'est pas altérée pour les parasites complémentés (**Figure 36 A**). De plus, en comparant les quantités de chaque catégorie d'acide gras (**Figure 36 B**), il semble que la quantité d'acide gras à chaîne courte diminue lors de la déplétion de TgSufC contrairement à la quantité d'acides gras à chaîne longue. Les acides gras à chaîne courte sont synthétisés dans l'apicoplaste avant d'être distribués dans l'ER pour des étapes d'élongation. Cette analyse pointe donc vers un défaut de synthèse de précurseurs lipidiques dans l'apicoplaste lorsque la voie de synthèse des protéines [Fe-S] apicoplastique est perturbée. Cependant, l'effet observé avec ces résultats préliminaires (qui doivent être confirmés par l'analyse du mutant TgSufS), est modeste. Ceci pourrait en fait refléter une compensation par le parasite avec l'import de précurseurs lipidiques de la cellule hôte. Des expériences de marquage métabolique de précurseurs lipidiques de l'hôte qui sont en cours nous permettront d'évaluer ceci.

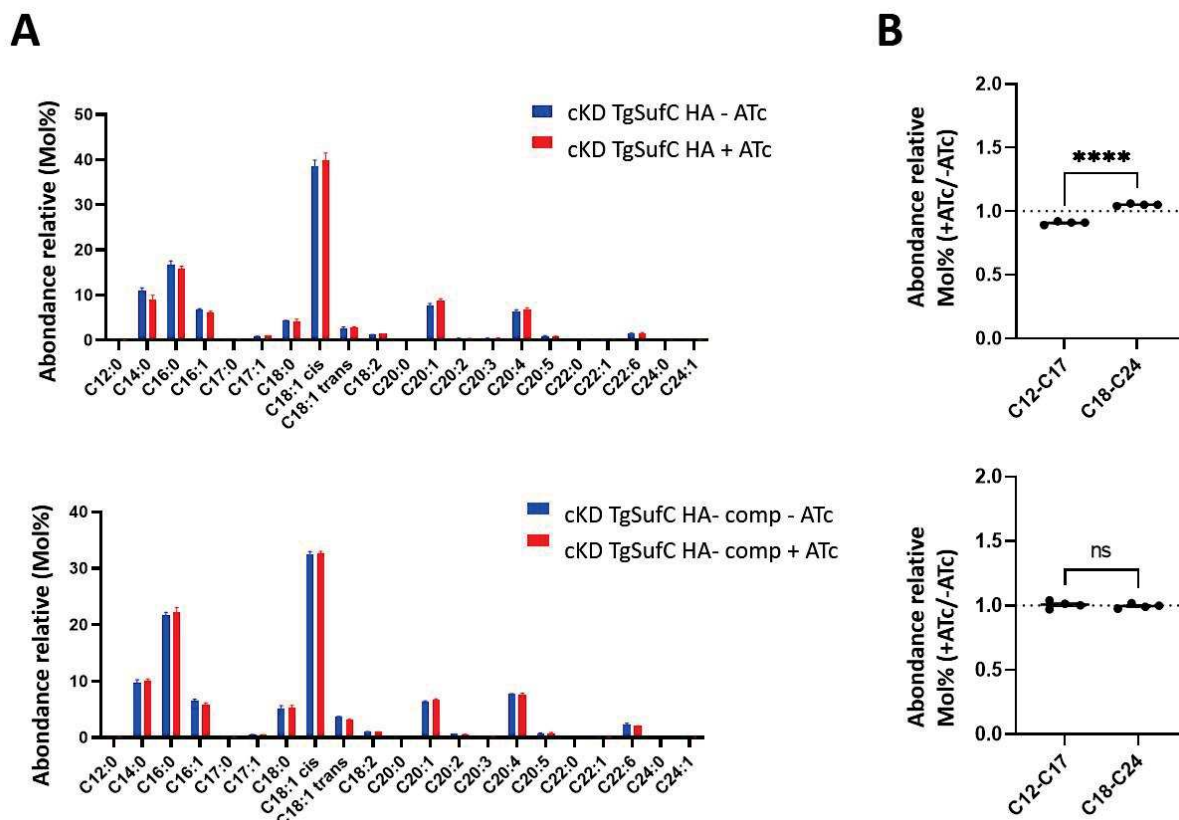


Figure 36: analyse du répertoire lipidique de TgSufC

A : Graphique représentant l'abondance des acides gras courts (C12 à C17) et longs (C18 à C24) lors d'une incubation en absence ou présence d'ATc pendant 5 jours. Quantité d'acide gras relevée pour 10^6 parasites mutants cKD TgSufC (en haut) ou complémentés (en bas) ; $n=3$. **B** : Ratio des quantités d'acide gras courts et longs par comparaison des conditions + et - ATc du mutant conditionnel (graphique du haut) et du complémenté (graphique du bas) ; utilisation du T-test de student, ns = non significatif et **** $p < 0.0001$ $n=3$.

E. Production d'un nouvel anticorps dirigé contre l'apicoplaste de *T. gondii*

2) Production et purification de protéines recombinantes de la machinerie [Fe-S]

Nous avons voulu essayer de générer des protéines recombinantes correspondant aux candidats des voies de synthèse de centres [Fe-S] de la voie SUF que nous avons choisi d'étudier. Ceci afin éventuellement d'en étudier l'activité enzymatique.

La spécificité de la voie SUF (à l'apicoplaste et donc absente de l'Homme), et les activités enzymatiques de certaines protéines (cystéine désulfurase pour TgSufS, éventuellement potentialisée par TgSufE, une activité d'ATPase concernant TgSufC) en font des cibles thérapeutiques potentielles. De plus on a pu voir que grâce à la complémentation de mutants de *E. coli* par l'homologue de *T. gondii*, que l'activité de ces protéines semble être conservée. Il faut cependant noter que la sensibilité à l'oxygène de certains centres [Fe-S] peut rendre difficile l'expression et l'étude biochimique de certaines protéines [Fe-S] (nécessitant potentiellement de travailler dans des conditions anaérobies).

Nous avons cloné le fragment contenant le site actif putatif de chaque protéine d'intérêt dans le plasmide pET15b. Ce plasmide nous permettant d'exprimer une protéine étiquetée en N-term avec un six His, dont l'expression est mise sous le contrôle du promoteur Lac de l'opéron lactose. L'expression protéique peut donc être induite par ajout isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), un analogue d'allolactose.

Les constructions pour TgSufS/TgSufE et TgSufC ont été transformées dans des bactéries BL21 permettant l'expression, qui est induite par ajout de 0.5mM d'IPTG. Afin de voir si les protéines sont correctement exprimées, différentes conditions de cultures sont expérimentées (comme par exemple une culture à 37°C ou 16°C). Après dépôt sur gel de polyacrylamide des fractions issues des cultures (**Figure 37**) il s'avère que l'on obtient les différentes protéines exprimées aux tailles attendues (TgSufS : 53kDa, TgSufE : 18kDa, TgSufC 34kDa). Or, il apparaît que la protéine TgSufS n'est pas soluble, contrairement aux protéines TgSufE et TgSufC. De plus, la production de TgSufE reste faible et n'a d'intérêt que dans le contexte de l'étude de SufS. Par conséquent, il nous a semblé judicieux de nous concentrer sur TgSufC.

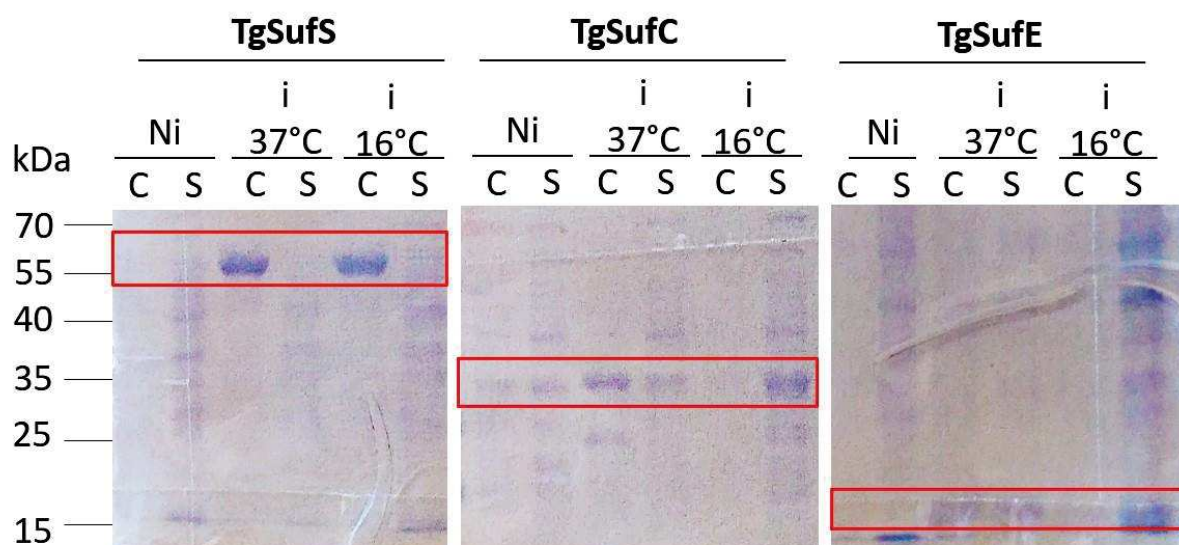


Figure 37: Expression des protéines recombinantes TgSufS/C/E

Tailles attendues TgSufS= ~53kDa ; TgSufC= ~38kDa ; TgSufE= ~18kDa ; C : culot ; S : surnageant ; Ni : non induit ; i : induit

C'est donc dans le but d'analyser l'activité ATPase de cette protéine que nous avons créé des lignées bactériennes contenant une mutation au site actif de TgSufC afin d'attester de la spécificité des futurs résultats. Deux lignées sont créées, une contenant une mutation changeant la lysine (K40) par un autre acide aminé proche chimiquement : l'arginine (K40R), contrairement à la seconde lignée pour laquelle nous avons remplacé la lysine par un acide aminé très éloigné chimiquement : l'alanine (K40A).

Avant toute expérience sur ces protéines recombinantes, il est nécessaire de les purifier à partir des fractions solubles issues des cultures bactériennes. Pour cela, nous nous sommes servis du tag triple histidines en N-terminal de nos protéines qui nous permet d'effectuer une chromatographie d'affinité sur colonne de nickel.

Après migration sur gel de poly acrylamide et coloration au bleu de coomassie, nous avons vu que la protéine d'intérêt est éluée de façon efficace (**Figure 38 A**).

Les sels et l'imidazole contenus dans la solution d'élution, ont alors été éliminés par dialyse avant qu'un dosage protéique soit effectué (**Figure 38 B**). Notre extrait protéique n'était pas complètement pur, mais la bande majoritaire est celle correspondant à notre protéine d'intérêt, que nous avons obtenu à une concentration de $\sim 2\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

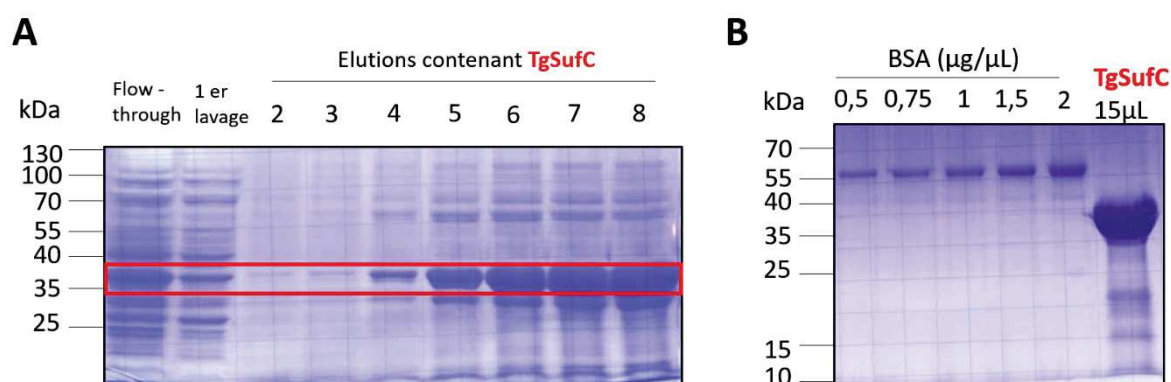


Figure 38: Gels de coomassie post-purification et dialyse de TgSufC

A : gel de coomassie avec les différentes fractions de purification de la protéine recombinante TgSufC. La section flowthrough représente l'éluat issu du passage de la culture bactérienne sur la colonne de nickel ; les fractions suivantes sont issues respectivement du 1^{er} lavage de la colonne ainsi que des éluats n°2 à n°8 à concentration constante d'imidazole.

B : Gel de coomassie ayant permis le dosage de TgSufC suite à la dialyse. La gamme standard permettant le dosage des protéines est faite avec de l'albumine de sérum bovin (BSA), diluée à des concentrations comprises entre 0.5 et 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; 15 μL de protéine purifiée sont déposés afin de déterminer la concentration qui se révèle alors être de $\sim 2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans notre échantillon final de protéine TgSufC.

3) Activité de TgSufC.

Lors de l'étape de purification de la forme mutée K40R était toujours soluble mais ne semblait pas être retenue par la colonne de nickel, par contre la forme K40A a été obtenue de façon similaire à la forme sauvage, à une concentration finale de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. L'activité ATPase de la protéine TgSufC non mutée a été étudiée à l'aide d'un test colorimétrique au vert de malachite (le vert de malachite forme une couleur vert foncé avec le phosphate libéré par l'hydrolyse de l'ATP). Le test a été mené dans un premier temps uniquement avec la forme non mutée du site actif de TgSufC puis par la suite avec la forme mutante K40A servant de contrôle négatif afin de nous assurer de la spécificité des mesures. Afin de voir une potentielle variation de l'activité ATPase le test a été effectué sur deux paramètres de façons indépendantes (**Figure 39 A**). Dans un premier temps, j'ai fait varier la concentration en ATP (de 0.05mM à 25mM) afin que le paramètre constant soit la concentration en protéine purifiée TgSufC à 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Inversement, le test est aussi mené en faisant varier la concentration en protéine (de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ à 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) avec une valeur constante d'ATP de 0.05mM. Il s'est avéré que l'activité de la protéine SufC semble être à son maximum (mesure formant un plateau) quelle que soit la concentration en ATP testée pour 1.8 μg de protéine. Nous avons donc décidé de faire varier la concentration en protéine pour laquelle on observe une courbe d'absorbance presque linéaire jusqu'à arriver à un plateau prenant effet à partir de 2 μg de protéine (ce qui concorde avec la courbe l'activité précédente).

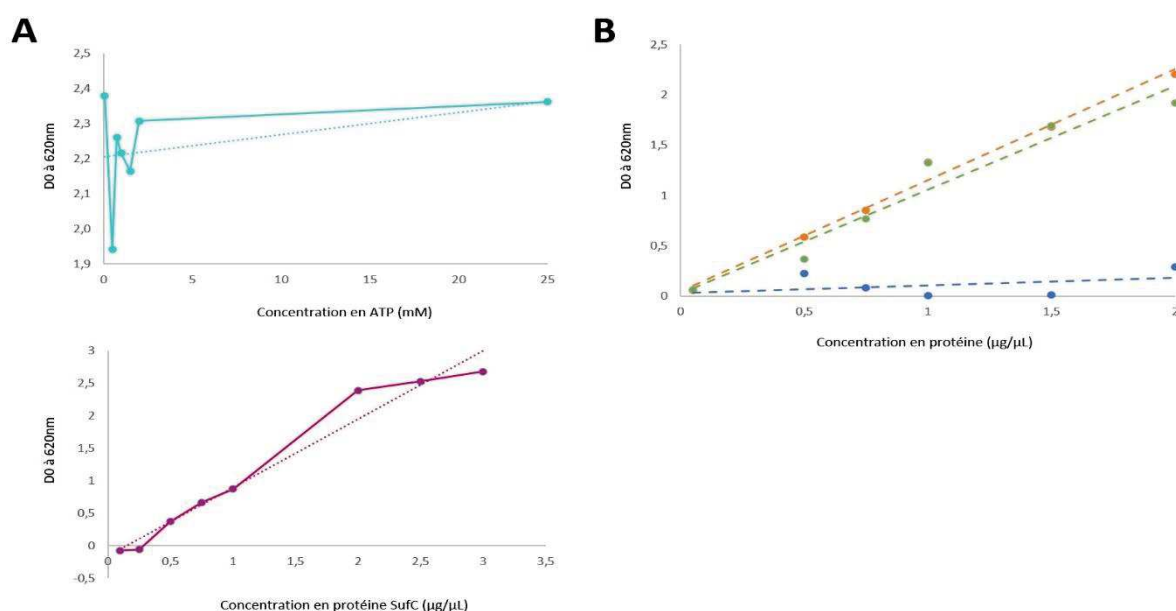


Figure 39: courbes d'activité de TgSufC d'après un test colorimétrique au vert de malachite.

A : Courbes d'absorbance représentatives de l'activité de TgSufC dépendante : en bleu de la concentration en ATP mais avec une concentration fixe en protéine de 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; en violet de la concentration en protéine d'intérêt avec une concentration fixe en ATP de 0.05 mM. En pointillés sont représentées les courbes de tendances. **B** : Courbes d'absorbance liées à l'activité de la forme native (en orange) et mutante (en vert) de TgSufC ainsi que de l'activité résultant de la différence des deux précédentes courbes en bleu (native-mutante). Toutes les mesures sont relevées après 30 min de réaction à 37°C. Chaque point est la représentation d'un triplicata technique.

A ce moment, il nous semble donc que la protéine native SufC comporte une activité mesurable d'environ 150 μ M de phosphate inorganique (Pi) consommé en 30 min (ce qui équivaut à 5 μ M /min). Or, lorsque ce test est effectué avec la protéine wt ainsi que la forme K40A mutée au site actif putatif, on remarque que l'activité ATPase présumée est présente et presque similaire pour les relevés de chaque conditions (**Figure 39 B**). Nous ne pouvons donc pas attester de la spécificité des mesures relevées précédemment. Il semble que soit la mutation n'est pas fonctionnelle, soit plus vraisemblablement que la protéine recombinante que nous avons produite n'est pas ou peu active.

4) Un nouvel anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'apicoplaste.

La protéine recombinante étant produite en quantité considérable, et comme nous avons montré que la protéine TgSufC est localisée à l'apicoplaste, nous avons décidé alors de l'utiliser pour produire un anticorps polyclonal dirigé contre cette organelle, réactif qui peut s'avérer utile pour nos études futures.

Pour cela nous avons fourni, à la plateforme d'animalerie du CRBM (Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier), des aliquots de protéine purifiée de 100 μ g chacun. Par la suite, chaque sérum récolté au cours de l'immunisation est testé par immunoblot et immunofluorescence. D'après les immunofluorescences effectuées, nous confirmons que l'anticorps reconnaît bien l'apicoplaste (**Figure 40**).

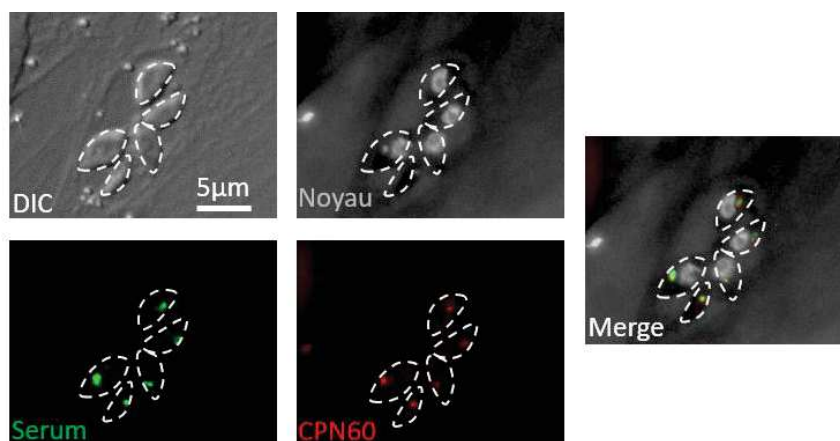


Figure 40: Vérification par IFA de l'action de l'anticorps anti-TgSufC.

Noyau marqué par DAPI, utilisation du Sérum S6 à 1/200, CPN60 marqueur de l'apicoplaste à 1/2000.

L'analyse du sérum anti-TgSufC par immunoblot a révélé par contre des

réactions croisées avec des protéines non spécifiques en plus de la bande correspondant à notre protéine d'intérêt (aux alentours de 34kDa). Malgré ce problème, il faut retenir que nous avons réussi à créer une protéine recombinante nous ayant permis de produire un anticorps dirigé contre l'apicoplaste qui est d'ores et déjà fonctionnel en immunofluorescence.

F. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence que la voie SUF à l'apicoplaste de *T. gondii* contient la protéine TgSufC une ATPase putative. Nous avons confirmé que la protéine de toxoplasme est bien une homologue fonctionnelle de la SufC bactérienne. Malheureusement, la création d'une protéine recombinante contenant le site actif putatif de notre protéine d'intérêt ne nous a pas permis de mesurer l'activité enzymatique de TgSufC. L'activité ATPase des homologues de TgSufC est liée à l'action concomitante de plusieurs régions ou domaines protéiques permettant l'hydrolyse de l'ATP (les domaines Walker A et B, ainsi que les différentes boucles qui semblent catalyser et stabiliser la réaction). Il serait intéressant et nécessaire de créer de nouvelles constructions de protéines recombinantes wt et mutantes pour une ou plusieurs régions du site actif putatif, car une protéine active pourrait être utile pour cribler des inhibiteurs spécifiques par exemple.

Nous avons pu apporter un nouvel outil au laboratoire en créant un anticorps polyclonal de lapin, anti apicoplaste. Il s'est avéré que l'anticorps, issus des différents sérums d'immunisation, ne semble pas complètement spécifique de notre protéine et difficile à utiliser pour un marquage en immunoblot puisque des réactions croisées sont présentes. Le signal précis et localisé à l'apicoplaste obtenu par immunofluorescence semble cependant indiquer que notre anticorps peut être utile au laboratoire pour des analyses par immunofluorescences. Afin de pouvoir offrir la possibilité d'utilisation en immunoblot, il est par contre maintenant nécessaire de purifier le sérum.

Concernant la caractérisation phénotypique du mutant TgSufC, il s'est avéré que l'on obtient un phénotype similaire au premier mutant de la voie apicoplastique SUF que nous avons décrit (**Figure 41**). Ainsi, interférer avec l'expression de protéines impliquées dans les premières étapes de la voie SUF telles que TgSufS et TgSufC, impacte directement le cycle lytique des parasites. Nous avons pu voir que ce dysfonctionnement de cycle semble être dû à un défaut de réplication. Concernant les mutants SUF, il y a un défaut de réplication, ainsi qu'une perturbation morphologique des compartiments membranaires comme l'IMC et, plus tardivement, de l'apicoplaste lui-même. Ces phénotypes pourraient être dus à une perturbation de l'homéostasie lipidique, dépendant elle-même au niveau de l'apicoplaste de la protéine [Fe-S] LipA, qui régule la fonction de la PDH, génératrice d'acétyl-CoA (précurseur de la voie FASII).

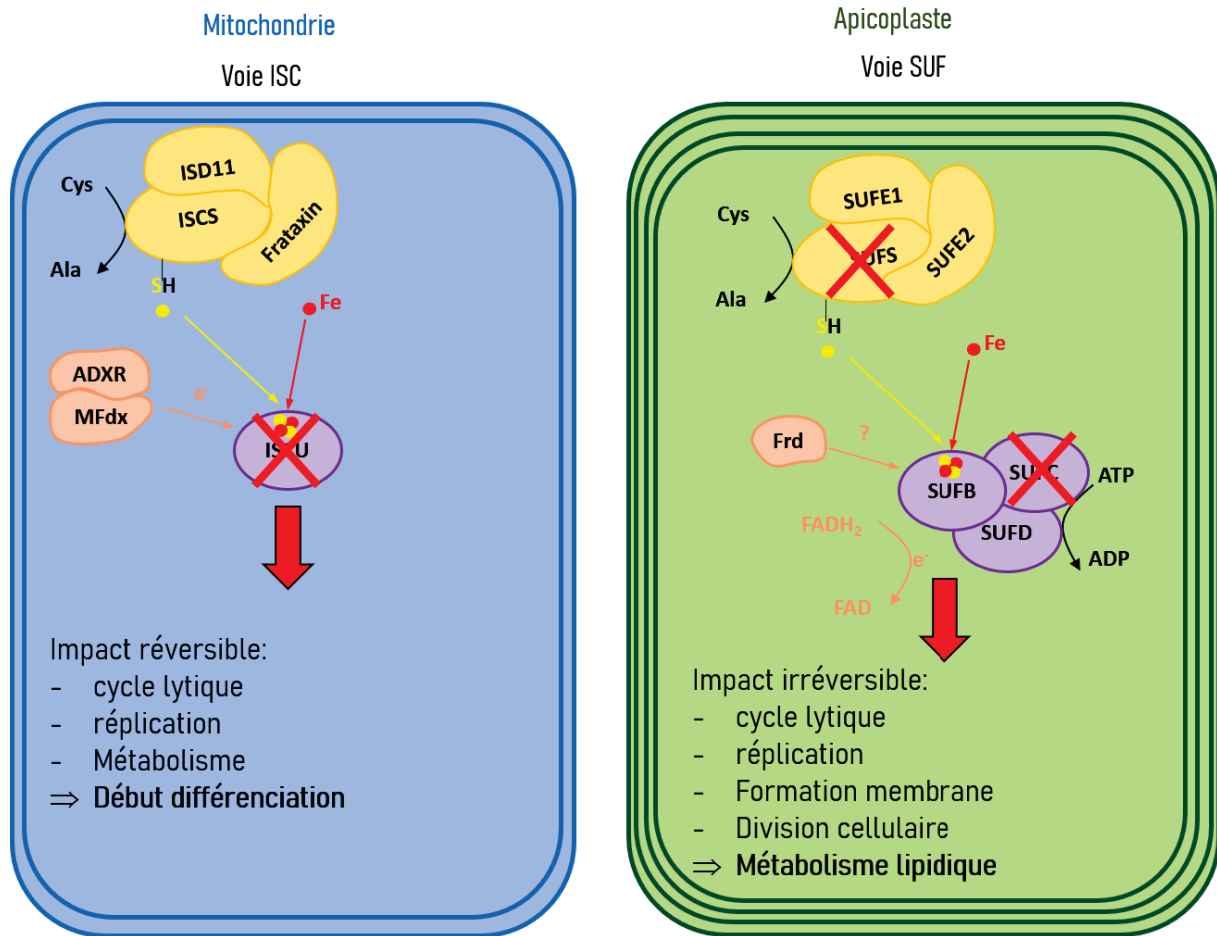


Figure 41: schéma résumant les phénomènes observés lors de l'absence des protéines TgIscU (mitochondrie), TgSufS ou TgSufC (apicoplaste).

Matériels et méthodes

Culture de parasites :

Les stades tachyzoïtes de toutes les souches utilisées (Tati $\Delta ku80$ et souches dérivées mutantes et complémentées) ont été maintenues en culture par passages successifs sur une monocouche de fibroblastes humains par passages successifs. Le milieu de culture étant du milieu Dulbecco « Eagle medium » supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 2-mM de L-glutamine ainsi qu'un mélange pénicilline / streptomycine à 100 μ g/mL.

Expression hétérologue de TgSufC chez *E. coli* :

D'après l'alignement de séquence des acides aminés de TgSufC (TGGT1_225800) avec son homologue chez *E. coli* le fragment d'intérêt fait 900bp. Il a été amplifié par PCR à partir de l'ADNc de *T. gondii* l'aide des amorces ML4009/ML4010 (voir **annexe 5** pour les séquences). Les fragments ont été clonés dans le plasmide pUC19 (de Thermo Fisher Scientific) par restriction des enzymes BamHI/HindII. La souche *E. coli* mutante (SufC JW1672) a été obtenue à partir de la collection Keio et issue de « The Coli Genetic Stock Center » de l'université de Yale. La transformation a été faite avec le plasmide contenant le fragment d'intérêt TgSufC et les bactéries ont été sélectionnées avec de l'ampicilline.

Test de croissance bactérienne :

Les bactéries sont laissées à 37°C pendant une nuit dans du milieu LB complet. Le lendemain, les cultures sont ajustées à la même concentration de départ (DO600 nm de 0.6) dans du milieu minimum M9 contenant 0.4% de glucose contenant ou non le chélateur de fer 2,2'-Bipyridil (Sigma Aldrich) à différentes concentrations. La croissance est mesurée en notant la DO600 à 7, 14 et 24h post incubation à 37°C.

Génération de lignée étiquetée TgSufC-HA :

Lignée étiquetée créée grâce à la technique Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR). En utilisant le plasmide pLIC-HA-CAT. Grace aux amorces ML4048 / ML3981 utilisées pour faire une PCR avec la KOD DNA polymérase (Novagen) afin de d'amplifier un fragment comprenant le tag triple HA ainsi que la cassette de résistance au chloramphénicol, entouré par des séquences homologues de 30 bp de part et d'autre de la zone de recombinaison dans la région 3' du gène d'intérêt. De plus, nous avons utilisé les amorces ML3952/ML3953 afin de générer un guide ARN permettant de couper les deux brins d'ADN au locus d'intérêt. Ces séquences ont été intégrées au plasmide pU6-Universal¹⁹⁸ (Addgen #52694) exprimant la Cas9. La séquence donneuse et le plasmide exprimant l'ARN guide et la Cas9 ont été co-transfectés dans la lignée parentale TATi $\Delta ku80$ et les parasites transgéniques, issus de la transfection, ont été sélectionnés par traitement au

chloramphénicol puis clonés par dilutions en série. L'intégration de la construction a été vérifiée grâce aux amorces ML3980 / ML3984 / ML3986 / ML1476.

Génération de lignée mutante conditionnelle (cKD TgSufC) et complémentée (cKD TgSufC comp) :

La lignée du mutant conditionnel TgSufC (cKD TgSufC) dont l'expression est régulée grâce au système Tet-Off a été générée grâce au plasmide DHFR-TetO7Sag4 et à la stratégie CRISPR. La séquence donneuse a été obtenue par PCR avec la KOD polymérase, permettant d'amplifier la séquence TetO, le promoteur régulable et la cassette résistance avec les amorces ML4107/ML4108 entourée de deux séquences de 30 pb d'homologie avec la région de part et d'autre de la zone ciblée, à l'extrémité 5' du gène TgSufC. Dans un même temps nous avons généré un guide ARN à l'aide des amorces ML4409/ML4410 inséré dans le plasmide pU6-Universal (Addgen #52694) permettant la coupure double brin au locus cible. Une fois la transfection effectuée les parasites transgéniques sont sélectionnées en fonction de leur résistance à la pyriméthamine et clonés par dilutions en série.

La lignée mutante conditionnelle générée est ensuite utilisée pour y insérer une copie ectopique du gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur tubuline au locus *UPRT* (*uracyl phosphoribosyltransférase*) afin de créer une lignée complémentée. Le cDNA de *TgSufC* a été amplifié par transcription reverse (RT-PCR) en utilisant les amorces ML 4815/ ML4816. Cette séquence a alors été clonée en aval de la séquence codant pour le promoteur *tubuline* du plasmide pUPRT-TUB-Ty. Le plasmide alors généré a été linéarisé par action des enzymes de restriction BamHI et Apal. Dans un même temps les couples d'amorces ML3445/ML3446 et ML 2087/ML 2088 ont été insérés dans le plasmide pU6-universal pour générer les ARN guides permettant respectivement l'intégration en 5' et 3' du locus UPRT. Après cotransfection des plasmides dans la lignée mutante conditionnelle, les parasites complémentés (cKD TgSufC-HA comp) ont été sélectionnés grâce à leur résistance à la 5-fluorodésoxyuridine.

Test de plage de lyse :

Une monocouche de HFF est infectée avec des parasites fraîchement égressés et laissés pendant 7 jours en culture en présence ou en absence d'ATc. Les parasites sont par la suite fixés avec une solution à 4% de paraformaldéhyde (PAF) et colorés grâce à une solution à 0.1% de Crystal violet (Sigma AldrichV5265).

Immunoblot (IB) :

Les parasites fraîchement extracellulaires sont sédimentés par centrifugation et resuspendus dans du tampon de Laemmli. Ils seront par la suite déposés sur gel de polyacrylamide où les protéines seront séparées par électrophorèse en présence de SDS (SDS-PAGE) et transférés sur membrane de nitrocellulose grâce au système « Mini-transblot » (BioRad). Par la suite, la membrane est bloquée avec

du TNT 1X (15 mM Tri-HCl; 140 mM NaCl; Tween 0.05%, pH = 8) supplémenter avec 5% p/v de lait écrémé en poudre (Régilait). Les anticorps primaires utilisés pour la détection des protéines d'intérêt sont : un monoclonal de rat anti-HA (clone 3F10, Roche), l'anticorps de lapin anti-acide lipoïque (ab58724 de Abcam), un anticorps de souris anti-sag1²⁰² ainsi qu'un anticorps de lapin anti-CPN60¹⁰⁵ et un anticorps de souris anti-actine²⁰³.

Immunofluorescence (IFA) :

Des lamelles recouvertes d'une monocouche de HFF sont infectées par des parasites fraîchement égrégés afin que ceux-ci puissent s'y multiplier. Elles seront ensuite fixées pendant 20 minutes avec une solution de PBS contenant 4% paraformaldéhyde (PFA), puis les membranes sont perméabilisées avec une solution à 0.3% de Triton X-100 et bloquées avec une solution PBS contenant 0.1% p/v d'albumine bovine (BSA). L'incubation des anticorps primaires et secondaires se fait dans du PBS + BSA. Les images ont pu être acquises grâce à la plateforme de microscopie MRI sur les microscopes Zeiss AXIO imager Z1 ainsi que le Leica Thunder

Production de protéines recombinantes :

Amplification sur cDNA de *T. gondii* des fragments correspondant aux domaines fonctionnels (sur la base d'un alignement avec la séquence d'*E. coli*) de nos trois protéines d'intérêts avec la polymérase Q5 (New England Biolabs) et les amorces :

- Pour TgSufC : ML4009/ML4010
- Pour TgSufS : ML4011/ML4012
- Pour TgSufE : ML4013/ML4014

Les différentes constructions obtenues par transformation et cultures bactériennes sont ensuite digérées par les enzymes de restriction NdeI/BamHI afin d'être liées au plasmide pET15b digéré lui aussi par ces mêmes enzymes.

Concernant les constructions permettant de muter le site actif de la protéine TgSufC, elles ont été générées à partir du plasmide pET15b-TgSufC par mutagenèse dirigée (kit Qickchange, Qiagen) à l'aide des amorces suivantes :

- Pour le remplacement de la lysine en arginine (K40R) : ML4163/ML4164.
- Pour le changement de lysine en alanine (K40A) : ML4184/ML4185.

Toutes les constructions sont vérifiées par séquençage puis transformées dans la souche BL21 d'*E. coli* permettant l'expression. Ensuite, les cultures bactériennes sont pré-ensemencées sur la nuit dans 10 mL de milieu LB complet. Le lendemain les cultures sont ajustées à une densité optique à 600nm de 0,6.

L'induction de la production des protéines d'intérêt se fait alors par ajout de 0.5M d'IPTG dans le milieu de culture pour une incubation à 37°C ou 16°C.

Suite à l'induction pendant 3h à 37°C ou sur une nuit à 16°C, la culture est centrifugée. Les culots sont resuspendus dans du tampon de lyse (10mM Tris HCL pH 8 + 50mM NaH₂PO₄ + 0.5% triton TX10) puis soniqués par pulse de 1 min à amplitude de 60% fait avec le sonicateur 450-D de chez Branson. Les extraits sont centrifugés pour séparer les fraction solubles et insolubles, et peuvent alors être soit déposés sur gel de polyacrylamide soit, pour la fraction soluble, utilisés pour la purification sur colonne de nickel.

Purification de protéine recombinante sur colonne de nickel :

La colonne de chromatographie d'affinité est obtenue par utilisation de résine contenant de l'acide nitrilotriacétique ainsi que du nickel (résine NiNTA, Qiagen). Après filtration de la fraction soluble contenant la protéine d'intérêt, des lavages sont effectués avec une solution contenant de l'imidazole (50mM NaH₂PO₄ + 300mM NaCl+ 20 mM Imidazole). Enfin, la protéine d'intérêt est récupérée dans un tampon d'élution (50mM NaH₂PO₄ + 300mM NaCl +250mM imidazole). Des éluions successives sont effectuées puis déposées sur gel de polyacrylamide afin d'être analysées par coloration au bleu de coomassie. La colonne est ensuite lavée avec un tampon de décapage (« stripping buffer » : 500mM NaCl + 100mM EDTA à pH8.0) puis incubée avec une solution rechargée en nickel (solution à 100mM de Nickel) dont l'excédent est enlevé par lavage à l'eau distillée. Elle peut alors être ré-utilisée ou stockée à l'aide d'une solution à 20% v/v d'éthanol.

Traitement des éluions par dialyse :

Le traitement par dialyse visant à éliminer le surplus de sels et d'imidazole, subvient après avoir vérifié la présence et la concentration de la protéine d'intérêt dans les solutions d'élution. La membrane de dialyse (ayant une limite d'exclusion « Cut off » de 8 kDa) est hydratée avec le tampon (100mM Tris pH7.5 + 50mM NaCl) avant d'y insérer les éluions contenant la protéine d'intérêt. La membrane de dialyse est alors laissée une nuit entière sous agitation à 4°C dans du tampon. Le jour suivant, la solution contenant la protéine d'intérêt est récupérée, dosée à l'aide du kit de dosage BiCinchoninic acid (BCA, thermo scientific) puis congelée à -20°C.

Test d'activité au vert de malachite²⁰⁴ :

Les solutions utilisées sont préparées séparément et la solution de vert de malachite peut être stockée à l'abris de la lumière :

- Solution stock de vert de malachite : 0.44g de vert de malachite (Sigma) dans 360mL d'acide sulfurique 3M.

- « Dye reagent » : solution à 7.5% poids/volume d'ammonium molybdate (Sigma) à laquelle est ajoutée 10mL de solution stock de vert de malachite ainsi que 11% v/v de tween 20%.
- « Mix Dye reagent » : composé de 40µL de « Dye reagent » dans un volume final de 180µL.

Une courbe étalon est obtenue à partir d'un gradient de concentration de phosphate inorganique (Pi de chez EnzoLife, entre 1 et 80 µM dans 160µL) auquel est ajouté 40µL de « Dye reagent ». Après incubation de 10 minutes à 37°C l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 620nm avec le lecteur d'absorbance Sunrise, ainsi que le logiciel Magellan™ de la marque Tecan.

L'activité de la fraction issue de la dialyse est obtenue par dépôt de 0,05µg à 1,8µg de protéine purifiée dans 100µL de tampon de réaction ajusté en ATP (5mM de MgCl₂ + ATP (de 0,05 à 2mM) + 25 mM de tris pH 7.5). Après 30 min d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée avec 50mM EDTA. 20µL de la réaction sont alors prélevés et ajoutés à 80µL de « Mix Dye reagent », après 5 min d'interaction l'absorbance à 630 nm est mesurée sur le Tecan Sunrise.

Création d'un anticorps polyclonal de lapin par immunisation (réalisée par l'animalerie du CRBM de Montpellier) :

La protéine recombinante TgSufC est obtenue par purification sur colonne de Ni-NTA, puis les fractions d'élution sont séparées sur gel de polyacrylamide préparatif pour une étape supplémentaire de purification. La bande correspondant à la protéine d'intérêt est découpée et la protéine est récupérée par électro-élution. La protéine est resuspendue afin d'obtenir 400µL de PBS contenant 100µg de protéine recombinante purifiée. Ce volume est ensuite complété avec 400µL d'adjuvant de Freund. Trois injections sont alors effectuées sur le lapin, les deux premières à une semaine d'intervalle et la troisième est faite trois semaines après. S'en suivent trois prélèvements de 20mL à une semaine d'intervalle chacun. Par la suite un cycle d'une injection suivi de trois prélèvements est répété jusqu'à obtenir un septième prélèvement après lequel nous avons demandé l'arrêt du protocole d'immunisation par saignée totale du lapin, effectuée sous anesthésie au Pentobarbital, et la mise à mort est engendrée par injection au cœur de Doléthal.

Les différents lots de sérums obtenus sont alors testés à diverses concentrations (1/200 et 1/500) en immunoblot et en immunofluorescence. Par la suite, afin d'essayer d'atténuer la présence de réactions croisées, une partie du sérum issu de la saignée totale est purifiée par incubation prolongée sur membrane contenant un dépôt protéique issu de parasites de la lignée mutante cKD TgSufC.

Microscopie électronique à transmission :

Les parasites sont cultivés au sein de flasques contenant des fibroblastes humains (HFF) dans du milieu Dulbecco « Eagle medium » contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 2-mM de L-glutamine ainsi qu'un mélange pénicilline / streptomycine à 100µg/mL et complété ATc ou non.

Après trois jours de culture en flasque les parasites extracellulaires sont alors mis en incubation sur des lamelles de verre contenant une monocouche de HFF. Deux jours post infection des lamelles, celle-ci seront fixées deux heures à température ambiante à l'aide d'une solution contenant 0,1M de cacodylate et 2,5% de glutaraldéhyde. Elles sont ensuite conservées à 4°C avant inclusion, découpe et observation fait par Laurence BERRY.

Analyse lipidomique par GC-MS :

- Extraction lipidique : Prélèvement de tachyzoïtes ($\sim 10^8$ cellules), des lignées mutantes (cKD TgSufS-HA /cKD TgSufC-HA) et complémentées (cKD TgSufS HA-comp /cKD TgSufC HA-comp) sont cultivés en présence de tétracycline pendant cinq jours. Par la suite les parasites fraîchement égressés, sont plongés dans un bain de carboglace /éthanol afin d'arrêter leur métabolisme et les lipides sont extraits dans un mélange de chloroforme/méthanol/eau (2 :1 :0,8, v/v/v contenant 10 nmol d'acide tridécanoïque C13 :0 comme standard interne d'extraction) pour l'analyse des lipides totaux.

- Quantification des lipides : l'extrait est séché dans un concentrateur (sous vide). L'aliquot séché est ensuite dissous dans une solution de chloroforme/méthanol (2 :1, v/v). Les esters méthyliques des acides gras ont alors été analysés par GC-MS et identifiés par spectrométrie de masse et leur temps de rétention par rapport aux standards. Les identifications de lipides ont été effectuées à l'aide du logiciel Mass hunter Quantification (Agilent).

Discussion

Lors de leur évolution en tant que parasites intracellulaires obligatoires, les espèces présentes dans le phylum des apicomplexes ont adaptés leur métabolisme⁹⁰, et tout particulièrement celui présent à l'apicoplaste (ayant notamment perdu sa capacité photosynthétique). L'importance des pathologies engendrées par les parasites de ce phylum, au niveau vétérinaire (donc agronomique) ainsi qu'en santé humaine, est la source de nombreuses études. Bien que le parasite *T. gondii* soit étudié depuis de nombreuses années, il reste de multiples inconnues dans les processus cellulaires et moléculaires fondamentaux. Par exemple, l'importance des mécanismes hébergés ou gouvernés par l'apicoplaste, ainsi que les ceux permettant le passage vers la forme latente du parasite sont encore très peu compris et pourtant essentiels à la survie des parasites.

L'apicoplaste et la mitochondrie sont des hauts lieux du métabolisme de *T. gondii*. Leur origine endosymbiotique en fait des organelles abritant des voies métaboliques spécifiques, car parfois absente des hôtes du parasite, donc particulièrement intéressantes pour la recherche de potentielles cibles de traitements anti-parasitaires. Le principal objectif de ma thèse était de confirmer la présence de nouvelles voies biochimiques essentielles dans ces organelles, les voies de biosynthèse des centres [Fe-S] et d'évaluer leur importance pour le développement du parasite.

Nous avons pu mettre en lumière que deux voies distinctes de biosynthèses des centres [Fe-S] sont présentes à la mitochondrie et à l'apicoplaste de *T. gondii*, respectivement la voie ISC et SUF. La déplétion de protéines clés impliquées dans ces voies a entraîné deux devenir cellulaires très différents. Le parasite développe des problèmes de réplication menant à un phénotype de mort retardée lorsque l'on cible la voie apicoplastique (SUF), contrairement à un impact de la voie mitochondriale (ISC) qui semble conduire à la survie des parasites par différenciation en forme latente.

Il apparaît donc que malgré un mécanisme de synthèse et d'assemblage des centres [Fe-S] présentant des similarités biochimiques entre les deux voies, hébergées dans deux compartiments d'origine endosymbiotique distincts, elles semblent impliquées dans des processus biologiques très différents. Cela est probablement dû au fait de la diversité des fonctions biologiques des protéines à centre [Fe-S] dépendant respectivement de ces voies.

Machinerie des protéines à centre fer-soufre, métabolisme mitochondrial et différenciation.

Il est établi que chez les hôtes intermédiaires du parasite, lors d'un stress intense causé par le système immunitaire, les formes tachyzoïtes de *T. gondii* peuvent se différencier en forme enkystée (ou bradyzoïte). Cette forme de développement latent est particulièrement résistante aux traitements et peut entraîner des réactivations ainsi qu'une toxoplasmose aigüe chez les individus immunodéprimés. Un certain nombre de stress spécifiques aboutissant à la différenciation peuvent être reproduits *in vitro* (pH alcalin, choc thermique, privation en nutriments...).

Le passage de la forme hautement infectieuse et multiplicative à la forme latente du parasite s'accompagne de nombreux changements métaboliques et morphologiques, dus à l'expression de répertoires protéiques spécifiques, dont la régulation au niveau transcriptomique est encore mal connue²⁷. Parmi ces changements, on retrouve notamment ceux de la vacuole parasitophore, qui se modifie afin de devenir une paroi de kyste comportant de nombreuses glycoprotéines, ainsi que les changements métaboliques tels qu'une production d'énergie, effectuée essentiellement au niveau glycolytique plutôt que par respiration mitochondriale.

Un facteur de transcription contrôlant l'entrée en phase latente a récemment été identifié par l'équipe de S. Lourido²⁰⁵. Ainsi, l'expression du gène « Bradyzoite – formation Deficient 1 » (BFD1) s'avère suffisante pour engendrer la différenciation même en absence de stress. BFD1 se lie à de nombreux sites de transcription correspondant à des gènes surexprimés lors de la différenciation ainsi qu'à son propre promoteur. BFD1 est un régulateur majeur des programmes transcriptionnels impliqués dans la différenciation en formes bradyzoïtes. Mais il reste notamment à déterminer quelles sont les voies de régulation en amont qui permettent de transduire les signaux de stress et déclencher l'expression de BFD1 lui-même.

Il y a peu d'exemples de mutants de *T. gondii* se différenciant spontanément en bradyzoïtes, en particulier dans une souche de type I, qui est peu kystogène. Le mutant IscU, que nous avons généré, constitue donc une souche transgénique intéressante qui pourrait apporter des informations sur les éléments régulateurs de la différenciation.

Il y a plusieurs raisons qui peuvent expliquer la différenciation de ce mutant lors de la déplétion d'IscU. En premier lieu, il est possible que des protéines [Fe-S] dépendantes de la voie ISC soient impliquées dans l'expression de régulateurs de la différenciation. La voie ISC se situe dans la mitochondrie, mais il a été montré chez d'autres eucaryotes de celle-ci dépendent que de nombreuses protéines [Fe-S]

cytoplasmiques ou du noyau (où se trouvent la plupart des facteurs modulateurs de l'expression génique) qui sont générées par la voie CIA. Une autre explication est que lorsque la voie ISC est impactée, cela génère un stress métabolique qui serait un des signaux reconnus pour engendrer la différenciation. Comme on l'a montré, la capacité respiratoire mitochondriale du mutant *IscU* est fortement diminuée. Or, de façon intéressante l'Atovaquone et d'autres composés ciblant le métabolisme mitochondrial ont été montrés comme étant des déclencheurs de la différenciation *in vitro*²⁰⁶. La conversion en bradyzoïtes pourrait donc être une réponse adaptative générale à une diminution des activités mitochondriales. Il serait intéressant d'analyser plusieurs mutants mitochondriaux générés dans le passé et connus pour être affectés dans leur croissance, pour voir s'ils ne se différencient pas eux aussi en bradyzoïtes. On ne connaît en tout cas pas pour l'instant la ou les molécules (potentiellement un ou des métabolites liés au métabolisme énergétique mitochondrial) susceptible(s) d'enclencher la signalisation pour la conversion en bradyzoïtes.

Le mutant *TglscU* peut également être utilisé comme outil pour essayer d'identifier de nouveaux gènes gouvernant la différenciation. D'après l'analyse en protéomique quantitative de ce mutant, de multiples protéines semblent impactées (sur ou sous-exprimées) lors de la déplétion en *TglscU*. Parmi elles se trouvent plusieurs candidats pouvant éventuellement jouer un rôle dans la régulation traductionnelle ou transcriptionnelle. On trouve par exemple une sous-unité d'un facteur initiateur de la traduction, des protéines homologues de régulateurs de l'assemblage de sous-unités ribosomales, des protéines à motif de liaison à l'ARN, etc....

Parmi ces candidats, ceux étant sur-exprimés dans le mutant, pourraient potentiellement être des activateurs de la différenciation, tandis que ceux qui sont sous-exprimés pourraient être des répresseurs. De façon intéressante, plusieurs des candidats (*eIF4G*, *PABP*, *Pumilio*) sont des composants potentiels des « granules de stress », qui sont des structures séquestrant les complexes ARNm/ribosomes sous forme inactive en réponse au stress²⁰⁷. Le contrôle traductionnel est un des mécanismes de réponse au stress le plus précoce et pourrait se trouver en amont de la régulation transcriptionnelle par *BFD1*. Il faudrait réaliser des études fonctionnelles de ces candidats en générant des mutants conditionnels dans une souche de type II afin de déterminer leur implication dans le processus de différenciation.

Le mutant *TglscU* peut donc être un outil d'étude qui pourrait mener à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires permettant d'induire la persistance de *T. gondii*.

La voie SUF est importante pour l'homéostasie lipidique.

La perturbation de la voie de biosynthèse des centres [Fe-S] de la mitochondrie ne semble pas entraîner de défaut morphologique particulier pour les parasites, y compris au niveau de l'organelle. Par contre, concernant la voie SUF, on a pu voir que lorsque l'expression des protéines de l'apicoplaste TgSufS et TgSufC est impactée, alors les parasites ont des conséquences visibles aux niveaux morphologique et cellulaire. En effet, nous avons démontré qu'une perturbation dans l'expression de ces protéines entraîne un défaut de réplication ainsi qu'une perte d'apicoplaste. Pour l'organelle, ce phénomène est malgré tout assez tardif et ne reste que partiel. De façon plus précoce nous avons pu observer des perturbations du processus de division et une altération de la pellicule des parasites. La pellicule est constituée d'un complexe tri-membranaire, comportant la membrane plasmique externe ainsi que l'IMC, lui-même constitué de deux membranes très proches l'une de l'autre. Ces composants membranaires ont un rôle essentiel dans la structure et la motilité des parasites.

Or, l'apicoplaste, qui héberge aussi la voie de biosynthèse FASII, est une organelle cruciale pour le maintien de l'homéostasie lipidique des tachyzoïtes^{133,137}. Nous avons montré, avec le défaut de lipoylation de la sous-unité E2 de la PDH dans les mutants apicoplastiques de TgSufS et TgSufC, que la fonction de la protéine [Fe-S] LipA est altérée par les déplétions de ces protéines. La PDH a un rôle important pour générer l'acetyl-CoA, un précurseur essentiel de la voie de synthèse des acides gras dans l'organelle. Il a récemment été montré que les différentes sous-unités de la PDH sont importantes pour la croissance des parasites et la synthèse d'acides gras²⁰⁰. La caractérisation phénotypique de plusieurs mutants déficients pour la synthèse d'acides gras dans l'apicoplaste montre des défauts au niveau de la pellicule et de la division cellulaire^{208,209}. De plus, l'utilisation du Triclosan²¹⁰, un inhibiteur de la voie FASII de l'apicoplaste, conduit également à des défauts de formation de la pellicule, engendrant des problèmes de division cellulaire. Il nous faut étudier plus en détail les conséquences morphologiques de la perte de TgSufS et TgSufC, mais il semblerait que nous observions un phénotype similaire.

Les analyses lipidomiques des mutants SufS et SufC semblent indiquer une diminution des acides gras à chaîne courte (ceux générés dans l'apicoplaste), alors que ceux à chaîne longue (ceux fabriqués dans l'ER à partir de précurseurs de l'apicoplaste ou issus de la cellule hôte) ne varient pas. Cela semble donc confirmer que la perturbation de la voie de synthèse des centres [Fe-S] de l'apicoplaste impacte fortement la synthèse de lipides dans l'organelle. En compensation, les parasites pourraient utiliser plus de précurseurs en provenance de la cellule hôte. C'est d'ailleurs ce qui semble ressortir de

l'analyse en protéomique quantitative du mutant SufS, qui montre une augmentation de l'expression de plusieurs enzymes de l'ER potentiellement impliquées dans la prise en charge des lipides de l'hôte. Des expériences de marquages de précurseurs lipidiques de l'hôte et d'analyse lipidomique, effectuées sur les deux mutants SufS et SufC par nos collaborateurs de l'IAB de Grenoble devraient bientôt nous permettre d'en savoir plus à ce sujet.

La voie SUF, au carrefour de plusieurs voies métaboliques importantes dans l'apicoplaste ?

L'origine de l'apicoplaste et les voies métaboliques importantes qu'il héberge, en font une cible particulièrement intéressante pour la recherche de nouveaux traitements anti-parasitaires. Notre étude concernant la voie SUF nous a permis, en plus d'attester de sa présence chez *T. gondii*, de mettre en évidence son importance pour l'intégrité de l'apicoplaste, avec un possible impact de la voie FASII de synthèse de lipides. Mais du fait des nombreuses voies indispensables hébergées dans cette organelle, il se peut également que la voie FASII ne soit pas la seule à subir des dysfonctions lorsque la voie SUF est impactée. En effet, il s'avère que l'apicoplaste héberge, entre autres, la voie de biosynthèse des isoprénoides non dépendante du mévalonate (MEP/DOXP) qui est essentielle aux tachyzoïtes¹⁴³. Les isoprénoides sont des précurseurs essentiels aux membranes des cellules eucaryotes par production de composés servant à la formation de protéines membranaires et ancres GPI^{124,140}. Les parasites apicomplexes les produisent d'une façon différente de leurs hôtes mammifères : en utilisant la voie du MEP, qui est une alternative à la voie du mévalonate, et que l'on retrouve également dans les plastides des plantes et dans certaines bactéries^{131,132,140}. Or, il s'avère que deux protéines importantes pour cette voie sont des protéines à centres [Fe-S] : IspG et IspH. Par homologie de séquences et prédictions de fonction, on voit que les apicomplexes *P. falciparum* et *T. gondii*, ainsi que l'algue *C. velia* (très proche génétiquement des apicomplexes), comportent des protéines prédites comme similaires (**Figure 41**).

FONCTIONS	PROTEINES BACTERIENNES (<i>E.coli</i>)	HOMOLOGUES VEGETAUX (<i>A.thaliana</i>)	HOMOLOGUES CHROMERIDE (<i>C.velia</i>)	HOMOLOGUES APICOMPLEXES (<i>P.falciparum</i>)	HOMOLOGUES APICOMPLEXES (<i>T.gondii</i>)
4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	IspH (BAB96598)	IspH (At4g34350)	Cvel_2579	IspH/LytB (PF3D7_0104400)	TGME49_227420
4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	IspG (BAA16402)	ISPG (At5g60600)	Cvel_23671	IspG/GcpE (PF3D7_1022800)	TGME49_262430

Figure 42: Protéines homologues putatives d'IspG et IspH de *E. coli* chez différents organismes végétaux et apicomplexes.

IspG et IspH sont connues pour être des cibles de stratégies antibactériennes^{211,212} visant à perturber les protéines à centres [Fe-S]. Ce métabolisme est crucial pour les apicomplexes : la voie de synthèse des isoprénoides est par exemple la seule fonction de l'apicoplaste qui est essentielle pour la survie des stades érythrocytaires de *P. falciparum*¹⁴¹ par exemple et elle est importante pour les tachyzoïtes de *T. gondii*¹⁴³ également. En plus de la dérégulation de l'homéostasie lipidique entraînée par la perturbation de la voie SUF, des effets sur la fonction des protéines homologues putatives d'IspH et G

(respectivement : TGME49_227420 et TGME49_262430) pourraient également contribuer au phénotype léthal observé. Cela renforcerait d'autant plus l'intérêt d'essayer de développer des inhibiteurs de la voie SUF pour découvrir de nouvelles approches thérapeutiques contre les apicomplexes responsables de la malaria^{213,214} et de la toxoplasmose .

Conclusion

Au cours de ma thèse j'ai donc pu mener à bien l'objectif principal qui était de caractériser de nouvelles voies de biosynthèse au sein d'organelles d'origines endosymbiotiques et d'évaluer leur impact sur le développement du parasite.

Le chemin reste long puisque nous sommes uniquement au début de l'étude de ces voies, mais d'après les différences biologiques observées, elles peuvent être de très bons outils pour l'identification de nouveaux candidats thérapeutiques. L'étude de la voie ISC pourrait alors permettre d'identifier les mécanismes liés à l'entrée en phase latente des parasites. Cela rendrait alors possible l'étude de cibles potentielles pour des nouvelles molécules pharmaceutiques permettant, dans l'idéal, le traitement de la toxoplasmose chronique. Quant à l'étude approfondie de la voie SUF, elle pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans la lutte contre la toxoplasmose aiguë.

Annexes :

Annexe 1: Tableau répertoriant les protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des centres Fe-S à la mitochondrie (ISC), au sein d'espèces représentatives de l'évolution. Protéines en italique = non caractérisées

VOIE	FONCTIONS	PROTEINES	HOMOLOGUES	HOMOLOGUES	HOMOLOGUES	HOMOLOGUES	HOMOLOGUES	HOMOLOGUES	HOMOLOGUES
		<i>E. coli</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. vicina</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>T. gondii</i>	
	Cysteine désulfurase	IsCS (BAA16424) ¹	NFS1 (HGNC:15910) ²	NFS1; NFS1 (At5g65720) ³	Nfs-like/IsCS (cgd4_3040) ⁴	Cysteine désulfurase (Cvel_27718)	IsCS /NFS1 (PF3D7_0727200) ⁵	(TGME49_211090)	
	Cysteine désulfurase partenaire	/	ISD11; LYRLM4 (HGNC:21365) ⁶	Isd11; MAF19; Lym4 (At5g61220)	/	(Cvel_33324)	(PF3D7_1311000) ⁵	/	
	Assemblage de cluster	IsCU (BAA16423) ⁷	ISCU; NIFUN (HGNC:29882) ⁸	IsU1; IsCU1 (At4g22220) ⁹	/	Nifu-like (Cvel_31875)	IsCU1 (PF3D7_1454500)	IsCU (TGME49_237560) ¹⁰	
	Assemblage de cluster	/	/	Isu2; IsCU2 (At3g01020) ¹¹	IsCU-like (cgd6_1050) ⁴	NifuN (Cvel_5443)	NFU1 (PF3D7_0930900)	Protéine famille Nifu (TGME49_212930) / (TGME49_221922)	
	Assemblage de cluster	/	/	Isu3; IsCU3 (At4g04080) ¹¹	/	/	/	/	
	Assemblage de cluster	NfuA; yfhI (BAE77877)	NFU1; HIRIP5 (HGNC:16287) ¹²	NFU1; NIFU1 (At4g01940) ¹³	/	/	Nifu (PF3D7_0921400)		
	Assemblage de cluster	/	/	NFU2; NIFU2 /CnfU (At5g49940) ¹³	/	/	/	/	
	Assemblage de cluster	/	/	NFU3 (At4g25910) ¹³	/	/	/	/	
	Assemblage de cluster	/	/	NFU4; NIF4 (At3g20970) ¹³	/	Nifu-like (Cvel_5443) / Cvel_1427			
	Assemblage de cluster	/	/	NFU5; NIFU5 (At1g51390) ¹³	/	/	/	/	
	Assemblage de cluster	IsCA (BAA16422) ⁷	ISCA1; HBLD2 (HGNC:28660) ¹⁴	IsC1-like; IsA; IsCA (At2g16710) ¹⁵	/	(Cvel_28660)	IsCA2 (PF3D7_0322500) / (PF3D7_0207200)	IsCA (TGME49_213810)	
	Assemblage de cluster	/	/	IsA3; IsCA3 (At2g36260)	/	/	/	/	
	Assemblage de cluster	/	ISCA2; HBLD1 (HGNC:19857) ¹⁴	IsA4; IsCA4 (At5g03905)	/	IsCA1-like (Cvel_28660) / IsCA-like 2 (Cvel_9596)	IsCA1 (PF3D7_0207200)	HesB-like protéine (TGME49_297925)	
	Facteur de transcription régulateur	IsCR; yfhP (BAA16425) ¹⁶	/	/	/	/	/	/	
	Liaison fer	IsCX; yfhI (BAA16414) ¹⁷	/	/	/	IsCX (Cvel_14554)	IsCX / yfhI (PF3D7_1361600)	/	
	Glutaredoxine	GRXD; ydhD (BAA15420) ¹⁸	GLRX5 (HGNC:20134) ¹⁹	GRXS15 (At3g15660) ²⁰	Glutoredoxine-like 2 (cgd6_3970)	Glutoredoxine 5 (Cvel_22872)	GRXS15/GLP2 (PF3D7_0606900) ²¹	(TGME49_268730)	
	Possible donneur d'électron	Cyay (BAE77494) ²²	Fratxin (FXN; FRDA) (HGNC:3951) ²³	Fratixine (FH) (At4g03240) ²⁴	/	(Cvel_31480)	/	Cyay (TGME49_262810)	
	Transport mitochondrial (carnière)	/	Mitoferrine 1 (HGNC:29786) ²⁵	(At1g07030)	(cgd2_1030)	/	(PF3D7_0905200)	/	

Annexe 1 : Suite. Protéines en italique = non caractérisées

VOIE	FONCTIONS	PROTEINES <i>E. coli</i>	HOMOLOGUES <i>H. sapiens</i>	HOMOLOGUES <i>A. thaliana</i>	HOMOLOGUES <i>C. parvum</i>	HOMOLOGUES <i>C. velia</i>	HOMOLOGUES <i>P. falciparum</i>	HOMOLOGUES <i>T. gondii</i>
ISC	Sulphydryl oxydase FAD dependent	/	GFER; ALR; HERV1 (HGNC:4236) ²⁶	ERV1 ; ALR (At1g49880) ²⁷	Proteine famille ERV/ALR (cgd6_2470)	ALR (Cvel_1351)	ERV1 (PF3D7_0110200) ²⁸	Proteine famille Erv1/Alr (TGME49_210787)
	Assemblage de cluster/ modification ARNt	YgfZ (BAE76963) ²⁹	IBA57 (HGNC:27302) ¹⁴	Iba57 (At4g12130) ³⁰	/	/	(PF3D7_1452200)	YgfZ (TGME49_267560)
	Transfert electron/ adrenoxine oxidoreductase	Ygfk (BAE76944) ³¹	FDXR ; ADXR (HGNC:3642) ³²	ADXR; MFDR (At4g32360) ³³	mtFNR (cgd8_2710) ³⁴	(Cvel_14280)	ADRX (PF3D7_1139700)	(TGME49_261030)
	Ferrédoxine/adrenoxine (apport Fe/ transport electron)	Fdx (BAA16415) ⁷	FDX1 (HGNC:3638) ³⁵ et FDX2 (HGNC:30546)	ADX1; MDFX2 (At4g21090) ³³	Fd1 ; mtFd -II (cgd6_3000) ³⁴	(Cvel_14675)	(PF3D7_1214600)	(TGME49_240670)
	Ferredoxine/adrenoxine (apport Fe/ transport électrons)	/	/	ADX2; MDFX1 (At4g05450) ³³	/	(Cvel_17684)	/	(TGME49_236000)
	Co-chaperonne	/	GRPEL1 (HGNC:19696) ³⁶	MGE1a; MGE2 (At4g26780) ³⁷	GrpE (cgd5_3510)	GrpE (Cvel_17825)	MGE1/GrpE homologue (PF3D7_1124700)	GrpE (TGME49_265220)
	Co-chaperonne	/	GRPEL2 (HGNC:21060)	MGE1b; MGE1 (At5g55200) ³⁷	/	/	/	/
	DnaK-like co-chaperonne liant le motif LYR	HscB; yfhE; Hsc20 (BAA16421) ⁷	HSCB; DNAJC20 (HGNC:28913) ³⁸	HscB (At5g06410) ³⁹	DNAJ (cgd3_2810)	HscB (Cvel_13897)	HscB (PF3D7_0920100)	HscB (TGME49_288685)
	DnaJ-like chaperonne	HscA (BAA16420) ⁷ /DnaK (BAB96589) / HscC (BAA35297)/ yegD (BAA15927)	HSPA9; mortaline (HGNC:5244) ⁴⁰	AtHscA1; mtHSC70-1 (At4g37910) ⁴¹	Hsp70 (cgd3_3440) ⁴²	chaperonne DnaK (Cvel_27211)	HscA (PF3D7_1134000)	Heat shock protein (TGME49_251780)
	Complexe I : assemblage	/	NUBPL ;Ind1 (HGNC:20278) ⁴³	INDL; IND1-like; INDH (At4g19540) ⁴⁴	/	Nubp1 (Cvel_19821)/ homologue mrp (Cvel_1712), (Cvel_23131)	(PF3D7_1128500)	Proteine famille MRP (TGME49_318590)
ISC /CIA	DnaJ-like chaperonne	/	/	AtHscA2; mtHSC70-2 (At5g09590) ⁴⁵	/	/	/	/
	ABC transporteur mitochondrial	CydD (BAA35612) ⁴⁶ / MsbA (BAA35658)	ABCB6; MTABC3 (HGNC:47) ⁴⁷ / ABCB7 (HGNC:48) ⁴⁸	ABCB23; Atm1 (At4g28630) ⁴⁹	/	/	/	/
	ABC transporteur mitochondrial	/	ABCB8;MABC1 (HGNC:49) ⁵⁰	ABCB24; Atm2 (At4g28620) ⁴⁹	/	/	/	/
	ABC transporteur mitochondrial	/	ABCB9; KIAA1520 (HGNC:50) ⁵¹	Atm3; Sta1; ABCB25 (At5g58270) ⁵²	ATM1like; CpABC (cgd1_1350) ⁵³	ABC transporteur famille B (Cvel_10118)	ATM3/MDR2 (PF3D7_1447900) ⁵⁴	(TGME49_269000)

Annexe 2: Tableau répertoriant les protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des centres Fe-S cytoplasmique (CIA), au sein d'espèces représentatives de l'évolution. Protéines en italique = non caractérisées

VOIE	FONCTIONS	PROTEINES <i>E. coli</i>	HOMOLOGUES <i>H. sapiens</i>	HOMOLOGUES <i>A. thaliana</i>	HOMOLOGUES <i>C. parvum</i>	HOMOLOGUES <i>C. velia</i>	HOMOLOGUES <i>P. falciparum</i>	HOMOLOGUES <i>T. gondii</i>
CIA	Transport électron	/	CIAPIN1; Anamorsine (HGNC:28050) ⁵⁵	Dre2; Ciapin1 (At5g18400) ⁵⁶	<i>Anamorsine</i> (<i>cgd6_4130</i>)	<i>Homologue anamorsine</i> (<i>CveI_5527</i>)	<i>Dre2/MAL8P1</i> (PF3D7_0824600)	(TGME49_216900)
	Transport électron	/	NDOR1; NR1 (HGNC:29838) ⁵⁷	Tah18; Atr3 (At3g02280) ⁵⁸	(<i>cgd4_1330</i>)	(<i>CveI_6121</i>)	(PF3D7_1450300)	(TGME49_249320)
	Adaptateur entre voie CIA et apoprotéine / ADN réparation	/	MMS19 (HGNC:13824) ⁵⁹	Met18; Mms19 (At5g48120) ⁶⁰	<i>MMS19</i> (<i>cgd4_180</i>)	<i>MMS19</i> (<i>CveI_16316</i>)	<i>MMS19-like</i> (PF3D7_0505000)	(TGME49_222230)
	Assemblage/transfert de cluster	/	CIAO1 (HGNC:14280) ⁶¹	Cia1; emb1345 (At2g26060) ⁶²	/	(<i>CveI_5245</i>)	<i>CiaO1/CIA1</i> (PF3D7_1209400)	<i>CIAO1</i> (TGME49_313280)
	Facilite transfert cluster à IRP1	/	FAM96A/CIAO2A (HGNC:26235) ⁶³	/	/	/	/	/
	Assemblage de cluster	/	FAM96B; CIAO2B; MIP18 (HGNC:24261) ⁶³	Cia2; AE7; MEP18; (At1g68310) ⁶²	(<i>cgd7_5070</i>)	<i>MIP18</i> (<i>CveI_1059</i>)	<i>Ae7 /CIA2</i> (PF3D7_0703100)	<i>Hypothetical</i> (TGME49_306590)
	Assemblage/transfert de cluster	/	NARF (HGNC:29916) / CIAO3; NARFL (HGNC:14179) ⁶⁴	Nar1; Gollum (At4g16440) ⁶⁵	<i>Narf-like</i> (<i>cgd1_190</i>)	<i>NarfL</i> (<i>CveI_25862</i>)	<i>Nar1</i> (PF3D7_0614200)	(TGME49_242580)
	Assemblage de cluster	/	NUBP1 (HGNC:8041) ⁶⁶	Nbp35 (At5g50960) ⁶⁷	<i>Nubp1</i> (<i>cgd8_3140</i>)	<i>Nubp1</i> (<i>CveI_19821</i>)	<i>Nbp35</i> (PF3D7_0910800)	<i>Nbp35</i> (TGME49_280730)
	Assemblage de cluster	<i>CFD1; DRE3</i> (S000001265)	CFD1; NUBP2 (HGNC:8042) ⁶⁸	/	/	/	/	/

Annexe 3: Tableau répertoriant les protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des centres Fe-S apicoplastique (SUF), au sein d'espèces représentatives de l'évolution. Protéines en italique = non caractérisées

VOIE	FONCTIONS	PROTÉINES <i>E. coli</i>	HOMOLOGUES <i>H. sapiens</i>	HOMOLOGUES <i>A. thaliana</i>	HOMOLOGUES <i>C. parvum</i>	HOMOLOGUES <i>C. velia</i>	HOMOLOGUES <i>P. falciparum</i>	HOMOLOGUES <i>T. gondii</i>
SUF	Carrière Type A : transport	SufA; ydiC (BAA15453) ⁶⁹	/	SufA1; CplscA (At1g10500) ¹⁵	/	/	SufA (PF3D7_0522700) ⁷⁰	<i>HesB-like</i> (TGME49_297925)
	Assemblage de cluster	SufB; ynhE (BAA15454) ⁶⁹	/	SufB; NAP1; ABCI8 (At4g04770) ⁷¹	/	<i>Ycf24 (Cvel_4495)</i>	SufB (PF3D7_API04700) ⁷²	<i>ycf24</i> (TGME49_300650)
	Protéine assemblage / ATPase de la cassette de liaison à l'ATP	SufC; ynhD (BAA15455) ⁶⁹	/	SufC; NAP7; ABCI6 (At3g10670) ⁷³	/	<i>Ycf16 (Cvel_14)</i>	SufC (PF3D7_1413500) ⁷²	(TGME49_225800) ¹⁰
	Protéine assemblage /apport Fe (proposée)	SufD; ynhC (BAA15456) ⁶⁹	/	SufD; NAP6; ABCI7 (At1g32500) ⁷⁴	/	<i>ABCI7 (Cvel_17786)</i>	<i>SufD (PF3D7_1103400)</i>	<i>SufB/D</i> (TGME49_273445)
	Cysteine désulfurase	SufS ; csdB; ynhB (BAA15457) ¹	/	CpSufS; NFS2; CpNifS1 (At1g08490) ³	/	<i>(Cvel_2564)</i>	SufS (PF3D7_0716600) ⁵	<i>SufS</i> (TGME49_216170) ¹⁰
	Activateur de désulfurase NFS1/NFS2	SufE; ynhA (BAE76500) ⁷⁵	/	SufE1/E2; CpSufE1 (At4g26500) ⁷⁶	/	<i>SufE-like</i> (Cvel_21762)	SufE (PF3D7_0206100) ⁵	<i>SufE</i> (TGME49_277010)
	Activateur de désulfurase NFS2	/	/	SufE2; CpSufE2 (At1g67810) ⁷⁷	/	/	/	/
	Quinolinate synthase A / activateur de désulfurase NFS2	NadA (BAA35409) ⁷⁸	/	SufE3; CpSufE3; QS (At5g50210) ⁷⁷	/	/	/	/
	Non Carrière Type A : transport, facteur adressage	/	/	NIFU3; CNFU3; NFU3 (At4g25910) ⁷⁹	/	<i>NifU-like 2</i> (Cvel_22466)	<i>SufU/NifU-like</i> (PF3D7_0921400)	<i>Protéine famille NifU</i> (TGME49_212930)
	Glutaredoxine	GrxD ; ydhD (BAA15420) ¹⁸	/	GRXS14; CXIP1 (At3g54900) ⁸⁰	glutaredoxine-like 2 (cgd6_3970)	<i>Glutaredoxine-5</i> (Cvel_22872) / <i>Glutaredoxine-3</i> (Cvel_1427)	GLP1; GRXS14 (PF3D7_0304500) ²¹ / GLP2; GRXS16 (PF3D7_0606900) ²¹	(TGME49_247580) / (TGME49_268730)
	Glutaredoxine	/	/	GRXS16 ; CXIP2 (At2g38270) ⁸¹	/	<i>Peroxioredoxine 2E2</i> (Cvel_1315)	/	(TGME49_238070)
	Possible protéine assemblage / transport	Mrp (BAE76591) ⁸²	MARCKSL1/MRP (HGNC:7142) ⁸³	HCF101 (At3g24430) ⁸⁴	/	<i>Homologue mpr</i> (Cvel_17212) / (Cvel_19821)/ (Cvel_23131)	<i>HCF101</i> (PF3D7_1128500)	Protéine famille MRP ; HCF101 (TGME49_318590) ⁸⁵
	Possible ferredoxine / transfert electron	Fpr (BAE77386) ⁸⁶	/	FD1 (At1g10960) ⁸⁷ ; FD2 (At1g60950); FD3 (At2g27510); FD4 (At5g10000)	/	<i>(Cvel_10809)</i>	Frd/FD (PF3D7_1318100) ⁸⁸	FD (TGME49_215070) ⁸⁸
	Reductase	FNR; niR (BAA14927) ⁸⁹	/	DFRA (At5g42800) ⁹⁰	/	<i>(Cvel_4823)</i>	FNR (PF3D7_0623200) ⁸⁸	<i>Protéine famille BoIA</i> (TGME49_239320) / (TGME49_298990)

Annexe 4 : Identification par protéomique quantitative des voies affectées par la déplétion de TgSufS ou TgIsclU.

ToxoDB ID	CRISPR Fitness score μ	Predicted location $\S$	Product Description	Cellular process
TGGT1_209770	-4.09	nucleus	putative helicase	DNA repair and replication
TGGT1_215550	-2.4	-	exonuclease V	DNA repair and replication
TGGT1_216870	-4.33	nucleus	DNA excision repair helicase	DNA repair and replication
TGGT1_258030	-4.45	nucleus (HyperLOPIT)	DNA polymerase	DNA repair and replication
TGGT1_264670	-0.2	nucleus	DNA polymerase	DNA repair and replication
TGGT1_297840	-4.86	nucleus	DNA primase, large subunit	DNA repair and replication
TGGT1_305920	-0.96	nucleus (HyperLOPIT)	DNA glycosylase/endonuclease-like	DNA repair and replication
TGGT1_313470	0.24	nucleus	DNA glycosylase/endonuclease-like	DNA repair and replication
TGGT1_215070	-4.35	apicoplast (HyperLOPIT)	ferredoxin (FD)	Electron transfer
TGGT1_236000	0.2	mitochondrion (HyperLOPIT)	ferredoxin (FD)	Electron transfer
TGGT1_240670	-2.45	mitochondrion (HyperLOPIT)	ferredoxin (FD)	Electron transfer
TGGT1_265230	-2.37	mitochondrion	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	Electron transfer
TGGT1_251390	-0.08	mitochondrion	rieske [2Fe-2S] domain-containing protein	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_320220	-5.76	mitochondrion (HyperLOPIT)	putative ubiquinol cytochrome c oxidoreductase	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_254030	-4.26	mitochondrion (HyperLOPIT)	NEET family, zinc finger CDGSH-type domain-containing protein, TgApiCox13	Mitochondrial respiratory chain
TGGT1_215280	-2	mitochondrion (HyperLOPIT)	succinate dehydrogenase	Mitochondrial respiratory chain/TCA cycle
TGGT1_267330	-3.5	mitochondrion (HyperLOPIT)	fumarate hydratase	TCA cycle
TGGT1_226730	-4.73	mitochondrion (HyperLOPIT)	aconitate hydratase ACN/IRP	TCA cycle/iron sensor
TGGT1_211090	-3.54	mitochondrion (HyperLOPIT)	IscS desuphase	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_212930	-1.03	mitochondrion (HyperLOPIT)	NifU-like protein	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_213810	-4.52	mitochondrion	IscA	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_216170	-3.95	apicoplast (HyperLOPIT)	SufS subfamily cysteine desulfurase	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_216900	-2.88	mitochondrion (HyperLOPIT)	Anamorsin/DRE2-like	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_221922	-0.76	apicoplast/ER (HyperLOPIT)	NifU family domain-containing protein	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_237560	-5.99	mitochondrion (HyperLOPIT)	IscU	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_239320	0.1	apicoplast (HyperLOPIT)	SufE-like, BolA family protein	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_242580	-4.36	mitochondrion (HyperLOPIT)	Nar1-like Fe-hydrogenase	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_273445	-5.29	apicoplast (HyperLOPIT)	SufD	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_280730	-4.81	mitochondrion (HyperLOPIT)	Mrp/NBP35 subfamily of P loop NTPases	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_297925	-4.01	apicoplast	SufA	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_300650	N/A (apicoplast-encoded)	apicoplast	SufB	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_318590	-3.24	cytoplasm (HyperLOPIT)	Mrp/NBP35 subfamily of P loop NTPases, HCF101-like	Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_230070	2.11	cytoplasm	BolA2 family protein	GRX-interacting/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_227150	1.39	apicoplast (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_238070	-0.65	cytoplasm (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_247580	-0.07	rhophry (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_268730	-2.13	mitochondrion (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_279400	1	cytoplasm (HyperLOPIT)	putative glutaredoxin (GRX)	Redox reactions/Fe-S cluster biosynthesis
TGGT1_288640	2.29	mitochondrion	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like, coproporphyrinogen dehydrogenase, CPDH	Heme biosynthesis
TGGT1_227420	-6.01	apicoplast (HyperLOPIT)	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase, IspH/LytB	Isoprenoid biosynthesis, MEP pathway
TGGT1_262430	-4.41	apicoplast (HyperLOPIT)	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase, IspG/GcpE	Isoprenoid biosynthesis, MEP pathway
TGGT1_226400	-0.97	apicoplast (HyperLOPIT)	lipoic acid synthase LIPA	Lipoic acid synthesis
TGGT1_213780	-2.92	mitochondrion	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like, Molybdopterin cofactor synthesis protein 1, MOCS1	Molybdopterin synthesis
TGGT1_207620	-1.15	mitochondrion (HyperLOPIT)	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein	Oxidative stress response
TGGT1_249630	1.63	mitochondrion (HyperLOPIT)	glutathione S-transferase domain-containing protein	Oxidative stress response
TGGT1_304660	0.74	mitochondrion (HyperLOPIT)	glutathione S-transferase domain containing protein	Oxidative stress response
TGGT1_255910	1.64	mitochondrion (HyperLOPIT)	NEET family, zinc finger CDGSH-type domain-containing protein	Regulation of iron and reactive oxygen metabolism
TGGT1_260870	0.92	mitochondrion (HyperLOPIT)	NEET family, zinc finger CDGSH-type domain-containing protein	Regulation of iron and reactive oxygen metabolism
TGGT1_204540	-0.22	-	DUF367 domain-containing protein	rRNA biogenesis?
TGGT1_209790	-1.82	mitochondrion (HyperLOPIT)	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like	rRNA methyltransferase
TGGT1_252465	-4.12	mitochondrion	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like	rRNA methyltransferase
TGGT1_238190	-4.42	nucleus (HyperLOPIT)	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_249560	-4.38	-	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_261540	-3.54	nucleus (HyperLOPIT)	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_267390	-5.2	nucleus (HyperLOPIT)	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_313120	-4.48	-	DNA-directed RNA polymerase	Transcription
TGGT1_216790	-4.11	nucleus (HyperLOPIT)	putative ATP-binding cassette sub-family E member 1	Translation
TGGT1_261060	-1.94	-	diphthamide biosynthesis protein 2-related	Translation
TGGT1_272270	0.41	-	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like, demethylwyosine synthase	tRNA modification
TGGT1_273140	-0.23	apicoplast	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like methylthiotransferase, MiaB/RimO family protein	tRNA modification
TGGT1_305480	-3.28	mitochondrion (HyperLOPIT)	elongator complex protein ELP3	tRNA modification
TGGT1_314000	1.1	nucleus (HyperLOPIT)	putative peptide methionine sulfoxide reductase msrB	tRNA modification
TGGT1_315958	0.66	-	radical S-adenosyl-L-methionine (SAM)-like, demethylwyosine synthase	tRNA modification
TGGT1_213870	-4.83	cytoplasm (HyperLOPIT)	UBA/TS-N domain-containing protein	Ubiquitin associated

Annexe 5 : Séquences génomique des amorces utilisées pour le projet TgSufC.

Amorces	Séquences
ML801	GAAGACATCCACCAAACGG
ML1432	GAAGAACGACGCTGCAAAC
ML1433	TTGCCATGTCAAGTTCCTACC
ML1476	CAGCGTAGTCCGGGACGTCGTAC
ML 2087	GCTCCACGTCCCTCACCAT
ML 2088	ATGGTGAGGGACGTGGGAGC
ML3190	TCCCGTTACAGGTGTACGGG
ML3445	CAGGGCTTCTAAATGGCGC
ML3446	GCGCCATTTTAGAAGCCCTG
ML3952	aagtGTTGAGGTACGATGTGAACAT
ML3953	aaaaATGTTACATCGTACCTCAAC
ML3980	GCGGCAGACGCAATCTAGACCGCCTGCTCTACCCGTACGACGTCC
ML3981	GGTTTGGCATGAAATTACTGTTACACCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCC
ML3984	CGATCTGAGTGCACAGCGAGCC
ML3986	CGATTCTTCGGTAGCAATCCAAGAC
ML4009	AGCCATATGCCGCTCCTCGAGATCAAAG
ML4010	GCCGGATCCTTAGAGCAGGCGGTCTAG
ML4011	AGCCATATGAAAGAACAGGACGAAATG
ML4012	GCCGGATCCCTAGCTGCTTTGTA
ML4013	AGCCATATGGGCGACAAGGAGATCCTC
ML4014	GCCGGATCCTCAGACTTTGCCCTTGTC
ML4048	GCGGCAGACGCAATCTAGACCGCCTGCTCtaccgtagacgtcccgac
ML4107	TCTGTCTTCCGCGAACCTGAGTTCCGCTTGAAGCTTCGCCAGGCTGTA
ML4108	CTCAACAAGGAACACTGGTAGCGACGCCATAGATCTGGTTGAAGACAGAC
ML4163	GGAAAGGGTAGATCTTCCCGATCCGTT
ML4164	AACGGATCGGGAAGATCTACCCTTTCC
ML4184	AACGGATCGGGAGCATCTACCCTTTCC
ML4185	GGAAAGGGTAGATGCTCCCGATCCGTT
ML4409	aagtGTTCCGCTTGATGAGAAGGCG
ML4410	aaaaCGCCTTCTCATCAAGCGGAAC
ML 4815	TTTAGATCTATGGCGTCGCTACCAGTG
ML 4816	TTTCCTAGGGAGCAGGCGGTCTAGATTG

Références des tableaux concernant les homologues de protéines :

1. Mihara H, Maeda M, Fujii T, et al. A nifS-like Gene, csdB, Encodes an Escherichia coli Counterpart of Mammalian Selenocysteine Lyase. *J. Biol. Chem.* 1999;274(21):14768–14772.
2. Land T, Rouault TA. Targeting of a Human Iron–Sulfur Cluster Assembly Enzyme, nifs, to Different Subcellular Compartments Is Regulated through Alternative AUG Utilization. *Mol. Cell.* 1998;2(6):807–815.
3. Pilon-Smits EAH, Garifullina GF, Abdel-Ghany S, et al. Characterization of a NifS-Like Chloroplast Protein from Arabidopsis. Implications for Its Role in Sulfur and Selenium Metabolism. *Plant Physiol.* 2002;130(3):1309–1318.
4. LaGier MJ, Tachezy J, Stejskal F, Kutisova K, Keithly JS. Mitochondrial-type iron–sulfur cluster biosynthesis genes (IscS and IscU) in the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology.* 2003;149(12):3519–3530.
5. Gisselberg JE, Dellibovi-Ragheb TA, Matthews KA, Bosch G, Prigge ST. The Suf Iron-Sulfur Cluster Synthesis Pathway Is Required for Apicoplast Maintenance in Malaria Parasites. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003655.
6. Adam AC, Bornhövd C, Prokisch H, Neupert W, Hell K. The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J.* 2006;25(1):174–183.
7. Takahashi Y, Nakamura M. Functional Assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 Gene Cluster Involved in the Assembly of Fe-S Clusters in Escherichia coli. *J. Biochem. (Tokyo).* 1999;126(5):917–926.
8. Tong W-H. Distinct iron-sulfur cluster assembly complexes exist in the cytosol and mitochondria of human cells. *EMBO J.* 2000;19(21):5692–5700.
9. Tone Y, Kawai-Yamada M, Uchimiya H. Isolation and characterization of Arabidopsis thaliana ISU1 gene. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 2004;1680(3):171–175.
10. Pamukcu S, Cerutti A, Hem S, Rofidal V, Besteiro S. Differential contribution of two organelles of endosymbiotic origin to iron-sulfur cluster synthesis in Toxoplasma. *Microbiology*; 2021.
11. Frazzon APG, Ramirez MV, Warek U, et al. Functional analysis of Arabidopsis genes involved in mitochondrial iron–sulfur cluster assembly. *Plant Mol. Biol.* 2007;64(3):225–240.
12. Lorain S, Lécluse Y, Scamps C, Mattéi M-G, Lipinski M. Identification of human and mouse HIRA-interacting protein-5 (HIRIP5), two mammalian representatives in a family of phylogenetically conserved proteins with a role in the biogenesis of Fe/S proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 2001;1517(3):376–383.
13. Léon S, Touraine B, Ribot C, Briat J-F, Lobéraux S. Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from Arabidopsis thaliana. *Biochem. J.* 2003;371(3):823–830.
14. Sheftel AD, Wilbrecht C, Stehling O, et al. The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol. Biol. Cell.* 2012;23(7):1157–1166.
15. Abdel-Ghany SE, Ye H, Garifullina GF, et al. Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Chloroplasts. Involvement of the Scaffold Protein CplscA. *Plant Physiol.* 2005;138(1):161–172.
16. Schwartz CJ, Giel JL, Patschkowski T, et al. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of Escherichia coli genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001;98(26):14895–14900.
17. Kim JH, Bothe JR, Frederick RO, Holder JC, Markley JL. Role of IscX in Iron–Sulfur Cluster Biogenesis in Escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc.* 2014;136(22):7933–7942.
18. Yeung N, Gold B, Liu NL, et al. The E. coli Monothiol Glutaredoxin GrxD Forms Homodimeric and Heterodimeric FeS Cluster Containing Complexes. *Biochemistry.* 2011;50(41):8957–8969.
19. The Tübingen 2000 Screen Consortium, Wingert RA, Galloway JL, et al. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe–S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature.* 2005;436(7053):1035–1039.

20. Moseler A, Aller I, Wagner S, et al. The mitochondrial monothiol glutaredoxin S15 is essential for iron-sulfur protein maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015;112(44):13735–13740.
21. Deponte M, Becker K, Rahlfs S. Plasmodium falciparum glutaredoxin-like proteins. *Biol. Chem.* 2005;386(1):.
22. Roche B, Huguenot A, Barras F, Py B. The iron-binding CyaY and IscX proteins assist the ISC-catalyzed Fe-S biogenesis in *Escherichia coli*: *E. coli* frataxin and Fe-S biogenesis. *Mol. Microbiol.* 2015;95(4):605–623.
23. Cavadini P. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 2002;11(3):217–227.
24. Busi MV, Zabaleta EJ, Araya A, Gomez-Casati DF. Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 2004;576(1–2):141–144.
25. Shaw GC, Cope JJ, Li L, et al. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature.* 2006;440(7080):96–100.
26. Lisowsky T. Mammalian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig. Liver Dis.* 2001;33(2):173–180.
27. Levitan A, Danon A, Lisowsky T. Unique Features of Plant Mitochondrial Sulfhydryl Oxidase. *J. Biol. Chem.* 2004;279(19):20002–20008.
28. Eckers E, Petrungaro C, Gross D, et al. Divergent Molecular Evolution of the Mitochondrial Sulfhydryl:Cytochrome c Oxidoreductase Erv in Opisthokonts and Parasitic Protists. *J. Biol. Chem.* 2013;288(4):2676–2688.
29. Ote T, Hashimoto M, Ikeuchi Y, et al. Involvement of the Escherichia coli folate-binding protein YgfZ in RNA modification and regulation of chromosomal replication initiation. *Mol. Microbiol.* 2006;59(1):265–275.
30. Uzarska MA, Przybyla-Toscano J, Spantgar F, et al. Conserved functions of Arabidopsis mitochondrial late-acting maturation factors in the trafficking of iron-sulfur clusters. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 2018;1865(9):1250–1259.
31. Bébian M, Kirsch J, Méjean V, Verméglio A. Involvement of a putative molybdenum enzyme in the reduction of selenate by Escherichia coli. *Microbiology.* 2002;148(12):3865–3872.
32. Brandt ME, Vickery LE. Expression and characterization of human mitochondrial ferredoxin reductase in Escherichia coli. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992;294(2):735–740.
33. Takubo K, Morikawa T, Nonaka Y, et al. Identification and molecular characterization of mitochondrial ferredoxins and ferredoxin reductase from Arabidopsis. 14.
34. Lei C, Rider SD, Wang C, et al. The apicomplexan *Cryptosporidium parvum* possesses a single mitochondrial-type ferredoxin and ferredoxin:NADP + reductase system: An Apicomplexan Mitochondrial-Type Fd and FNR. *Protein Sci.* 2010;19(11):2073–2084.
35. Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, et al. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010;107(26):11775–11780.
36. Choglay AA, Chapple JP, Blatch GL, Cheetham ME. Identification and characterization of a human mitochondrial homologue of the bacterial co-chaperone GrpEq. 2001;10.
37. Hu C, Lin S, Chi W, Charng Y. Recent Gene Duplication and Subfunctionalization Produced a Mitochondrial GrpE, the Nucleotide Exchange Factor of the Hsp70 Complex, Specialized in Thermotolerance to Chronic Heat Stress in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2012;158(2):747–758.
38. Uhrigshardt H, Singh A, Kovtunovych G, Ghosh M, Rouault TA. Characterization of the human HSC20, an unusual DnaJ type III protein, involved in iron–sulfur cluster biogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(19):3816–3834.
39. Leaden L, Pagani MA, Balparda M, Busi MV, Gomez-Casati DF. Altered levels of AtHSCB disrupts iron translocation from roots to shoots. *Plant Mol. Biol.* 2016;92(4–5):613–628.
40. Shan Y, Cortopassi G. Mitochondrial Hspa9/Mortalin regulates erythroid differentiation via iron-sulfur cluster assembly. *Mitochondrion.* 2016;26:94–103.

41. Wei S-S, Niu W-T, Zhai X-T, et al. Arabidopsis mtHSC70-1 plays important roles in the establishment of COX-dependent respiration and redox homeostasis. *J. Exp. Bot.* 2019;70(20):5575–5590.
42. Šlapeta J, Keithly JS. Cryptosporidium parvum Mitochondrial-Type HSP70 Targets Homologous and Heterologous Mitochondria. *Eukaryot. Cell.* 2004;3(2):483–494.
43. Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, et al. Human Ind1, an Iron-Sulfur Cluster Assembly Factor for Respiratory Complex I. *Mol. Cell. Biol.* 2009;29(22):6059–6073.
44. Wydro MM, Sharma P, Foster JM, et al. The Evolutionarily Conserved Iron-Sulfur Protein INDH Is Required for Complex I Assembly and Mitochondrial Translation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2013;25(10):4014–4027.
45. Sung DY, Vierling E, Guy CL. Comprehensive Expression Profile Analysis of the Arabidopsis Hsp70 Gene Family. *Plant Physiol.* 2001;126(2):789–800.
46. Poole RK, Gibson F, Wu G. The cydD gene product, component of a heterodimeric ABC transporter, is required for assembly of periplasmic cytochrome c and of cytochrome bd in Escherichia coli. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994;117(2):217–223.
47. Mitsushashi N, Miki T, Senbongi H, et al. MTABC3, a Novel Mitochondrial ATP-binding Cassette Protein Involved in Iron Homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2000;275(23):17536–17540.
48. Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, et al. Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). 7.
49. Chen S, Sánchez-Fernández R, Lyver ER, Dancis A, Rea PA. Functional Characterization of AtATM1, AtATM2, and AtATM3, a Subfamily of Arabidopsis Half-molecule ATP-binding Cassette Transporters Implicated in Iron Homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2007;282(29):21561–21571.
50. Hogue DL et al. Identification and Characterization of a Mammalian Mitochondrial ATP-binding Cassette Membrane Protein. 11.
51. Wolters JC, Abele R, Tampé R. Selective and ATP-dependent Translocation of Peptides by the Homodimeric ATP Binding Cassette Transporter TAP-like (ABCB9). *J. Biol. Chem.* 2005;280(25):23631–23636.
52. Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, et al. A Mutation of the Mitochondrial ABC Transporter Sta1 Leads to Dwarfism and Chlorosis in the Arabidopsis Mutant *starik*. *Plant Cell.* 2001;13(1):89–100.
53. Perkins ME, Volkman S, Wirth DF, Le Blancq SM. Characterization of an ATP-binding cassette transporter in Cryptosporidium parvum1Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank data base with the accession number U90628.1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1997;87(1):117–122.
54. Rosenberg E, Litus I, Schwarzfuchs N, et al. pfmdr2 Confers Heavy Metal Resistance to Plasmodium falciparum. *J. Biol. Chem.* 2006;281(37):27039–27045.
55. Banci L, Ciofi-Baffoni S, Mikolajczyk M, et al. Human anamorsin binds [2Fe–2S] clusters with unique electronic properties. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 2013;18(8):883–893.
56. Bernard DG, Netz DJA, Lagny TJ, Pierik AJ, Balk J. Requirements of the cytosolic iron–sulfur cluster assembly pathway in Arabidopsis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2013;368(1622):20120259.
57. Paine MJ, Garner AP, Powell D, et al. Cloning and Characterization of a Novel Human Dual Flavin Reductase. *J. Biol. Chem.* 2000;275(2):1471–1478.
58. Varadarajan J, Guillemot J, Saint-Jore-Dupas C, et al. ATR3 encodes a diflavin reductase essential for Arabidopsis embryo development. *New Phytol.* 2010;187(1):67–82.
59. Seroz T. Cloning of a human homolog of the yeast nucleotide excision repair gene MMS19 and interaction with transcription repair factor TFIIH via the XPB and XPD helicases. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(22):4506–4513.
60. Han Y-F, Huang H-W, Li L, et al. The Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Protein MMS19 Regulates Transcriptional Gene Silencing, DNA Repair, and Flowering Time in Arabidopsis. *PLOS ONE.* 2015;10(6):e0129137.
61. Johnstone RW, Wang J, Tommerup N, et al. Ciao 1 Is a Novel WD40 Protein That Interacts with the Tumor Suppressor Protein WT1. *J. Biol. Chem.* 1998;273(18):10880–10887.

62. Luo D, Bernard DG, Balk J, Hai H, Cui X. The DUF59 Family Gene AE7 Acts in the Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly Pathway to Maintain Nuclear Genome Integrity in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2012;24(10):4135–4148.
63. Stehling O, Mascarenhas J, Vashisht AA, et al. Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B Integrate Iron Homeostasis and Maturation of Different Subsets of Cytosolic-Nuclear Iron-Sulfur Proteins. *Cell Metab*. 2013;18(2):187–198.
64. Barton RM, Worman HJ. Prenylated Prelamin A Interacts with Narf, a Novel Nuclear Protein. *J. Biol. Chem*. 1999;274(42):30008–30018.
65. Nakamura M, Buzas DM, Kato A, et al. The role of Arabidopsis thaliana NAR1, a cytosolic iron-sulfur cluster assembly component, in gametophytic gene expression and oxidative stress responses in vegetative tissue. *New Phytol*. 2013;199(4):925–935.
66. Shahrestanifar M, Saha DP, Scala LA, Basu A, Howells RD. Cloning of a human cDNA encoding a putative nucleotide-binding protein related to Escherichia coli MinD. *Gene*. 1994;147(2):281–285.
67. Bych K, Netz DJA, Vigani G, et al. The Essential Cytosolic Iron-Sulfur Protein Nbp35 Acts without Cfd1 Partner in the Green Lineage. *J. Biol. Chem*. 2008;283(51):35797–35804.
68. Roy A, Solodovnikova N, Nicholson T, Antholine W, Walden WE. A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. 10.
69. Aiba H, Baba T, Hayashi K, et al. A 570-kb DNA Sequence of the Escherichia coli K-12 Genome Corresponding to the 28.0–40.1 min Region on the Linkage Map. 3(6):16.
70. Haussig JM, Matuschewski K, Kooij TWA. Identification of Vital and Dispensable Sulfur Utilization Factors in the Plasmodium Apicoplast. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89718.
71. Xu XM, Adams S, Chua N-H, Møller SG. AtNAP1 Represents an Atypical SufB Protein in Arabidopsis Plastids*, S. 2006;16.
72. Kumar B, Chaubey S, Shah P, et al. Interaction between sulphur mobilisation proteins SufB and SufC: Evidence for an iron-sulphur cluster biogenesis pathway in the apicoplast of Plasmodium falciparum. *Int. J. Parasitol*. 2011;41(9):991–999.
73. Xu XM, Møller SG. AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for Arabidopsis embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2004;101(24):9143–9148.
74. Hjorth E, Hadfi K, Zauner S, Maier U-G. Unique genetic compartmentalization of the SUF system in cryptophytes and characterization of a SufD mutant in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett*. 2005;579(5):1129–1135.
75. Outten FW, Wood MJ, Muñoz FM, Storz G. The SufE Protein and the SufBCD Complex Enhance SufS Cysteine Desulfurase Activity as Part of a Sulfur Transfer Pathway for Fe-S Cluster Assembly in Escherichia coli. *J. Biol. Chem*. 2003;278(46):45713–45719.
76. Xu XM, Møller SG. AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in Arabidopsis. *EMBO J*. 2006;25(4):900–909.
77. M. NMU, Ollagnier-de-Choudens S, Sanakis Y, et al. Characterization of Arabidopsis thaliana SufE2 and SufE3. *J. Biol. Chem*. 2007;282(25):18254–18264.
78. Flachmann R, Kunz N, Seifert J, et al. Molecular biology of pyridine nucleotide biosynthesis in Escherichia coli. Cloning and characterization of quinolinate synthesis genes nadA and nadB. *Eur. J. Biochem*. 1988;175(2):221–228.
79. Nath K, Wessendorf RL, Lu Y. A Nitrogen-Fixing Subunit Essential for Accumulating 4Fe-4S-Containing Photosystem I Core Proteins. *Plant Physiol*. 2016;172(4):2459–2470.
80. Cheng N-H, Hirschi KD. Cloning and Characterization of CXIP1, a Novel PICOT Domain-containing Arabidopsis Protein That Associates with CAX1. *J. Biol. Chem*. 2003;278(8):6503–6509.
81. Dhalleine T, Rouhier N, Couturier J. Putative roles of glutaredoxin-BolA holo-heterodimers in plants. *Plant Signal. Behav*. 2014;9(5):e28564.
82. Dardel F, Panvert M, Blanquet S, Fayat G. Locations of the metG and mrp Genes on the Physical Map of Escherichia coli. 1.
83. Aderem A. The Marcks brothers: A family of protein kinase C substrates. *Cell*. 1992;71(5):713–716.

84. Lezhneva L, Amann K, Meurer J. The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe-4S]-cluster-containing complexes in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: [4Fe-4S] cluster assembly. *Plant J.* 2004;37(2):174–185.
85. Pyrih J, Žárský V, Fellows JD, et al. The iron-sulfur scaffold protein HCF101 unveils the complexity of organellar evolution in SAR, Haptista and Cryptista. *BMC Ecol. Evol.* 2021;21(1):46.
86. Bianchi V, Reichard P, Eliasson R, et al. *Escherichia coli* ferredoxin NADP⁺ reductase: activation of *E. coli* anaerobic ribonucleotide reduction, cloning of the gene (*fpr*), and overexpression of the protein. *J. Bacteriol.* 1993;175(6):1590–1595.
87. Hanke GT, Kimata-Arigo Y, Taniguchi I, Hase T. A Post Genomic Characterization of *Arabidopsis* Ferredoxins. *Plant Physiol.* 2004;134(1):255–264.
88. Seeber F, Aliverti A, Zanetti G. The Plant-Type Ferredoxin-NADP⁺ Reductase/Ferredoxin Redox System as a Possible Drug Target Against Apicomplexan Human Parasites. *Curr. Pharm. Des.* 2005;11(24):3159–3172.
89. Spiro S, Guest JR. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 1991;16:310–314.
90. Burbulis IE, Winkel-Shirley B. Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96(22):12929–12934.

Références

1. Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection á corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. 1908;369.
2. Splendore A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare pel. 109-112.
3. Nicolle C, Manceaux L. Nicolle, C., Manceaux, L., 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. 1909;369-372.
4. Dubey JP. The History of *Toxoplasma gondii* —The First 100 Years. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2008;55(6):467-475.
5. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2012;59(5):429-514.
6. Votýpka J, Modrý D, Oborník M, Šlapeta J, Lukeš J. Apicomplexa. *Handb. Protists.* 2016;1-58.
7. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 2009;39(12):1385-1394.
8. Hosseini SA, Amouei A, Sharif M, et al. Human toxoplasmosis: a systematic review for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in clinical samples. *Epidemiol. Infect.* 2019;147:e36.
9. Sibley LD, Pfeifferkorn ER, Boothroyd JC. Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today.* 1991;7(12):327-328.
10. Shwab EK, Saraf P, Zhu X-Q, et al. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018;115(29):E6956-E6963.
11. Dardé ML, Ajzenberg D, Smith J. Population Structure and Epidemiology of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma Gondii.* 2007;49-80.
12. Galal L, Hamidović A, Dardé ML, Mercier M. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. *Food Waterborne Parasitol.* 2019;15:e00052.
13. Rico-Torres CP, Vargas-Villavicencio JA, Correa D. Is *Toxoplasma gondii* type related to clinical outcome in human congenital infection? Systematic and critical review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2016;35(7):1079-1088.
14. Chaichan P, Mercier A, Galal L, et al. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. *Infect. Genet. Evol.* 2017;53:227-238.
15. Galal L, Ajzenberg D, Hamidović A, et al. *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends Parasitol.* 2018;34(2):140-154.
16. Amouei A, Sarvi S, Sharif M, et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* genotypes and feline: Geographical distribution trends. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020;67(1):46-64.
17. Pozio E. How globalization and climate change could affect foodborne parasites. *Exp. Parasitol.* 2020;208:107807.
18. Schlüter D, Däubener W, Schares G, et al. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 2014;304(7):917-929.
19. Robert-Gangneux F, Darde M-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012;25(2):264-296.
20. Gilot-Fromont E, Llu M, Dard M-L, et al. The Life Cycle of *Toxoplasma gondii* in the Natural Environment. *Toxoplasmosis - Recent Adv.* 2012;
21. Dubremetz JF, Lebrun M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 2012;14(15):1403-1410.
22. Dabritz HA, Miller MA, Atwill ER, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* -like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007;231(11):1676-1684.
23. Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats*. *J. Protozool.* 1972;19(1):155-177.
24. Fortier B, Dubremetz JF. Structure et biologie de *Toxoplasma gondii*. *Médecine Mal. Infect.* 1993;23:148-153.

25. 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(2):267–299.
26. Shapiro K, Bahia-Oliveira L, Dixon B, et al. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food Waterborne Parasitol.* 2019;15:e00049.
27. Cerutti A, Blanchard N, Besteiro S. The Bradyzoite: A Key Developmental Stage for the Persistence and Pathogenesis of Toxoplasmosis. *Pathogens.* 2020;9(3):234.
28. Montoya J, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet.* 2004;363(9425):1965–1976.
29. Davenel S, Galaine J, Guelet B, Marteil S, Robert-Gangneux F. La toxoplasmose congénitale en France en 2009. 2019;29:26.
30. Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Bost M, Goullier-Fleuret A, Ambroise-Thomas P. Congenital toxoplasmosis: contribution of postnatal biological follow-up. 1996;
31. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.
32. Stelzer S, Basso W, Benavides Silván J, et al. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food Waterborne Parasitol.* 2019;15:e00037.
33. Marques CS, Sousa S, Castro A, da Costa JMC. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in fresh vegetables and berry fruits. *Parasit. Vectors.* 2020;13(1):180.
34. Djurković-Djaković O, Dupouy-Camet J, Van der Giessen J, Dubey JP. Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. *Food Waterborne Parasitol.* 2019;15:e00054.
35. Calero-Bernal R, Gennari SM. Clinical Toxoplasmosis in Dogs and Cats: An Update. *Front. Vet. Sci.* 2019;6:54.
36. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim. Health Res. Rev.* 2005;6(1):41–61.
37. Pittman KJ, Knoll LJ. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015;79(4):387–401.
38. Shaapan RM. The common zoonotic protozoal diseases causing abortion. *J. Parasit. Dis.* 2016;40(4):1116–1129.
39. Massie GN, Ware MW, Villegas EN, Black MW. Uptake and transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by migratory, filter-feeding fish. *Vet. Parasitol.* 2010;169(3–4):296–303.
40. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10(11):766–778.
41. Wang J-L, Zhang N-Z, Li T-T, et al. Advances in the Development of Anti-*Toxoplasma gondii* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Trends Parasitol.* 2019;35(3):239–253.
42. Park J, Hunter CA. The role of macrophages in protective and pathological responses to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 2020;e12712.
43. McAuley JB. Congenital Toxoplasmosis. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 2014;3(suppl_1):S30–S35.
44. Rezaei F, Sarvi S, Sharif M, et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. *Microb. Pathog.* 2019;126:172–184.
45. Loh F-K, Nathan S, Chow S-C, Fang C-M. Vaccination challenges and strategies against long-lived *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* 2019;37(30):3989–4000.
46. Innes EA, Hamilton C, Garcia JL, Chrysafidis A, Smith D. A one health approach to vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Food Waterborne Parasitol.* 2019;15:e00053.
47. Pramanik PK, Alam MN, Chowdhury DR, Chakraborti T. Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019;
48. Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018;31(4):.
49. Montazeri M, Sharif M, Sarvi S, et al. A Systematic Review of In vitro and In vivo Activities of Anti-*Toxoplasma* Drugs and Compounds (2006–2016). *Front. Microbiol.* 2017;8:.
50. Montazeri M, Mehrzadi S, Sharif M, et al. Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. *Front. Microbiol.* 2018;9:.

51. Dubremetz JF. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol.* 1998;6(1):27–30.
52. Carruthers V, Boothroyd JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007;10(1):83–89.
53. Tosetti N, Dos Santos Pacheco N, Bertiaux E, et al. Two alveolin network proteins are essential for the subpellicular microtubules assembly and conoid anchoring to the apical pole of mature *Toxoplasma gondii*. *Microbiology*; 2020.
54. O’Shaughnessy WJ, Hu X, Beraki T, McDougal M, Reese ML. Loss of a conserved MAPK causes catastrophic failure in assembly of a specialized cilium-like structure in *Toxoplasma gondii*. *Cell Biology*; 2020.
55. Hu K, Johnson J, Florens L, et al. Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 2006;2(2):e13.
56. Morrisette N. Targeting *Toxoplasma* Tubules: Tubulin, Microtubules, and Associated Proteins in a Human Pathogen. *Eukaryot. Cell.* 2015;14(1):2–12.
57. Morrisette NS, Sibley LD. Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 2002;115(Pt 5):1017–1025.
58. Gubbels M-J. A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J. Cell Sci.* 2006;119(11):2236–2245.
59. Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002;66(1):21–38.
60. Harding CR, Gow M, Kang JH, et al. Alveolar proteins stabilize cortical microtubules in *Toxoplasma gondii*. *Nat. Commun.* 2019;10(1):.
61. Fréchal K, Dubremetz J-F, Lebrun M, Soldati-Favre D. Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017;15(11):645–660.
62. Harding CR, Meissner M. The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium*: The IMC in *Plasmodium* and *Toxoplasma*. *Cell. Microbiol.* 2014;16(5):632–641.
63. Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.* 2004;14(10):528–532.
64. Blader IJ, Coleman BI, Chen C-T, Gubbels M-J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii* : 15 Years Later. *Annu. Rev. Microbiol.* 2015;69(1):463–485.
65. Dubremetz JF. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cell. Microbiol.* 2007;9(4):841–848.
66. Fréchal K, Jacot D, Hammoudi P-M, et al. Myosin-dependent cell-cell communication controls synchronicity of division in acute and chronic stages of *Toxoplasma gondii*. *Nat. Commun.* 2017;8(1):.
67. Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 1997;26(1):163–173.
68. Boothroyd JC, Dubremetz J-F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008;6(1):79–88.
69. Besteiro S, Dubremetz J-F, Lebrun M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion: The moving junction of apicomplexan parasites. *Cell. Microbiol.* 2011;13(6):797–805.
70. Clough B, Frickel E-M. The *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole: An Evolving Host–Parasite Frontier. *Trends Parasitol.* 2017;33(6):473–488.
71. Rastogi S, Cygan AM, Boothroyd JC. Translocation of effector proteins into host cells by *Toxoplasma gondii*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2019;52:130–138.
72. Cesbron-Delauw M-F. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: Their role in the host-parasite relationship. *Parasitol. Today.* 1994;10(8):293–296.
73. Mercier C, Adjogble KDZ, Däubener W, Delauw M-F-C. Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexan parasites? *Int. J. Parasitol.* 2005;35(8):829–849.

74. Gold DA, Kaplan AD, Lis A, et al. The Toxoplasma Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):642–652.
75. Hakimi M-A, Bougdour A. Toxoplasma 's ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015;26:24–31.
76. Lane CE, Archibald JM. The eukaryotic tree of life: endosymbiosis takes its TOL. *Trends Ecol. Evol.* 2008;23(5):268–275.
77. Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002;52(2):297–354.
78. van Dooren GG, Striepen B. The Algal Past and Parasite Present of the Apicoplast. *Annu. Rev. Microbiol.* 2013;67(1):271–289.
79. Melo EJJ, Attias M, De Souza W. The Single Mitochondrion of Tachyzoites of Toxoplasma gondii. *J. Struct. Biol.* 2000;130(1):27–33.
80. Focusing on mitochondrial form and function. *Nat. Cell Biol.* 2018;20(7):735–735.
81. MacRae JI, Sheiner L, Nahid A, et al. Mitochondrial Metabolism of Glucose and Glutamine Is Required for Intracellular Growth of Toxoplasma gondii. *Cell Host Microbe*. 2012;12(5):682–692.
82. Jacot D, Waller RF, Soldati-Favre D, MacPherson DA, MacRae JI. Apicomplexan Energy Metabolism: Carbon Source Promiscuity and the Quiescence Hyperbole. *Trends Parasitol.* 2016;32(1):56–70.
83. Maclean AE, Bridges HR, Silva MF, et al. Complexome profile of Toxoplasma gondii mitochondria identifies divergent subunits of respiratory chain complexes including new subunits of cytochrome bc1 complex. *PLOS Pathog.* 2021;17(3):e1009301.
84. Hayward JA, Rajendran E, Zwahlen SM, Faou P, van Dooren GG. Divergent features of the coenzyme Q:cytochrome c oxidoreductase complex in Toxoplasma gondii parasites. *PLOS Pathog.* 2021;17(2):e1009211.
85. Huet D, Rajendran E, van Dooren GG, Lourido S. Identification of cryptic subunits from an apicomplexan ATP synthase. *eLife*. 2018;7:e38097.
86. McFadden GI. The apicoplast. *Protoplasma*. 2011;248(4):641–650.
87. Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, et al. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. 1997;275(5305):1485–1489.
88. Striepen B. The apicoplast: a red alga in human parasites. *Essays Biochem.* 2011;51:111–125.
89. McFadden GI, Yeh E. The apicoplast: now you see it, now you don't. *Int. J. Parasitol.* 2017;47(2–3):137–144.
90. Arisue N, Hashimoto T. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol. Int.* 2015;64(3):254–259.
91. Sheiner L, Striepen B. Protein sorting in complex plastids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 2013;1833(2):352–359.
92. Toursel C, Dzierszinski F, Bernigaud A, Mortuaire M, Tomavo S. Molecular cloning, organellar targeting and developmental expression of mitochondrial chaperone HSP60 in Toxoplasma gondii. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000;111(2):319–332.
93. Kunze M, Berger J. The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. *Front. Physiol.* 2015;6:.
94. Wiedemann N, Pfanner N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 2017;86(1):685–714.
95. Priesnitz C, Pfanner N, Becker T. Studying protein import into mitochondria. *Methods Cell Biol.* 2020;155:45–79.
96. Mallo N, Fellows J, Johnson C, Sheiner L. Protein Import into the Endosymbiotic Organelles of Apicomplexan Parasites. *Genes*. 2018;9(8):412.
97. van Dooren GG, Yeoh LM, Striepen B, McFadden GI. The Import of Proteins into the Mitochondrion of Toxoplasma gondii. *J. Biol. Chem.* 2016;291(37):19335–19350.
98. Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, et al. Transport and trafficking: Toxoplasma as a model for Plasmodium. *Novartis Found. Symp.* 1999;226:176–195; discussion 195–198.

99. Waller RF, Keeling PJ, Donald RGK, et al. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95(21):12352–12357.
100. DeRocher A. Targeting to the *T. gondii* plastid. 9.
101. Heiny SR, Pautz S, Recker M, Przyborski JM. Protein Traffic to the *Plasmodium falciparum* Apicoplast: Evidence for a Sorting Branch Point at the Golgi. *Traffic*. 2014;15(12):1290–1304.
102. Tawk L, Dubremetz J-F, Montcourrier P, et al. Phosphatidylinositol 3-Monophosphate Is Involved in *Toxoplasma* Apicoplast Biogenesis. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001286.
103. Bouchut A, Geiger JA, DeRocher AE, Parsons M. Vesicles Bearing *Toxoplasma* Apicoplast Membrane Proteins Persist Following Loss of the Relict Plastid or Golgi Body Disruption. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e112096.
104. Chaudhari R, Dey V, Narayan A, Sharma S, Patankar S. Membrane and luminal proteins reach the apicoplast by different trafficking pathways in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PeerJ*. 2017;5:e3128.
105. Agrawal S, van Dooren GG, Beatty WL, Striepen B. Genetic Evidence that an Endosymbiont-derived Endoplasmic Reticulum-associated Protein Degradation (ERAD) System Functions in Import of Apicoplast Proteins*□S. 2009;284(48):10.
106. Biddau M, Bouchut A, Major J, et al. Two essential Thioredoxins mediate apicoplast biogenesis, protein import, and gene expression in *Toxoplasma gondii*. 27.
107. Sjuts I, Soll J, Bölter B. Import of Soluble Proteins into Chloroplasts and Potential Regulatory Mechanisms. *Front. Plant Sci.* 2017;8:.
108. Sheiner L, Fellows JD, Ovcariakova J, et al. *Toxoplasma gondii* Toc75 Functions in Import of Stromal but not Peripheral Apicoplast Proteins: *Toxoplasma* Toc75 in Apicoplast Protein Import. *Traffic*. 2015;16(12):1254–1269.
109. van Dooren GG, Tomova C, Agrawal S, Humbel BM, Striepen B. *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105(36):13574–13579.
110. van Dooren GG, Su V, D’Ombrain MC, McFadden GI. Processing of an Apicoplast Leader Sequence in *Plasmodium falciparum* and the Identification of a Putative Leader Cleavage Enzyme. *J. Biol. Chem.* 2002;277(26):23612–23619.
111. Boucher MJ, Yeh E. Plastid–endomembrane connections in apicomplexan parasites. *PLOS Pathog.* 2019;15(6):e1007661.
112. Francia ME, Striepen B. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014;12(2):125–136.
113. Kim K. The Epigenome, Cell Cycle, and Development in *Toxoplasma*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2018;72(1):479–499.
114. Radke JR, Striepen B, Guerini MN, et al. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001;115(2):165–175.
115. Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 2008;121(9):1559–1568.
116. Bisio H, Soldati-Favre D. Signaling Cascades Governing Entry into and Exit from Host Cells by *Toxoplasma gondii*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2019;73(1):579–599.
117. Roiko MS, Svezhova N, Carruthers VB. Acidification Activates *Toxoplasma gondii* Motility and Egress by Enhancing Protein Secretion and Cytolytic Activity. *PLoS Pathog.* 2014;10(11):e1004488.
118. Caldas L, de Souza W. A Window to *Toxoplasma gondii* Egress. *Pathogens*. 2018;7(3):69.
119. Borges-Pereira L, Budu A, McKnight CA, et al. Calcium Signaling throughout the *Toxoplasma gondii* Lytic Cycle: A STUDY USING GENETICALLY ENCODED CALCIUM INDICATORS. *J. Biol. Chem.* 2015;290(45):26914–26926.
120. Kafsack BFC, Pena JDO, Coppens I, et al. Rapid Membrane Disruption by a Perforin-Like Protein Facilitates Parasite Exit from Host Cells. *Science*. 2009;323(5913):530–533.
121. Ni T, Williams SI, Rezelj S, et al. Structures of monomeric and oligomeric forms of the *Toxoplasma gondii* perforin-like protein 1. *Sci. Adv.* 2018;4(3):eaq0762.
122. Bisio H, Lunghi M, Brochet M, Soldati-Favre D. Phosphatidic acid governs natural egress in *Toxoplasma gondii* via a guanylate cyclase receptor platform. *Nat. Microbiol.* 2019;4(3):420–428.

123. Bullen HE, Soldati-Favre D. A central role for phosphatidic acid as a lipid mediator of regulated exocytosis in apicomplexa. *FEBS Lett.* 2016;590(15):2469–2481.
124. Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, et al. Metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2(3):203–216.
125. Seeber F, Soldati-Favre D. Metabolic Pathways in the Apicoplast of Apicomplexa. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2010;281:161–228.
126. Lim L, McFadden GI. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2010;365(1541):749–763.
127. Biot C, Botté CY, Dubar F, Maréchal É. Paludisme: Recherche de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'apicoplaste, un organite cellulaire d'origine algale. *médecine/sciences.* 2012;28(2):163–171.
128. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature.* 1997;390(6658):407–409.
129. Fleige T, Soldati-Favre D. Targeting the Transcriptional and Translational Machinery of the Endosymbiotic Organelle in Apicomplexans. *Curr. Drug Targets.* 2008;9(11):948–956.
130. Fichera ME, Bhopale MK, Roos DS. In vitro assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against Toxoplasma gondii. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39(7):1530–1537.
131. Kennedy K, Crisafulli EM, Ralph SA. Delayed Death by Plastid Inhibition in Apicomplexan Parasites. *Trends Parasitol.* 2019;35(10):747–759.
132. The Apicoplast: A Review of the Derived Plastid of Apicomplexan Parasites. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2005;
133. Bisanz C, Bastien O, Grando D, et al. Toxoplasma gondii acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem. J.* 2006;394(1):197–205.
134. Ramakrishnan S, Docampo MD, MacRae JI, et al. Apicoplast and Endoplasmic Reticulum Cooperate in Fatty Acid Biosynthesis in Apicomplexan Parasite Toxoplasma gondii. *J. Biol. Chem.* 2012;287(7):4957–4971.
135. Tomova C, Humbel BM, Geerts WJC, et al. Membrane Contact Sites between Apicoplast and ER in Toxoplasma gondii Revealed by Electron Tomography. *Traffic.* 2009;10(10):1471–1480.
136. Goodman C, McFadden G. Fatty Acid Biosynthesis as a Drug Target in Apicomplexan Parasites. *Curr. Drug Targets.* 2007;8(1):15–30.
137. Mazumdar J, H. Wilson E, Masek K, A. Hunter C, Striepen B. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in Toxoplasma gondii. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103(35):13192–13197.
138. James C. Sacchettini, C. Dale Poulter. Creating Isoprenoid Diversity. *Science.* 1997;277(5333):1788–1789.
139. Fry SC. Comprehensive Natural Products Chemistry, Volume 3: Carbohydrates and Their Derivatives Including Tannins, Cellulose and Related Lignins. *Phytochemistry.* 2002;59(2):230–231.
140. Imlay L, Odom AR. Isoprenoid Metabolism in Apicomplexan Parasites. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 2014;1(3–4):37–50.
141. Yeh E, DeRisi JL. Chemical Rescue of Malaria Parasites Lacking an Apicoplast Defines Organelle Function in Blood-Stage Plasmodium falciparum. *PLoS Biol.* 2011;9(8):e1001138.
142. Kennedy K, Cobbold SA, Hanssen E, et al. Delayed death in the malaria parasite Plasmodium falciparum is caused by disruption of prenylation-dependent intracellular trafficking. *PLoS Biol.* 2019;17(7):e3000376.
143. Nair SC, Brooks CF, Goodman CD, et al. Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in Toxoplasma gondii. *J. Exp. Med.* 2011;208(7):1547–1559.
144. Li Z-H, Ramakrishnan S, Striepen B, Moreno SNJ. Toxoplasma gondii Relies on Both Host and Parasite Isoprenoids and Can Be Rendered Sensitive to Atorvastatin. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003665.
145. Pamanaban G. Department of Biochemistry,. 1992;187(2):7.

146. Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;474(2):238–251.
147. Tanaka R, Tanaka A. Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007;58(1):321–346.
148. Koreny L, Oborník M, Lukeš J. Make It, Take It, or Leave It: Heme Metabolism of Parasites. *PLOS Pathog.* 2013;
149. Shimizu T, Lengalova A, Martínek V, Martínková M. Heme: emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chem. Soc. Rev.* 2019;48(24):5624–5657.
150. Wu B. Heme biosynthetic pathway in apicomplexan parasites. 2006;
151. Goldberg DE, Sigala PA. Plasmodium heme biosynthesis: To be or not to be essential? *PLOS Pathog.* 2017;13(9):e1006511.
152. Bergmann A, Floyd K, Key M, et al. *Toxoplasma gondii* requires its plant-like heme biosynthesis pathway for infection. *Microbiology*; 2019.
153. Tjhin ET, Hayward JA, McFadden GI, van Dooren GG. Characterization of the apicoplast-localized enzyme *Tg* UroD in *Toxoplasma gondii* reveals a key role of the apicoplast in heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 2020;295(6):1539–1550.
154. Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK. STRUCTURE, FUNCTION, AND FORMATION OF BIOLOGICAL IRON-SULFUR CLUSTERS. *Annu. Rev. Biochem.* 2005;74(1):247–281.
155. Przybyla-Toscano J, Roland M, Gaymard F, Couturier J, Rouhier N. Roles and maturation of iron–sulfur proteins in plastids. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 2018;23(4):545–566.
156. Gisselberg JE, Dellibovi-Ragheb TA, Matthews KA, Bosch G, Prigge ST. The Suf Iron-Sulfur Cluster Synthesis Pathway Is Required for Apicoplast Maintenance in Malaria Parasites. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003655.
157. Lill R, Mühlenhoff U. Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 2008;77(1):669–700.
158. Ellis KES, Clough B, Saldanha JW, Wilson RJMI. Nifs and Sufs in malaria: Nifs and Sufs in malaria. *Mol. Microbiol.* 2008;41(5):973–981.
159. Pala ZR, Saxena V, Saggu GS, Garg S. Recent Advances in the [Fe–S] Cluster Biogenesis (SUF) Pathway Functional in the Apicoplast of Plasmodium. *Trends Parasitol.* 2018;34(9):800–809.
160. Jaebson MR, Cash VL, Weiss MC, et al. Biochemical and genetic analysis of the nitIJSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. 9.
161. Weiss MC. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat. Microbiol.* 2016;1:8.
162. Tsaousis AD. On the Origin of Iron/Sulfur Cluster Biosynthesis in Eukaryotes. *Front. Microbiol.* 2019;10:2478.
163. Anbar AD, Duan Y, Lyons TW, et al. A Whiff of Oxygen Before the Great Oxidation Event? *Science.* 2007;317(5846):1903–1906.
164. Bruska MK, Stiebritz MT, Reiher M. Binding of Reactive Oxygen Species at Fe–S Cubane Clusters. *Chem. – Eur. J.* 2015;21(52):19081–19089.
165. Touati D. Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli* – how many ways are there to trigger *soxRS* response? *Redox Rep.* 2000;5(5):287–293.
166. Andreini C, Rosato A, Banci L. The Relationship between Environmental Dioxxygen and Iron-Sulfur Proteins Explored at the Genome Level. *PLOS ONE.* 2017;12(1):e0171279.
167. Balk J, Lobréaux S. Biogenesis of iron–sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci.* 2005;10(7):324–331.
168. Xu XM, Møller SG. Iron–Sulfur Cluster Biogenesis Systems and their Crosstalk. 2008;8.
169. Meyer J. Iron–sulfur protein folds, iron–sulfur chemistry, and evolution. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 2008;13(2):157–170.
170. Py B, Barras F. Du fer et du soufre dans les protéines: Comment la cellule construit-elle les cofacteurs fer-soufre essentiels à son fonctionnement ? *médecine/sciences.* 2014;30(12):1110–1122.

171. Stehling O, Lill R. The Role of Mitochondria in Cellular Iron-Sulfur Protein Biogenesis: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5(8):a011312–a011312.
172. Roche B, Aussel L, Ezraty B, et al. Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2013;1827(3):455–469.
173. Py B, Barras F. Building Fe–S proteins: bacterial strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8(6):436–446.
174. Baussier C, Fakroun S, Aubert C, et al. Making iron-sulfur cluster: structure, regulation and evolution of the bacterial ISC system. *Adv. Microb. Physiol.* 2020;76:1–39.
175. Ayala-Castro C, Saini A, Outten FW. Fe-S Cluster Assembly Pathways in Bacteria. *MICROBIOL MOL BIOL REV.* 2008;72:16.
176. Poole LB. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* 2015;80:148–157.
177. Ono K, Jung M, Zhang T, et al. Synthesis of l-cysteine derivatives containing stable sulfur isotopes and application of this synthesis to reactive sulfur metabolome. *Free Radic. Biol. Med.* 2017;106:69–79.
178. Balk J, Pilon M. Ancient and essential: the assembly of iron–sulfur clusters in plants. 2011;16(4):9.
179. Balk J, Schaedler TA. Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014;65(1):125–153.
180. Yang J, Bitoun JP, Ding H. Interplay of IscA and IscU in Biogenesis of Iron-Sulfur Clusters. *J. Biol. Chem.* 2006;281(38):27956–27963.
181. Py B, Gerez C, Angelini S, et al. Molecular organization, biochemical function, cellular role and evolution of NfuA, an atypical Fe-S carrier: Role of NfuA in Fe-S biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 2012;86(1):155–171.
182. Boyd JM, Drevland RM, Downs DM, Graham DE. Archaeal ApbC/Nbp35 Homologs Function as Iron-Sulfur Cluster Carrier Proteins. *J. Bacteriol.* 2009;191(5):1490–1497.
183. Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* 1999;18(14):3981–3989.
184. Pondarré C, Antiochos BB, Campagna DR, et al. The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron–sulfur cluster biogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15(6):953–964.
185. Maio N, Jain A, Rouault TA. Mammalian iron–sulfur cluster biogenesis: Recent insights into the roles of frataxin, acyl carrier protein and ATPase-mediated transfer to recipient proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2020;55:34–44.
186. Llorens JV, Soriano S, Calap-Quintana P, Gonzalez-Cabo P, Moltó MD. The Role of Iron in Friedreich's Ataxia: Insights From Studies in Human Tissues and Cellular and Animal Models. *Front. Neurosci.* 2019;13:75.
187. Anzovino A, Lane DJR, Huang ML-H, Richardson DR. Fixing frataxin: 'ironing out' the metabolic defect in Friedreich's ataxia: Frataxin, iron and mitochondrial disease. *Br. J. Pharmacol.* 2014;171(8):2174–2190.
188. Clark E, Johnson J, Dong YN, et al. Role of frataxin protein deficiency and metabolic dysfunction in Friedreich ataxia, an autosomal recessive mitochondrial disease. *Neuronal Signal.* 2018;2(4):NS20180060.
189. Lu Y. Assembly and Transfer of Iron–Sulfur Clusters in the Plastid. *Front. Plant Sci.* 2018;9:336.
190. Viganì G, Maffi D, Zocchi G. Iron availability affects the function of mitochondria in cucumber roots. *New Phytol.* 2009;182(1):127–136.
191. Woo YH, Ansari H, Otto TD, et al. Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. *eLife.* 2015;4:e06974.
192. Dellibovi-Ragheb TA, Gisselberg JE, Prigge ST. Parasites FeS Up: Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Eukaryotic Pathogens. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003227.
193. Charan M, Singh N, Kumar B, et al. Sulfur Mobilization for Fe-S Cluster Assembly by the Essential SUF Pathway in the Plasmodium falciparum Apicoplast and Its Inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58(6):3389–3398.
194. Pyrih J, Žárský V, Fellows JD, et al. The iron-sulfur scaffold protein HCF101 unveils the complexity of organellar evolution in SAR, Haptista and Cryptista. *BMC Ecol. Evol.* 2021;21(1):46.

195. Aw YTV, Seidi A, Hayward JA, et al. A key cytosolic iron–sulfur cluster synthesis protein localizes to the mitochondrion of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 2020;mmi.14651.
196. Valasatava Y, Rosato A, Banci L, Andreini C. MetalPredator: a web server to predict iron–sulfur cluster binding proteomes. 3.
197. Barylyuk K, Koreny L, Ke H, et al. A Comprehensive Subcellular Atlas of the *Toxoplasma* Proteome via hyperLOPIT Provides Spatial Context for Protein Functions. *Cell Host Microbe.* 2020;28(5):752–766.e9.
198. Sidik SM, Huet D, Ganesan SM, et al. A Genome-wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies Essential Apicomplexan Genes. *Cell.* 2016;166(6):1423–1435.e12.
199. Seidi A, Muellner-Wong LS, Rajendran E, et al. Elucidating the mitochondrial proteome of *Toxoplasma gondii* reveals the presence of a divergent cytochrome c oxidase. *eLife.* 2018;7:.
200. Liang X, Cui J, Yang X, et al. Acquisition of exogenous fatty acids renders apicoplast-based biosynthesis dispensable in tachyzoites of *Toxoplasma*. *J. Biol. Chem.* 2020;295(22):7743–7752.
201. Crawford MJ, Thomsen-Zieger N, Ray M, et al. *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *EMBO J.* 2006;25(13):3214–3222.
202. Cuvreur G, Sadak A, Fortier B, Dubremetz JF. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* 1988;97(1):1–10.
203. Herm-Götz A. *Toxoplasma gondii* myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *EMBO J.* 2002;21(9):2149–2158.
204. Bernal C, Palacin C, Boronat A, Imperial S. A colorimetric assay for the determination of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate synthase activity. *Anal. Biochem.* 2005;337(1):55–61.
205. Waldman BS, Schwarz D, Wadsworth MH, et al. Identification of a Master Regulator of Differentiation in *Toxoplasma*. *Cell.* 2020;180(2):359–372.e16.
206. Boothroydt JC. Interconnection between Organellar Functions, Development and Drug Resistance in the Protozoan Parasite, *Toxoplasma gondii*. 7.
207. Ivanov P, Kedersha N, Anderson P. Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019;11(5):a032813.
208. Amiar S, MacRae JI, Callahan DL, Dubois D. Apicoplast-Localized Lysophosphatidic Acid Precursor Assembly Is Required for Bulk Phospholipid Synthesis in *Toxoplasma gondii* and Relies on an Algal/Plant-Like Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase. *PLOS Pathog.* 2016;30.
209. Amiar S, Katris NJ, Berry L, et al. Division and Adaptation to Host Environment of Apicomplexan Parasites Depend on Apicoplast Lipid Metabolic Plasticity and Host Organelle Remodeling. *Cell Rep.* 2020;30(11):25.
210. Martins-Duarte ÉS, Carias M, Vommaro R, Surolia N, de Souza W. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for pellicle formation at the end of cytokinesis in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 2016;12.
211. Wang W, Oldfield E. Bioorganometallic Chemistry with IspG and IspH: Structure, Function, and Inhibition of the [Fe₄S₄] Proteins Involved in Isoprenoid Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014;53(17):4294–4310.
212. Singh KS, Sharma R, Reddy PAN, et al. IspH inhibitors kill Gram-negative bacteria and mobilize immune clearance. *Nature.* 2021;589(7843):597–602.
213. Saggu GS, Garg S, Pala ZR, et al. Characterization of 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (IspG) from *Plasmodium vivax* and its potential as an antimalarial drug target. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;96:466–473.
214. Vinayak S, Sharma YD. Inhibition of *Plasmodium falciparum* *ispH* (*lytB*) Gene Expression by Hammerhead Ribozyme. *Oligonucleotides.* 2007;17(2):189–200.