



HAL
open science

Identification et caractérisation moléculaires de protéines impliquées dans l'invasion chez *Toxoplasma gondii*

Justine Heckendorn

► **To cite this version:**

Justine Heckendorn. Identification et caractérisation moléculaires de protéines impliquées dans l'invasion chez *Toxoplasma gondii*. Parasitologie. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTT007 . tel-03969485

HAL Id: tel-03969485

<https://theses.hal.science/tel-03969485v1>

Submitted on 2 Feb 2023

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 Santé

École doctorale CBS2

Unité de recherche UMR5235

Identification et caractérisation moléculaires de protéines impliquées dans l'invasion chez *Toxoplasma gondii*

Présentée par Justine HECKENDORN

Le 9 février 2021

Sous la direction de Maryse LEBRUN
et Catherine BRAUN-BRETON

Devant le jury composé de

Jean-François DUBREMETZ, PhD, CNRS-Université de Montpellier

Dominique SOLDATI-FAVRE, Professeur, Université de Genève

Sabrina MARION, CR1, CNRS-Université de Lille

Olivier SILVIE, DR2, Inserm-Université Pierre et Marie Curie

Catherine BRAUN-BRETON, Professeur, CNRS-Université de Montpellier

Maryse LEBRUN, DR1, CNRS-Université de Montpellier

Président du jury

Rapporteuse

Rapporteuse

Examineur

Directrice de thèse

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Résumé

L'invasion de la cellule hôte par les parasites *Apicomplexes* est médiée par la sécrétion séquentielle et coordonnée de deux types d'organites apicaux spécialisés : les micronèmes et les rhoptries. Les mécanismes de l'exocytose de ces organites restent peu connus. Les Apicomplexes font partie, avec les Ciliés et les Dinoflagellés, du phylum des Alveolés. Les Alveolés, bien qu'ayant de substantielles différences morphologiques, partagent notamment la présence d'organites sécrétoires. Chez *Paramecium tetraurelia*, un Cilié, de précédentes études ont permis d'observer que l'exocytose des trichocystes, leurs organites sécrétoires, pouvait être induite par diverses stimulations. En analysant des mutants déficients pour l'exocytose, nommés Nd pour « non-discharge », ces études ont identifié des composants essentiels du système de fusion membranaire. Notre équipe a démontré précédemment la conservation des gènes *Nd6* et *Nd9* chez *Toxoplasma* et *Plasmodium* et leur implication dans l'invasion et la sécrétion des rhoptries. *Nd6* et *Nd9* appartiennent à un complexe comprenant deux autres facteurs également conservés chez les Ciliés et que l'équipe a montré nécessaire à la sécrétion des rhoptries et des organelles de sécrétion d'un autre cilié *Tetrahymena*. Ces résultats supportent l'hypothèse d'un mécanisme d'exocytose des rhoptries conservé chez les Alveolés.

Chez *Tetrahymena*, les gènes impliqués dans la biogenèse et la sécrétion des organites de défense sont exprimés au cours du cycle de façon synchronisée. Dans un criblage bio-informatique, nous avons identifié les gènes de *Tetrahymena* co-régulés avec le gène *Nd6* conservés chez les Apicomplexes. Nous avons démontré que deux protéines de *Toxoplasma gondii*, appelées *Nd11* et *Nd12* et identifiées par ce criblage, sont impliquées dans l'invasion, et que l'incapacité à envahir en l'absence de ces protéines pourrait être liée à une perte de la capacité à sécréter les rhoptries. *Nd11* et *Nd12* sont localisées dans le cytoplasme de manière ponctuelle et possèdent de nombreux domaines transmembranaires ainsi que des domaines prédits d'interaction avec des protéines ou des sucres. Par Co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse, nous avons démontré que *Nd11* et *Nd12* interagissaient entre elles et avec deux autres protéines inconnues, impliquées dans les mécanismes d'invasion et de sécrétion des rhoptries et possédant des domaines de liaison aux sucres. Notre étude supporte l'hypothèse de la conservation des mécanismes de sécrétion au sein des Alveolata et valide l'utilité des études comparatives entre espèces comme stratégie d'identification d'effecteurs de l'exocytose chez les Apicomplexes. En outre cette étude a permis l'identification d'un nouveau complexe protéique essentiel à la sécrétion des rhoptries chez *T. gondii*.

Abstract

Host cell invasion by *apicomplexan* parasites is governed by coordinated and sequential exocytosis of specialized apical organelles: micronemes and rhoptries. Our knowledge on exocytosis mechanisms of these organelles remains incomplete. Together with Ciliata and Dinoflagellata, *apicomplexan* parasites belong to the Alveolata superphylum. Although morphologically different, Alveolata share several features, including the presence of secretory organelles. Previous studies in the Ciliata *Paramecium tetraurelia* showed that the exocytosis of their defensive extrusive organelles, called trichocysts, could be triggered upon stimulation. Studies on *Paramecium* mutants defective for trichocysts exocytosis (called Nd for “non-discharge”), led to the identification of essential components of the trichocysts-membrane fusion machinery. Previously, our team showed that some of these *Nd* genes have orthologs in *T.gondii* and *P.falciparum* (*Nd6* and *Nd9*), which are involved in rhoptry secretion and invasion. This phylogenetic conservation was further explored and prompted the identification of *T.gondii* orthologs in *Tetrahymena* as new *Nd* genes. These results support the hypothesis of an *Alveolate* conserved mechanism for rhoptry secretion.

Given that in Ciliata, *Nd* genes and trichocysts biogenesis-related genes are similarly transcribed, we then identified genes co-regulated with the *Tetrahymena Nd6* gene and conserved in *Apicomplexa*. From this screen, we showed that 2 genes of *T.gondii* encoding *Nd11* and *Nd12* are involved in invasion and their the knock-down leads to loss of rhoptry secretion. *Nd11* and *Nd12* are cytosolic proteins and possess multiple transmembrane domains, protein-protein interaction and sugar binding domains. Mass spectrometry and co-immunoprecipitation assays showed a reciprocal interaction between *Nd11* and *Nd12*, and identified 2 other unknown proteins, TgME49_277910 and TgME49_247115 both also shown to be involved in rhoptry secretion. In conclusion, by combining a phylogenetic with a transcriptomic approach we identified a new complex, essential for rhoptry secretion, in *T.gondii* and new effectors of exocytosis in apicomplexan parasites.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie chaleureusement Dominique Soldati-Favre, Sabrina Marion et Olivier Silvie d'avoir accepté de rapporter ce travail et de faire partie de mon jury de thèse et particulièrement Jean-François Dubremetz de le présider.

Je souhaite remercier mes directrices de thèse, Maryse Lebrun tout d'abord, j'apprécie chaque discussion scientifique avec toi, tu es passionnée et toujours prête à nous écouter pour partager de nouvelles idées, merci de m'avoir encadrée pendant cette thèse et donné l'opportunité de travailler sur ce projet qui te tient tant à cœur. Catherine Braun-Breton, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi depuis le début de mes études, et d'avoir accepté d'être finalement ma co-directrice de thèse, ce qui est une bonne finalité, après que vous m'ayez fait découvrir et aimé la parasitologie il y a de cela... 9 ans déjà.

Je souhaite remercier Georges Lutfalla de m'avoir accueillie pour cette thèse au sein du laboratoire LPHI et pour sa direction toujours bienveillante.

Merci en général à toutes les personnes de l'unité, toujours prêts à s'entraider, à s'épauler, à l'équipe 1 en particulier pour ces années partagées.

Je remercie toute l'équipe *Toxo*, pour les petits déjeuners, les meetings du vendredi après-midi que personne n'est heureux de décaler, les discussions scientifiques, et la bonne humeur.

Merci à vous, les « filles » de *Toxo* ou *Plasmo*, au fond peu importe pour nous. Diana tu es un modèle pour nous toutes, Caty sans toi rien n'aurait été pareil, tu es loin de mes yeux mais près de mon cœur. Ana, nous avons partagé bien plus que du boulot, merci pour tes conseils et les désagréments partagés. Sarah, avec toi on comprend mieux pourquoi « un peu d'humour ne fait pas de mal », Aude, tu as été un rayon de soleil dans ce bureau, Marta merci pour ta bonne humeur et pour le café, Daniela et Rania le temps partagé ici aura été trop court. Coralie, ta bonne humeur et ton rire égaye le labo. Je n'oublie pas bien sur Eleo, Rakhee, Ksenia.

Garde-t-on toujours le (la) meilleur(e) pour la fin ? Margarida. J'ai trouvé bien plus qu'une collègue et une voisine de bureau, tu le sais évidemment. Merci pour tout. Surtout pour le Bacalhau à Brás. J'ai passé ici de bien plus belles années grâce à notre amitié.

Je souhaite remercier mes parents Yves et Agnès et ma sœur Elise, qui m'ont toujours soutenue et épaulée dans mes choix d'études, ont toujours eu une grande confiance en moi, plus que moi-même, et qui m'ont ainsi portée au long de ces années.

Merci à mon mari, sans toi rien ne serait pareil. Tu sais comment me remonter le moral, me secouer parfois. Tu m'as toujours encouragée à ne pas baisser les bras, je n'en serais pas là sans toi. Merci pour l'aide « technique » sur word et l'installation télétravail-confinement.

Et enfin, j'aimerais dédier cette thèse à ma fille, Louise. Tu as participé pleinement à ma seconde année, et rythmé la dernière. J'espère que tu seras fière de moi, autant que je le suis de toi. Tu m'as appris la chose la plus importante : l'amour surpasse tout.

Table des abréviations

3D 3 dimensions

ABA abscisic acid

ADN Acide desoxyribonucléique

AED Aminoethyldextrane

aGPCR récepteur d'adhésion couplé aux protéines G

AMA apical membrane antigen

APH apical plextrin homology domain-containing protein

APR Apical polar ring

ARN acide ribonucléique

ARNg ARN guide

ARO Amardillo repeat only protein

ATc Anhydrotetracycline

ATP Adénosine triphosphate

BLE Bleomycine

CAT Chloramphénicol acétyltransférase

CDK Cyclin dependant kinase

CDPK Calcium dependant protein kinase

Co-IP Co-immuno-précipitation

CORVET Class C core vacuole/endosome tethering

CRISPR Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRMP Cystein repeat modular protein

CytD Cytochalasine D

DAG Diacylglycerol

DD Destabilization domain

DHFR Dihydrofolate réductase

DMEM Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO Diméthylsulfoxyde

DOC Deoxycholate
DTT Dithiothréitol
EGF Epidermal Growth Factor
ESA excretory secretory antigen
FACS Fluorescence Activated Cell Sorting
FUDR 5-Fluoro-2'-deoxyuridine
GAC Glideosome Associated Connector
GAP Glideosome Associated Protein
GCC2 GCC3 GRIP and Coiled Coiled domain 2 et 3
GFP Green Fluorescent Protein
GMP Guanosine Monophosphate Cyclique
GPCR Récepteur couplé aux protéines G
GPI Glycophosphatidylinositol
GPS Domaine GPCR-proteolytique
GRA Protéine de granule dense
GTP Guanosine Triphosphate
HA3 Triple Hémagglutinine
HBSS Hank's Balanced Salt Solution
HFF Human Foreskin Fibroblast
HOPS homotypic fusion and vacuolar protein sorting
HXGPRT Hypoxantine Xanthine Guanine PhosphoRibosyl Transferase
IFA Immunofluorescence assay
IgG Immunoglobulines G
IMC Inner membrane complex
IP Immuno-précipitation
IP3 Inositol triphosphate
KD Knock-down
KO Knock-out
LPL Lysophospholipide

M/C Mitose/Cytodierèse

M2AP MIC2 associated protein

MAR Microneme adhesive repeat

MIC Protéine de micronème

MJ Moving Junction

MOI Multiplicity Of Infection

MtBD MIP-T3 microtubule-binding domain

MTOC Microtubule organisation center

MW Molecular Weight

Nd Non-Discharge

NdP Non-Discharge protein partner

NSF NEM-sensitive factor

ORF Open Reading Frame

PA Acide Phosphatidique

PAM Protospacer Adjacent Motif

PBS Phosphate Buffered Saline

PCR Polymérase Chain Reaction

PCR Preconoidal Ring

PCR-RLFP PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism

PH Pleckstrin homology domain

PIP2 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKG c-GMP dépendante protéine kinase G

PL Patatin Like phospholipase

PLA2 Phospholipase A2

PLC Phosphoinositide-phospholipase C

PLP1 Perforin like protein 1

PV Vacuole parasitophore

PVDF Fluorure de polyvinylidène

PVM Membrane de la vacuole parasitophore

RE Reticulum Endoplasmique
RON Roptry Neck Protein
ROP Rhopty Protein
RRP Readily Releasable Pool
S/M phase S/ mitose
SAG Surface antigen
SERCA Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
SNARE Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
snRNP Small Nuclear Ribonucleoprotein
SOC Store operated channel
STM Ssignature Tagged Mutagenesis
SVF Sérum de veau foetal
TGN Transgolgi network
TM Transmembranaire
TMP Trichocyst matrix protein
TRAP Thrombospondin-related domain
UPRT Uracil Phosphoribosyltransferase
VAC Vacuole digestive
VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine
VS Vésicule Synaptique
WB Western Blot
WT Wild type

Table des figures

Figure 1. Séroprévalence des IgG chez les femmes enceintes dans le monde.	19
Figure 2. Classification phylogénique des Apicomplexes	22
Figure 3. Cycle de vie de <i>T. gondii</i>	24
Figure 4. Le tachyzoïte.....	31
Figure 5. L'IMC et le complexe apical.	35
Figure 6. Représentation de la structure protéique des GRAs.	37
Figure 7. Cascade de signalisation donnant lieu à la sécrétion des micronèmes.	41
Figure 8. Représentation du cycle lytique de <i>T. gondii</i>	49
Figure 9. Schématisation de la jonction mobile.	51
Figure 10. Représentation des différents complexes AMAs-RONs.	52
Figure 11. Représentation de l'endodyogénie.	55
Figure 12. Cascades de signalisations donnant lieu à la sortie des parasites de la cellule hôte.	56
Figure 13. Le glideosome.....	59
Figure 14. Molécules impliquées dans l'exocytose calcium dépendante.	62
Figure 15. Assemblage des complexes SNARE et rapprochement des membranes.	64
Figure 16. Cycle sexué et végétatif de <i>P. tetraurelia</i>	66
Figure 17. Aspect des trichocystes.....	67
Figure 18. Etapes de fusion du trichocyste.....	68
Figure 19. Comparaison du site d'un trichocyste de paramécie WT et mutant Nd9.....	71
Figure 20. Image de tomographie magnifiée et reconstruction 3D montrant la connexion entre la rhoptrie, l'extrémité de la rhoptrie, la vésicule apicale et la rosette..	75
Figure 21 Profil d'expression des gènes THERM_00238300 (Nd2) THERM_00410160 (Nd6) THERM_00312200 (Nd169) THERM_00938850 (Nd9), et profils d'expression normalisés.	103
Figure 22. Schéma de l'organisation protéique des homologues de Nd11 et Nd12 chez <i>Tetrahymena</i>	106
Figure 23. Représentation de la structure des protéines CRMPs de <i>P. falciparum</i>	106
Figure 24. Prédiction par le programme TMHMM http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ des hélices transmembranaires de Nd11 et Nd12.	109
Figure 25. Schéma de l'organisation des domaines protéiques de Nd11 et Nd12..	110
Figure 26. Divergence entre les gènes codant pour les protéines contenant des domaines « GCC2 » chez <i>Tetrahymena</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> et <i>Plasmodium falciparum</i>	111
Figure 27. Stratégie et validation PCR des clones Nd11_HA3 et Nd12_HA3.....	112
Figure 28. Nd11_HA et Nd12_HA sont localisées dans le cytoplasme.	113
Figure 29. Localisation en IFA des protéines MIC1, MIC2, MIC6 et MIC8 dans les souches exprimant Nd11_HA3 et Nd12_HA3.....	114
Figure 30. Stratégie et validation PCR des clones TY3_Nd12_HA3 et NterNd12_TY3_Nd12_HA3.	115
Figure 31. WB et IFA de la souche NterNd12_Ty3_Nd12_HA3.....	116
Figure 32. Schéma du fonctionnement de la méthode de détermination de la typologie selon la technique de Harding et al.	117
Figure 33. Stratégie et validation PCR des clones KD-Nd11 et KD-Nd12.....	118
Figure 34. WB et IFA de la déplétion de Nd11 et Nd12.	120
Figure 35. Aire des plages de lyse.	121
Figure 36. La diminution d'expression de Nd11 et Nd12 n'entraîne pas de défaut morphologique.....	122
Figure 37. Nd11 et Nd12 ne sont pas impliquées dans les mécanismes de motilité, sortie et réplication.....	123
Figure 38. Nd11 et Nd12 sont essentiels à l'invasion.....	125
Figure 39. L'absence de Nd11 et Nd12 n'affecte pas la capacité à sécréter les micronèmes.....	126
Figure 40. Validation PCR des clones Nd11_SeCreET et Nd12_SeCreEt.....	127
Figure 41. Nd11 et Nd12 sont indispensables à la sécrétion des rhoptries.	128

Figure 42. Co-immunoprécipitation.....	130
Figure 43. Nombre de parasites intracellulaires après incubation ou non avec 5µg de protéine recombinante Nd11MAR-HIS.....	131
Figure 44. La présence des sérines en C-terminal de Nd12 n'est pas essentielle.	133
Figure 45. Schéma de la technique Signature tagged mutagenesis.	139
Figure 46. Sortie induite et Motilité glissante.....	146
Figure 47.	146
Figure 48.	148
Figure 49. Pourcentage de cellules GFP+ après 1h ou 6h d'incubation avec les parasites S1409A-SeCreEt ou Compl-SeCreEt.....	149
Figure 50. Modèles proposés pour la fonction de Nd11, Nd12 et leurs partenaires. A. Nd11 et Nd12 sont présentes dans le cytoplasme dans des vésicules ainsi que les partenaires.	163
Figure 51. Modèle proposé pour la fonction de PL3.....	165

Table des matières

INTRODUCTION	15
CHAPITRE I. La toxoplasmose et <i>Toxoplasma gondii</i>	17
1. La toxoplasmose.....	19
2. Découverte de <i>T. gondii</i>	21
3. Phylogénie : les Alvéolés, les Apicomplexes	21
4. Cycle de vie	22
1. Cycle sexué.....	22
2. Cycle asexué.....	23
5. Variabilité génétique au sein de l'espèce	24
6. Etude en laboratoire	25
1. Culture in vitro	25
2. Modèle murin.....	25
3. Modification génétiques	26
CHAPITRE II. Biologie cellulaire du stade tachyzoïte.....	29
1. La cellule eucaryote	32
1. Noyau et génome nucléaire	32
2. RE et golgi.....	32
3. Mitochondrie	32
4. VAC.....	32
5. Acidocalcisomes	33
6. Granules d'amylopectine	33
7. La membrane plasmique.....	33
2. L'IMC et le cytosquelette	33
1. Inner membrane complex.....	33
2. Cytosquelette.....	33
3. Apex	35
3. L'apicoplaste	36
4. Granules denses.....	36
1. Composition	36
2. Biogenèse et Adressage	37
3. Sécrétion	38
4. Fonction	38
5. Micronèmes	38
1. Composition	39
2. Biogenèse et Adressage	39
3. Sécrétion	40
4. Fonction	41
6. Rhoptries.....	42
1. Composition	43
2. Biogenèse et adressage.....	43
3. Sécrétion	44
4. Fonction	44
CHAPITRE III. Cycle lytique	47
1. Invasion	49
1. Reconnaissance de la cellule hôte et attachement	50
2. Jonction mobile.....	51
3. Vacuole parasitophore.....	53
2. Réplication	53
1. La réplication de l'ADN.....	54

2.	Formation des cellules filles.....	54
3.	Sortie.....	55
4.	Motilité.....	56
1.	Le glideosome.....	57
2.	Le mouvement de motilité glissante.....	57
CHAPITRE IV. Mécanismes d'exocytose.....		60
1.	L'exocytose chez les métazoaires.....	62
1.	Docking et Priming.....	63
2.	La fusion des membranes.....	64
2.	L'exocytose chez les Ciliés.....	65
1.	<i>Paramecium</i>	65
2.	La sécrétion des trichocystes.....	66
3.	La rosette.....	68
3.	Conservation du mécanisme d'exocytose entre Ciliés et Apicomplexes.....	72
MÉTHODES.....		79
RÉSULTATS – PREMIÈRE PARTIE.....		95
INTRODUCTION.....		97
RÉSULTATS.....		101
1.	Criblage par profil transcriptionnel.....	103
2.	Séquences protéiques de TGME49_261080 et TGME49_292020.....	107
3.	Localisation.....	111
4.	Typologie.....	114
5.	Génération des mutants.....	118
6.	Nd11 et Nd12 sont indispensables à l'invasion.....	123
7.	Nd11 et Nd12 sont indispensables à la sécrétion des rhoptries mais pas à celle des micronèmes.....	125
8.	Nd11 et Nd12 interagissent entre elles et avec deux autres protéines.....	128
9.	Nd11 peut-elle lier la cellule hôte ?.....	130
10.	Quel peut-être le rôle des phosphorylations de Nd12 ?.....	131
RÉSULTATS – DEUXIÈME PARTIE.....		135
INTRODUCTION.....		137
RÉSULTATS.....		143
1.	L'absence de PL3 induit un défaut de capacité invasive.....	145
2.	L'absence de la protéine PL3 n'a pas d'effet sur la capacité à sécréter les micronèmes, sur la motilité et sur la sortie induite.....	145
3.	L'absence de la protéine PL3 induit un défaut de sécrétion des rhoptries.....	147
CONCLUSION ET DISCUSSION.....		151
RÉFÉRENCES.....		165

INTRODUCTION

CHAPITRE I. La toxoplasmose et *Toxoplasma gondii*

1. La toxoplasmose

La toxoplasmose est une maladie parasitaire, causée par l'infection par le parasite *Toxoplasma gondii*. Elle touche tous les animaux à sang chaud, et l'hôte définitif du parasite est le félin, qui est donc le vecteur de transmission. La séroprévalence mondiale de la toxoplasmose humaine varie de 1% en Corée du sud, à 77% au Brésil, ce qui en fait la parasitose la plus répandue (Djurković-Djaković et al., 2019). En France, on estime à près de 50% la population porteuse (Derouin et al., 2015). Cette variabilité est expliquée par les différences dans les modes de vie, notamment l'alimentation et la cuisson des viandes, l'agriculture, la présence d'animaux de compagnies, mais aussi par les différences climatiques. Elle peut aussi s'expliquer par la fréquente absence de symptômes chez les personnes malades, et donc de l'absence de détection, mais aussi par les différences de procédures de prévention selon les pays. Dans l'agriculture, la toxoplasmose représente un grand enjeu économique, lié aux pertes dues avortements chez les animaux infectés, comme chez le mouton par exemple où elle est très répandue (Hartley & Marshall, 1957; Stelzer et al., 2019).

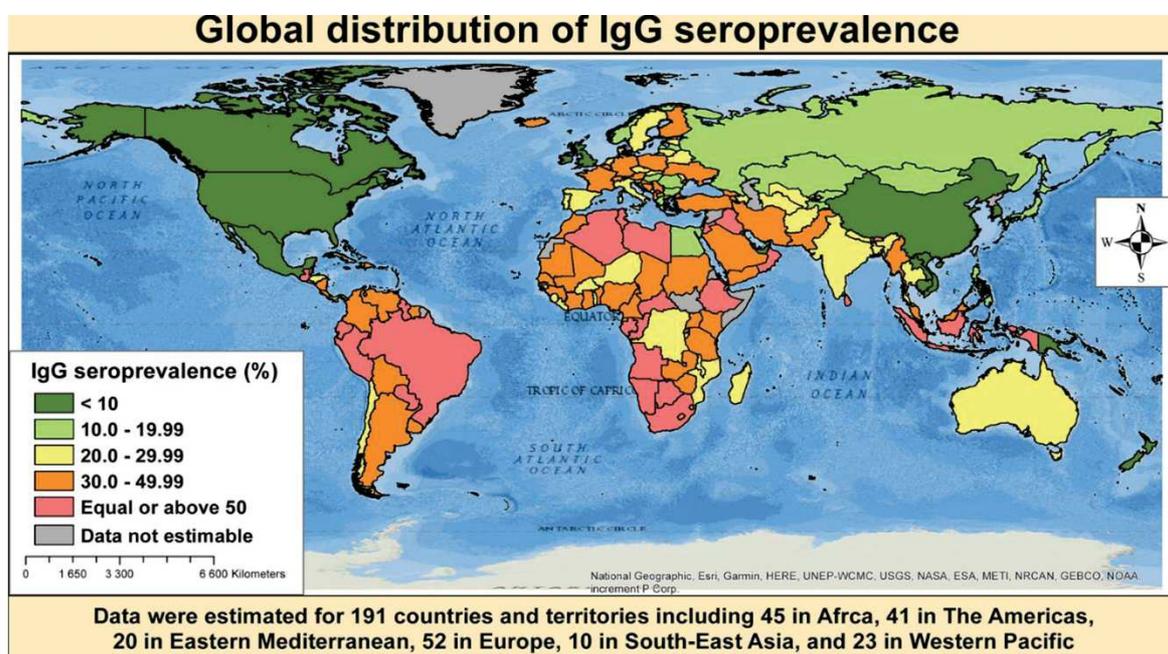


Figure 1. Séroprévalence des IgG chez les femmes enceintes dans le monde. (Bigna et al., 2020)

Comme évoqué précédemment, la toxoplasmose consiste la plupart du temps en une maladie bénigne ou asymptomatique. En revanche, dans le cas de système immunitaire compromis ou chez le fœtus, on peut observer le développement de formes graves.

Dans le cadre d'une primo-infection, on observe une phase dite aigüe, qui correspond à une multiplication rapide du parasite sous sa forme tachyzoïte. C'est durant cette phase que l'on peut observer des symptômes inflammatoires tels que la fièvre. Par la suite, la maladie évolue en une seconde phase dite chronique, durant laquelle les parasites sous leur forme bradyzoïte se développent sous forme de kystes et échappent au système immunitaire.

Si la primo-infection a lieu chez la femme enceinte, on parle de toxoplasmose congénitale. Les tachyzoïtes peuvent traverser la barrière placentaire et infecter le fœtus. En raison du système immunitaire non compétent du fœtus, cela peut induire des malformations et retards de développement graves comme l'hydrocéphalie, la rétinoblastome ou des lésions multi-viscérales. Ces atteintes sont observées dans le cadre d'infections en fin de grossesse, les primo-infections au premier trimestre donnant généralement lieu à un avortement spontané.

Chez les personnes immunodéprimées, comme les patients atteints par le VIH, les tachyzoïtes prolifèrent anormalement et provoquent une inflammation importante. Cette inflammation, selon sa localisation donne lieu à différentes formes de la maladie : atteinte cérébrale (abcès), oculaire (rétinoblastome) ou pulmonaire (pneumopathie hypoxémisante) (McAuley, 2014; Weiss & Dubey, 2009).

A ce jour, il n'existe qu'un vaccin contre l'infection à *T. gondii*. Il s'agit d'un vaccin atténué utilisé chez l'agneau (Toxovax[®], MSD Animal health) (Buxton et al., 1991; Wilkins & O'Connell, 1983). Chez l'Homme, les traitements ciblent uniquement la forme tachyzoïte à réplique rapide : la pyriméthamine est associée à la sulfadiazine, ces deux molécules bloquent la production d'acide folique. Ce traitement est utilisé de manière prophylactique chez les individus immunodéprimés séropositifs, dans le but d'éviter une réactivation des kystes et une nouvelle phase aigüe (Montoya & Liesenfeld, 2004).

La principale lutte contre la toxoplasmose chez les sujets immunodéficients ou les femmes enceintes reste la prévention. Elle consiste en l'information de ces personnes concernant la cuisson de la viande, le contact direct avec les excréments de chats ou la contamination via la terre souillée. La deuxième partie de ces mesures de prévention

consiste au dépistage des femmes enceintes au premier trimestre et le suivi de des femmes sero-négatives tout au long de la grossesse, ainsi que le dépistage régulier des patients atteint du VIH. Dans le cas d'une séroconversion, l'amniocentèse permet de vérifier le passage ou non du parasite trans-placentaire et donc la contamination du fœtus. Les mesures de dépistages concernent également les donneurs d'organes, avec chimioprophylaxie dans le cas d'une séropositivité du donneur et séronégativité du receveur.

2. Découverte de *T. gondii*

La première description de *T. gondii* a été réalisée de façon simultanée entre 1908 et 1909, en Tunisie dans les tissus d'un rongeur endémique le *Ctenodactylus gundii* et au Brésil chez un Lapin (Nicolle & Manceaux, 1908; Splendore A, 1908). Il a été nommé *Leishmania gondii* en raison de l'hôte infecté, et a été premièrement classé dans le genre des *Leishmania*. En 1909, il est renommé *Toxoplasma gondii*, Toxon en latin signifie arc et exprime la forme du parasite observé en microscopie (Nicolle & Manceaux, 1909).

En 1914, 1916 et 1920, trois équipes décrivent la présence d'un parasite protozoaire s'apparentant à *T. gondii* dans des frottis de sang et dans la rate de patients souffrant entre-autre d'anémie et de fièvre (Castellani, 1914; Chalmers & Kamar, 1920; Fedorovitch, 1916). Le premier cas décrivant de façon certaine une toxoplasmose congénitale a été observé en 1923 par l'équipe de Janků, et c'est en 1939 que le parasite a été clairement apparenté comme pathogène humain et relié aux précédentes descriptions de cas (Janku, 1923; Wolf et al., 1939). En 1948, Sabin et Feldman développent un test sérologique, le dye-test, qui montre alors que l'infection à *T. gondii* est commune et a une répartition mondiale (Sabin & Feldman, 1948). C'est enfin dans les années 1970 que plusieurs équipes démontrent que le chat est l'hôte définitif de *T. gondii* (Dubey et al., 1970).

3. Phylogénie : les Alvéolés, les Apicomplexes

T. gondii est un eucaryote unicellulaire, protozoaire, appartenant au superphyllum des Alvéolés (Alveolata). Au sein des Alvéolés, on retrouve les Ciliés, les Dinoflagellés et les Apicomplexes. Les Alvéolés partagent de nombreuses caractéristiques, notamment la présence d'organites sécrétoires. Leur principale caractéristique, d'où ils tirent leur nom, est la présence de vésicules (alvéoles) sous membranaires.

Le phylum des Apicomplexes regroupe, avec *T. gondii*, près de 5000 espèces de parasites dont *Cryptosporidium* et *Plasmodium falciparum* ; ces parasites sont ensemble l'une des causes principales de la mortalité néonatale et infantile. Les Apicomplexes tirent leur nom de la présence d'un complexe apical incluant des organites sécrétoires liés à l'entrée dans la cellule hôte. La plupart des *Apicomplexes* possèdent un organe appelé apicoplaste, issu d'une endosymbiose secondaire d'une algue rouge.

T. gondii appartient à la classe des Coccidies (Figure 2), qui sont caractérisées par le stade oocyste retrouvé dans les fèces des animaux infectés. Les oocystes sont protégés par une épaisse membrane, et sont donc responsables de la voie de transmission oro-fécale de ces parasites.

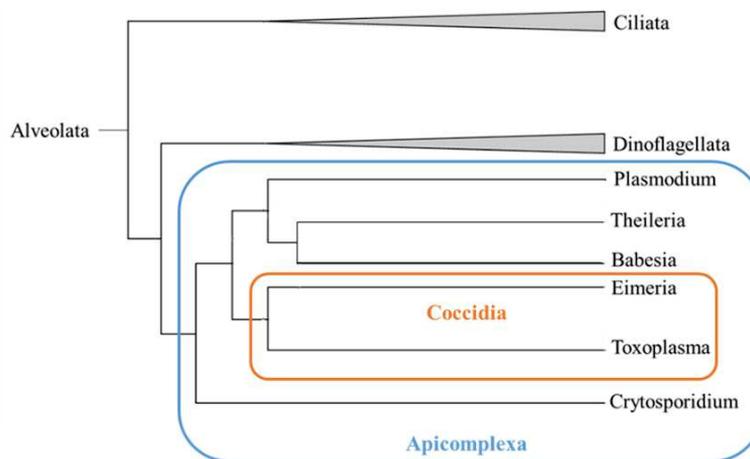


Figure 2. Classification phylogénétique des Apicomplexes

4. Cycle de vie

1. Cycle sexué

Le cycle sexué de *T. gondii* se déroule chez le chat ou tout autre félin, que l'on appelle alors hôte définitif. Le chat infecté est donc vecteur de transmission par la présence d'oocystes dans ses fèces, qui peuvent contaminer un hôte secondaire.

L'infection initiale du félin a lieu après ingestion de kystes contenant des bradyzoïtes présents dans les tissus d'un hôte secondaire infecté. Le kyste est digéré et les bradyzoïtes infectent les cellules de l'épithélium intestinal. A l'intérieur des entérocytes, les bradyzoïtes entre dans une phase de multiplication rapide asexuée, la schizogonie. La schizogonie correspond à plusieurs mitoses du noyau et une division simple du cytoplasme après celles-ci.

On parle alors de mérozoïtes, qui peuvent alors entrer dans un second cycle de schizogonie ou entrer en gamétogonie, la formation de gamètes. Les gamètes mâles, appelés microgamètes, possèdent deux flagelles issus de l'apex et sont relâchés dans le lumen intestinal. Ils fécondent les gamètes femelles appelés macrogamètes dans les entérocytes et s'ensuit alors la formation de l'oocyste, qui possède une épaisse paroi résistante à l'environnement extérieur.

2. Cycle asexué

L'oocyste présent dans les fèces du félin mature à la suite du choc thermique entre l'intestin du félin et l'environnement extérieur. L'oocyste mature contient deux sporocystes de quatre sporozoïtes. Ce processus de sporulation peut durer entre 1 et 4 jours, et un oocyste mature peut rester infectieux dans un sol humide pendant plusieurs mois.

L'hôte secondaire est infecté par la voie oro-fécale par l'oocyste sporulé. Comme les bradyzoïtes, les sporozoïtes envahissent alors l'épithélium intestinal. Ils se différencient en tachyzoïtes, au sein d'une vacuole appelée vacuole parasitophore. C'est la phase du cycle où la multiplication est la plus efficace. Cette phase de multiplication asexuée est appelée endodyogénie. Durant l'endodyogénie, les deux cellules filles se forment au sein de la cellule mère. Après plusieurs cycles d'endodyogénie, les tachyzoïtes sont libérés et infectent de nouvelles cellules dont les macrophages, ce qui permet une dissémination efficace dans tout l'organisme, c'est durant cette phase que l'on observe les symptômes de type inflammatoires.

Pour échapper au système immunitaire, les tachyzoïtes peuvent se différencier en kystes contenant alors des bradyzoïtes. Les bradyzoïtes sont une forme qui peut se multiplier de façon très lente, et résister dans l'organisme plusieurs années. On les retrouve notamment dans le cerveau et les muscles. Lors d'une baisse du système immunitaire, les bradyzoïtes peuvent se réactiver, sortir du kyste et envahir de nouvelles cellules, se reconvertir en tachyzoïte ; on assistera alors à une nouvelle phase aiguë.

L'ingestion de kystes par un hôte secondaire et non un félin, constitue une des voies majoritaires de contamination humaine, en particulier via la viande sous cuite ou crue. Les kystes ingérés se rompent alors dans l'intestin et les parasites se multiplient sous la forme tachyzoïte. Il s'ensuivra alors des cycles asexués tant qu'il n'y aura pas passage chez l'hôte définitif.

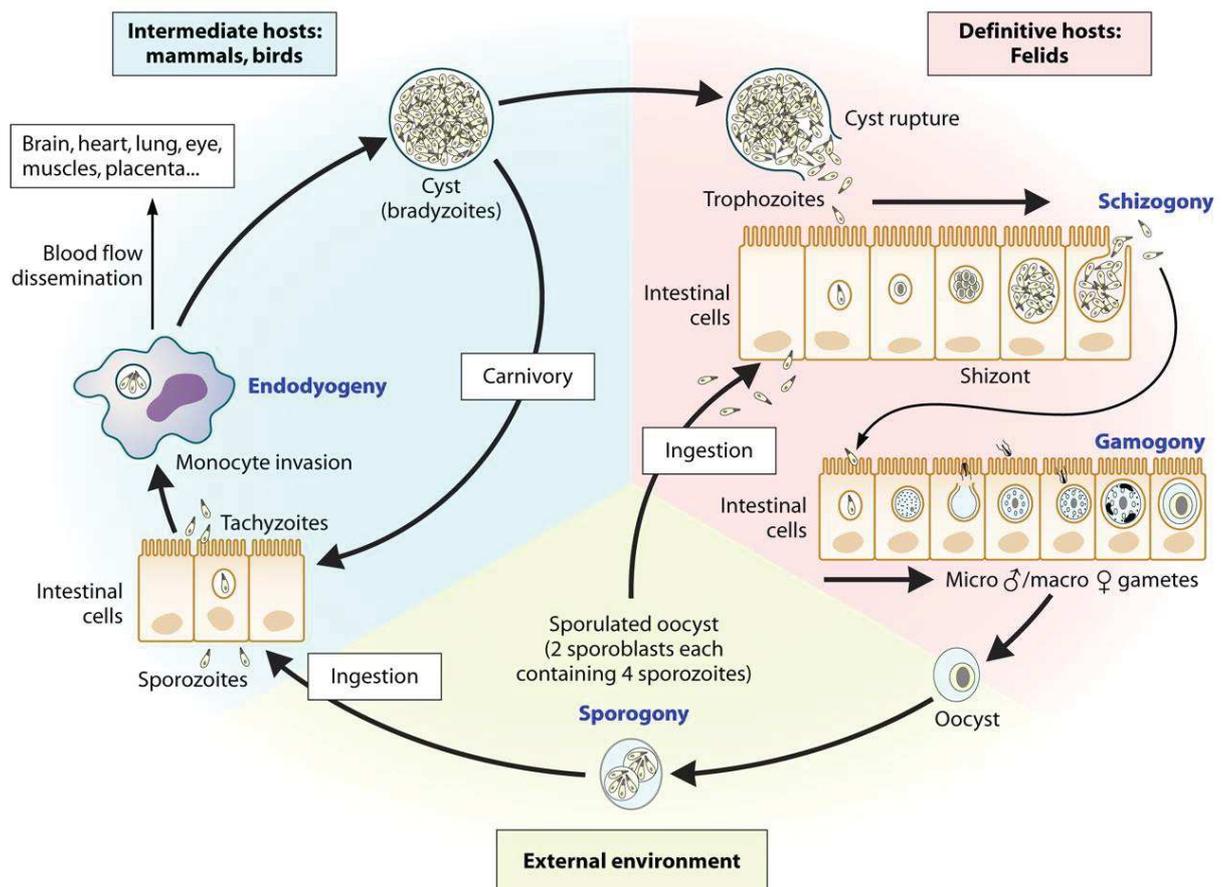


Figure 3. Cycle de vie de *T. gondii*. (Robert-Gangneux & Dardé, 2012)

5. Variabilité génétique au sein de l'espèce

La diversité des hôtes et géographique de *T. gondii* reflète une variabilité génétique importante au sein de l'espèce. Pour étudier cette variabilité, les techniques sont basées sur l'analyse de polymorphismes de longueur des fragments de restrictions (PCR-RLFP) ou sur l'analyse des marqueurs microsatellites, répétitions de motifs de nucléotides. Ces analyses permettent de regrouper l'espèce en 16 haplogroupes. En Europe et en Amérique du nord, on retrouve trois principales lignées clonales, nommées type I, II et III. En Asie, on retrouve les types II et III ainsi que des lignées présentes uniquement localement. En Amérique du Sud, on retrouve le type III et des lignées dites atypiques qui sont beaucoup plus diverses et

divergentes que dans d'autres régions, de part un fort taux de recombinaison génétique. Les souches des trois principaux types diffèrent par leur virulence, le type II étant retrouvé dans la plupart des cas de toxoplasmose humaine (Ajzenberg et al., 2010; Lorenzi et al., 2016; Su et al., 2006, 2012).

6. Etude en laboratoire

1. Culture in vitro

En laboratoire, les souches utilisées pour l'étude du stade tachyzoïte et les analyses génétiques sont des souches de type I nommées RH ou GT-1. On retrouve la première plus fréquemment, bien que les données génomiques soient à ce jour plus abouties concernant la souche GT-1, et que celle-ci ait conservé la capacité à réaliser entièrement le cycle de vie. Pour l'étude du stade bradyzoïte en culture, il est nécessaire de réussir la formation de kystes, par un stress thermique, un pH alcalin, une pauvreté en nutriment ou l'ajout de drogue. Les souches utilisées pour l'obtention de kystes en culture sont les souches de type II ME-49 ou Prugniaud (PRU). Les souches de type III, sont utilisées pour leur très faible virulence chez la souris, comme la souche CTG qui permet l'étude des stades sexués chez le chat ou la souche VEG qui a été utilisée pour comparer l'efficacité d'infection entre différents stades.

De nombreuses lignées cellulaires, notamment des lignées immortalisées comme les lignées Vero, CHO ou HeLa permettent de maintenir *T. gondii* en culture. Cependant, la lignée primaire utilisée le plus largement pour la culture de *T. gondii* est la lignée HFF (human foreskin fibroblast) (Khan & Grigg, 2017).

2. Modèle murin

L'infection d'une souris par moins de dix parasites de type I est suffisante pour entrainer sa mort, tandis qu'il en faut plus de 1000 pour les souches de type II et III. Ce sont ces dernières qui sont utilisées notamment pour l'analyse de la phase chronique, de la réactivation, et l'étude des kystes. Les souches de type I ne se différencient que peu en bradyzoïtes et l'animal meurt de la phase aigüe de la maladie en 10 à 12 jours. Les souches de type III sont très peu virulentes chez la souris.

La pathogénicité du parasite dépend de la lignée murine. Les souris des lignées consanguines C57Bl/6 sont très susceptibles à l'infection par *T. gondii* comparativement aux souris sauvages. Elles sont donc utilisées pour l'étude de la réaction immunitaire notamment. Les autres lignées consanguines, comme Balb/c ou CBA/j sont également utiles de par la forte quantité de kystes produits par animal (500 à 3000). Les lignées dites « outbreak », comme les CD-1, permettent une étude des infections chroniques.

3. Modification génétiques

Les conditions de transfection de *T. gondii* ont été mises au point en 1993, permettant la modification de gènes ou l'expression transitoire de plasmides, ceux-ci ne persistant pas sous la forme d'épisomes (R. G. Donald & Roos, 1993; Kim et al., 1993; D. Soldati & Boothroyd, 1993). Ces modifications génétiques sont liées à l'intégration aléatoire dans le génome ou la recombinaison homologue permettant une modification spécifique. Contrairement à *P. falciparum*, *T. gondii* possède deux systèmes de réparation de l'ADN, la jonction non-homologue et la recombinaison homologue. C'est cette dernière qui a été favorisée dans les dernières découvertes génétiques et qui a permis la mise au point de nombreuses méthodes d'édition du génome de *T. gondii*. En 2009, la suppression dans une souche de type I du gène *Ku80*, codant pour le système de réparation par jonction non-homologue, a permis l'obtention d'une lignée ne réparant les cassures de l'ADN que par recombinaison homologue, et non par l'ajout et la délétion aléatoire de nucléotides (Fox et al., 2009; My-Hang Huynh & Carruthers, 2009). Grâce à ces souches mutées pour le gène *ku80* (souche RH Δ ku80), l'insertion de séquences ADN de façon ciblée est favorisée, et facilite la mutation aisée de gènes de façon spécifique. Ce locus a par la suite été supprimé également dans les souches Me49 et PRU permettant la modification génétique plus efficace de ces souches de type II (Souches Me49 Δ ku80 et PRU Δ ku80).

T. gondii étant un parasite intracellulaire, les marqueurs de sélections sont limités. Les drogues utilisées en tant que telles ciblent les gènes codant pour la chloramphenicol acetyltransferase (CAT) ou, la dihydrofolate reductase (DHFR), le gène de résistance à la phléomycine (BLE). La délétion du gène de résistance à l'hypoxantine xanthine guanine phosphoribosyl transferase (HXGPRT) a permis d'utiliser cette drogue comme moyen de sélection (R. G. K. Donald et al., 1996). De même, l'insertion dans le gène de l'*UPRT* permet d'empêcher la conversion de la pyrimidine en 5' fluoro-dUMP et l'inhibition de la synthèse de la thymidine par la drogue 5-Fluorodeoxyuridine FUDR, ce qui est normalement létal pour

le parasite. L'insertion dans ce locus en parallèle avec un traitement FUDR est donc une méthode de sélection largement utilisée, notamment pour la complémentation de gènes d'intérêt pouvant être contrôlés par leur propre promoteur ou par celui de l'*UPRT*.

Le système CRISPR a été adapté d'un système de défense bactérien contre l'ADN étranger. Il en existe trois principaux types ayant des spécificités différentes, notamment au niveau de la reconnaissance d'ADN ou d'ARN (Cas3, Cas9 et Cas10). Le système CRISPR-CAS9 consiste en la transfection d'un plasmide codant pour l'endonucléase Cas9 et un ARN appelé ARNguide (ARNg). L'ARN guide contient 20 bases complémentaires au gène d'intérêt suivies d'une séquence de 3 nucléotides appelée PAM (NGG) et va diriger l'endonucléase Cas9 vers cette séquence. La séquence PAM est reconnue par la Cas9 et ralentit le scanning de l'ADN par le complexe Cas9/ARNg qui va permettre la coupure double brin 3 bases en amont. Grâce au système de réparation par homologie, la co-transfection de ce plasmide avec un second contenant un ADN dit donneur, permet son intégration au site de coupure (Shen et al., 2014; Sidik et al., 2014). En 2016, ce système a été utilisé pour analyser tout le génome de *T. gondii* par la mutation de chacun des gènes codant pour des protéines. Cette analyse a permis d'attribuer un score phénotypique à chacun de ces gènes prédisant leur essentialité à la survie du parasite *in vitro* (Sidik et al., 2016).

L'ajout d'épitope pour la localisation de protéine est largement utilisé et très efficace, avec une très grande variété de gènes reporters comme la GFP, m-Cherry, la β -galactosidase ou de simples épitopes comme Flag, HA, Myc ou Ty.

En addition à la possibilité de suppression de gènes (knock out), le modèle *T. gondii* permet l'utilisation de plusieurs systèmes dits inductibles pour la mutation de gènes essentiels au parasite. Ces systèmes sont de nos jours largement utilisés en laboratoire, car les techniques basées sur les ARNi ne sont pas efficace chez *T. gondii*.

Il est possible d'agir au niveau transcriptionnel ou au niveau protéique. Pour contrôler de façon rapide, stable et réversible l'abondance d'une protéine, il est possible de fusionner un domaine de déstabilisation (DD) contrôlé par un ligand appelé Shield-1. Le domaine de déstabilisation est originaire de la protéine de liaison à la rapamycine FK-506. En présence du Shield, la protéine est stable et sa concentration intracellulaire n'est pas affectée, tandis qu'en l'absence du Shield, elle est redirigée vers le protéasome et dégradée et donc indétectable (Herm-Götz et al., 2007). Une autre manière de dégrader de façon inductible une protéine est d'utiliser le système auxine. En utilisant la lignée exprimant TIR1,

un récepteur de l'auxine issu des plantes, et en fusionnant le gène d'intérêt avec une séquence appelée AID pour Auxine Inducible Degron. En absence d'auxine, la protéine est exprimée normalement, en fusion avec la séquence AID et un tag permettant de la visualiser. Lors de l'ajout d'auxine TIR1 prend une conformation active et reconnaît la séquence AID puis polyubiquitine la séquence, ce qui dirige la protéine vers le protéasome où elle est dégradée (Long et al., 2017).

Trois autres systèmes inductibles permettent de contrôler le niveau d'expression de gènes chez *T. gondii*. La Cre-recombinase, issue du bactériophage P1, permet la recombinaison de l'ADN entre deux séquences de 34 paires de bases appelées LoxP. Le gène d'intérêt est donc flanqué de deux séquences LoxP, et l'on intègre le gène de la Cre-recombinase dans le génome du parasite (Brecht et al., 1999, p. 199). La dimérisation de la Cre-recombinase rend ce système inductible et l'excision réversible. En effet, les domaines N-terminal et C-terminal de la Cre-recombinase sont codés séparément avec deux tags, qui se lient en présence de rapamycine et ceci fusionne les deux dimères en une recombinaison active qui excise le locus entre les séquences LoxP. En l'absence de rapamycine, la Cre-recombinase est inactive et le locus intact (Andenmatten et al., 2013). Le système U1 utilise également la dimérisation de la Cre-recombinase, en l'associant aux small ribonucleic particles (snRNP) U1 qui sont impliquées dans le splicing des pre-ARN messagers. Le système Di-cre est alors utilisé ici pour positionner le site U1 sur l'exon terminal et la rapamycine permet de contrôler la dégradation de l'ARNm par la machinerie U1 (Pieperhoff et al., 2015).

Le dernier système inductible efficace chez *T. gondii* est le système Tet-Off. Le gène d'intérêt est alors placé sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline dans une lignée de *T. gondii* exprimant le transactivateur appelé TATi. Lors de l'ajout de tétracycline au milieu de culture, le transactivateur s'y liera et changera de conformation, ne pouvant ainsi pas se fixer sur le promoteur inductible et permettre la transcription du gène (Meissner, Schlüter, et al., 2002).

CHAPITRE II. Biologie cellulaire du stade tachyzoïte

Le tachyzoïte est une cellule polarisée de forme arquée, d'où il tire son nom, de 2µm par 6-8µm. Il possède une membrane plasmique sous laquelle sont assemblées les vésicules constituant le complexe membranaire interne (IMC). Comme toute cellule eucaryote, le tachyzoïte est constitué d'un cytoplasme enfermant un noyau, une mitochondrie, un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique. Il possède un complexe apical caractéristique des Apicomplexes, formé par des structures liées au cytosquelette, comme le conoïde, l'apical polar ring (APR) et le pré-conoïdal ring (PCR), et par les organites sécrétoires appelés rhoptries et micronèmes. Les granules denses sont la troisième classe d'organite sécrétoire, mais ne sont pas liés au pôle apical. L'information génétique est répartie entre le noyau, la mitochondrie, et l'apicoplaste, un organe multi-membranaire endosymbiotique présent uniquement chez les Apicomplexes (mais pas chez *Cryptosporidium*). On observe également un compartiment VAC de type « vacuole digestive », ainsi que des compartiments de stockage comme les granules d'amylopectine, qui reste plutôt une caractéristique du stade bradyzoïte, et des acidocalcisomes.

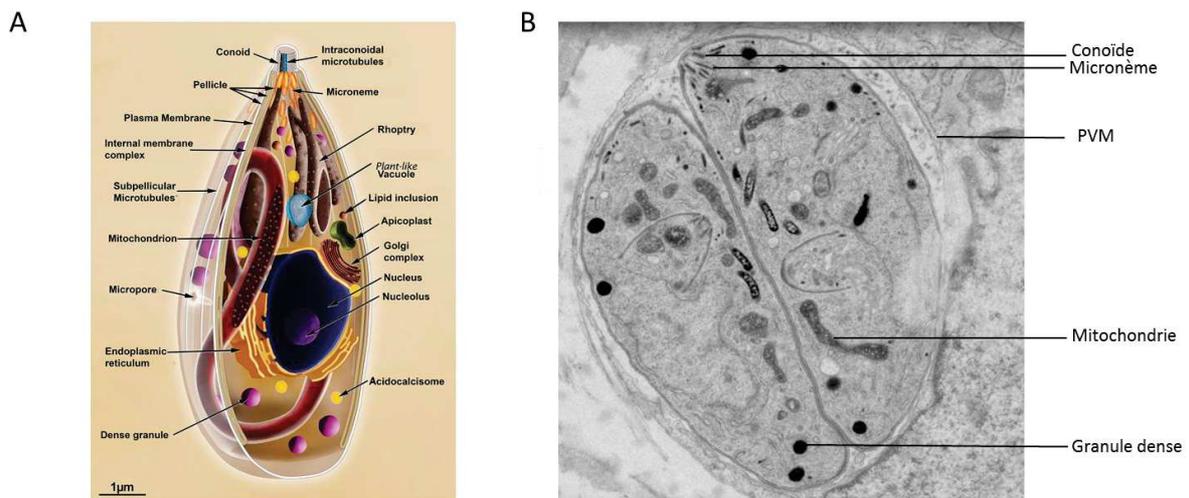


Figure 4. Le tachyzoïte. A. Schématisation de la structure d'un tachyzoïte de *T. gondii*. (Attias et al., 2020). B. Image en microscopie électronique de deux tachyzoïtes dans leur vacuole parasitophore. Les rhoptries ne sont pas visibles sur cette coupe. (Laurence Berry-Sterkers et Justine Heckendorn).

1. La cellule eucaryote

1. Noyau et génome nucléaire

Le génome nucléaire de *T. gondii* est haploïde et contient 65 mégabases réparties en 14 chromosomes de taille variable de 2 à 8 mégabases. A ce jour, 8158 gènes codant pour des protéines sont identifiés.

2. RE et golgi

Le réticulum endoplasmique est localisé principalement postérieurement au noyau. Il est de petite taille, co'mme le Golgi qui lui est constitué de 3 à 5 vésicules. L'espace transitionnel entre le RE et l'appareil de Golgi est entouré d'une membrane issue d'enveloppe nucléaire et constitue le lieu de stockage des protéines possédant un signal de rétention. Le réticulum endoplasmique permet l'export de protéines vers la membrane plasmique ou les organites sécrétoires. Les protéines sont adressées au RE via la reconnaissance d'un signal peptidique situé en N-terminal qui est clivé lors de son passage (Joiner & Roos, 2002).

3. Mitochondrie

T. gondii possède une mitochondrie unique au génome d'une taille de 6 kilobases. Durant l'endodyogénie, la mitochondrie subit une extension et entre dans les cellules filles en formation en fin de division seulement, une partie de la mitochondrie de la cellule mère restant dans le corps résiduel (Nishi et al., 2008). La mitochondrie des tachyzoïtes est associée à l'IMC durant le cycle lytique. Au moment de la sortie de la cellule, la mitochondrie a une morphologie moins allongée et plus condensée, qu'elle garde jusqu'à l'invasion d'une nouvelle cellule (Ovcariakova et al., 2017). La morphologie de la mitochondrie est affectée en l'absence d'effecteurs de l'autophagie, suggérant un lien avec ce processus.

4. VAC

Le tachyzoïte possède un compartiment vacuolaire apparenté à une vacuole digestive ou à une vacuole de plante. Sa fonction est liée au stockage de calcium et de transport de sodium (Miranda et al., 2010). Ce compartiment est lié au système endosomal (McGovern et al., 2018; Parussini et al., 2010) et via ce transport permet la dégradation rapide de protéines de l'hôte internalisées durant ou après l'invasion. Elle est également impliquée dans la réduction de la concentration intracellulaire de zinc (Chasen et al., 2019). Sa fonction de vacuole digestive est confirmée par la présence de protéases qui sont impliquées

notamment dans la digestion d'autophagosomes et la survie des parasites dans les kystes via l'autophagie (Di Cristina et al., 2017).

5. Acidocalcisomes

Les acidocalcisomes sont des compartiments alcalins de stockage d'ion calcium. On y trouve également de nombreux autres cations tels que Mg^{++} , Na^+ , Zn^{++} et K^+ , lié à des polymères de phosphate. Il a été mis en évidence la présence d'ATPase à Ca^{++} et de pompes à proton, liées au maintien de l'homéostasie calcique dans la cellule (Luo et al., 2005; Rodrigues et al., 2002; Rohloff et al., 2011).

6. Granules d'amylopectine

Les granules d'amylopectines peuvent être absents au stade tachyzoïte, et sont plutôt caractéristiques du stade bradyzoïte (kystes). L'amylopectine est un polysaccharide, ces granules sont un donc un organite de stockage, et semblent être une source de nutriment pour le parasite (Guérardel et al., 2005).

7. La membrane plasmique

Des glycoprotéines de surface, appelées SAG pour surface antigen, sont ancrées par des groupements glycosylphosphatidylinositol (GPI). Elles sont impliquées dans la réponse immunitaire contre le parasite mais aussi dans les processus d'attachement, notamment la protéine SAG1 (Burg et al., 1988; Mineo et al., 1993; Mineo & Kasper, 1994).

2. L'IMC et le cytosquelette

1. Inner membrane complex

L'IMC est constitué par les vésicules sous membranaires qui permettent de classer *T. gondii* au sein des Alveolata. Ces vésicules rectangulaires aplaties longent la membrane plasmique jusqu'au pôles (Porchet & Torpier, 1977). Elles sont organisées en trois rangées et sont suturées entre elles, tandis qu'une unique vésicule coiffe le pôle apical. L'IMC est associé au cytosquelette d'actine et aux microtubules sous-pelliculaires, et les protéines GAP40, GAP50 et GAP45 permettent la motilité glissante via l'ancrage au glideosome, le moteur actine-myosine (Fréchal et al., 2010). La formation de l'IMC des cellules filles durant l'endodyogénie permet la compartimentation des organites néo-formés avant leur accollement à la membrane plasmique et le bourgeonnement des nouvelles cellules (Harding & Meissner, 2014).

2. Cytosquelette

Les microtubules sont répartis dans 3 réseaux. L'un de ces réseaux est réparti sous l'IMC de façon uniforme, formant une spirale qui s'étend du pôle apical jusqu'au-dessous du noyau. Ils sont appelés microtubules sous pelliculaires. Ces 22 microtubules sont organisés depuis le pôle apical où se trouve l'APR ou le centre organisateur des microtubules (MTOC) et sont importants pour l'organisation polaire du parasite, mais également pour sa forme et le trafic intracellulaire. Le second réseau, organisé au départ de deux centrioles situés au-dessus du noyau, constitue le fuseau mitotique et permet la ségrégation de chromosomes. Les centrioles sont constitués de neufs singlets de microtubules. Enfin, on observe également des microtubules intraconoidaux (Morrissette, 2015).

L'actine filamenteuse est impliquée dans la motilité du parasite, et est majoritairement présente sous la forme globulaire, pouvant rapidement polymériser en filaments à une faible concentration (Periz et al., 2017). Les Apicomplexes ne possèdent pas le complexe Arp2/3 de régulation de l'actine mais des molécules nommées formines et profiline qui régulent la polymérisation de l'actine (Schüler & Matuschewski, 2006; Skillman et al., 2012; Tosetti et al., 2019). L'actine est encodée par un seul gène, ACT1 qui possède 80% d'identité avec l'actine des mammifères (Dobrowolski et al., 1997; Skillman et al., 2011). En revanche, *T. gondii* possède une dizaine de gènes codant pour des molécules dites « actin-like » impliquées dans le remodelage de la chromatine, la motilité et le transport de vésicules (Gordon & Sibley, 2005).

3. Apex

Le complexe apical est constitué du conoïde et des organites sécrétoires micronèmes et rhoptries. Le conoïde est un tube de forme conique constitué de 10 à 14 fibres de tubuline organisées en spirales (Hu et al., 2006). A l'ouverture apicale du conoïde se trouve les deux anneaux préconoïdaux (PCR). Sous les PCR se trouve l'APR. Lorsque le conoïde est extrudé, durant la sortie ou l'invasion d'une cellule, l'APR se trouve au niveau de l'ouverture postérieure du conoïde. L'APR est le MTOC des microtubules sous pelliculaires. A l'intérieur du conoïde se trouve deux microtubules intraconoïdaux. Le long de ces deux microtubules se trouvent plusieurs vésicules dont le rôle n'est pas connu, ainsi que le col d'une ou plusieurs rhoptries.

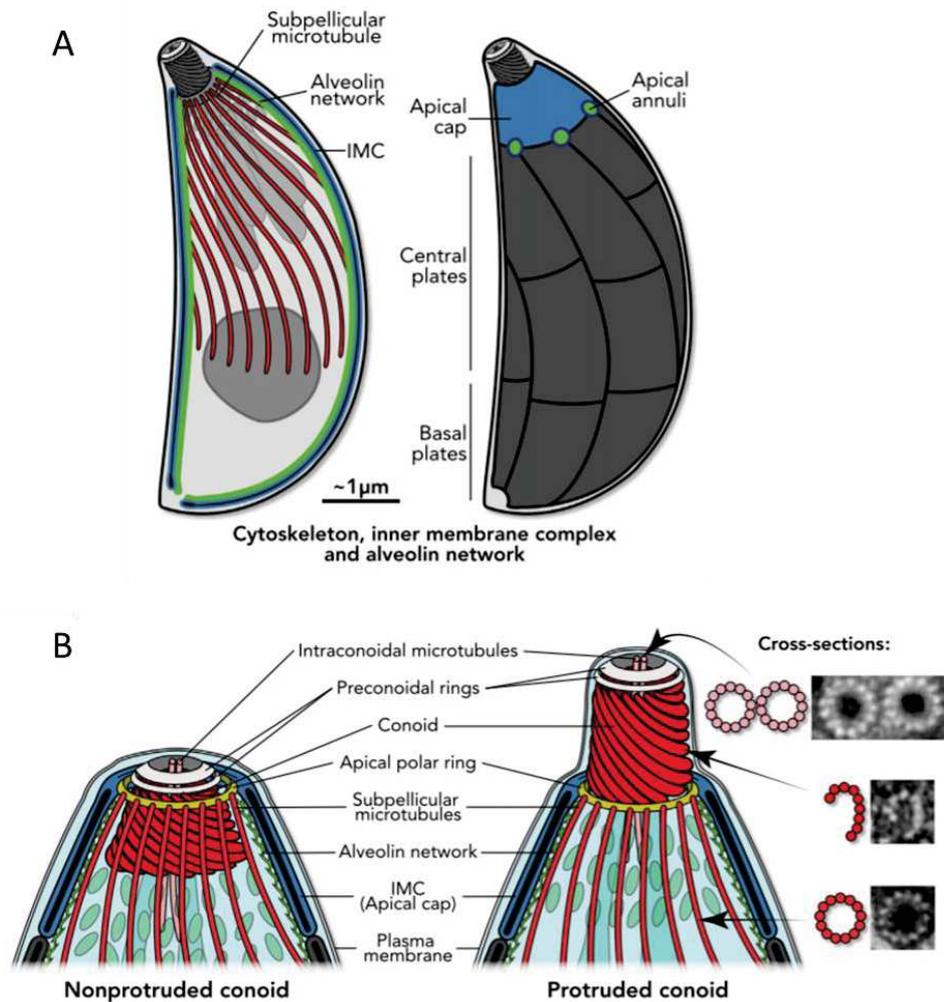


Figure 5. L'IMC et le complexe apical. A. Schématisation de l'organisation des microtubules sous pelliculaires et des plaques d'IMC. **B.** Schématisation du complexe apical et du conoïde. On observe les anneaux APR et PCR. A l'état intracellulaire, le conoïde du tachyzoïte est non extrudé (Nonprotruded). (Dos Santos Pacheco et al., 2020)

On observe en microscopie électronique des vésicules arrangées le long des microtubules intraconoïdaux, dont le rôle et la composition sont inconnus. Une vésicule plus apicale est

située sous la membrane, entre la membrane du parasite et celle de la rhoptrie, son rôle, potentiellement lié à la sécrétion des rhoptries, est inconnu. Des récents travaux procurent une hypothèse nouvelle sur la fonction de cette vésicule, et sont décrits dans le chapitre IV (Jean Francois Dubremetz & Entzeroth, 1993; Paredes-Santos et al., 2012; Porchet & Torpier, 1977) .

3. L'apicoplaste

L'apicoplaste est un organe avec 4 membranes, ce qui permet d'affirmer son origine endosymbiotique. Il provient d'une algue rouge et a perdu sa capacité de photosynthèse (Janouskovec et al., 2010). Il possède son propre génome circulaire, d'une taille de 35 kilobases. Les protéines de l'apicoplastes encodées par des gènes nucléaires sont adressées via le RE grâce à une extension en N-terminal. L'apicoplaste est impliqué dans la voie fer-souffre, la synthèse des acides gras et d'isopentenyle diphosphate (précurseur des isoprénoïdes) et en parallèle avec la mitochondrie pour la biosynthèse de l'hème (McFadden & Yeh, 2017). Des transporteurs localisés dans les membranes de l'apicoplaste permettent l'import d'éléments carbonés pour le fonctionnement de ces voies métaboliques (Brooks et al., 2010).

4. Granules denses

Les granules denses sont des vésicules de 200nm de diamètre denses aux électrons retrouvées chez les Apicomplexes. Leur contenu est sécrété dans la vacuole parasitophore ou sa membrane et dans la cellule hôte, elles empruntent la voie de sécrétion constitutive (Karsten et al., 1998; Striepen et al., 1998).

1. Composition

Les granules denses contiennent les protéines nommées GRAs. Ces protéines sont impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire, et ne partagent pas d'homologies, seule leur localisation permet de les attribuer à cette famille de protéines. Les GRA sont des protéines de petite taille, entre 20 et 75 kilo-Daltons, partiellement solubles. Elles possèdent (hormis GRA20) un peptide signal N-terminal hydrophobe. La plupart d'entre elles ne sont pas décrites comme essentielles au cycle lytique des souches de type I. Une fois sécrétées elles sont généralement associées à la membrane de la vacuole parasitophore, à un réseau de tubules intra-vacuolaire mais peuvent également être adressées au noyau. Il y a 16 GRAs considérées comme « canoniques » et des protéines nommées « GRA-like protéines » qui sont de potentielles GRAs ayant une faible expression ou un timing d'expression des

ARNmessagers ne correspondant pas au profil connu des GRAs (Mercier & Cesbron-Delauw, 2015).

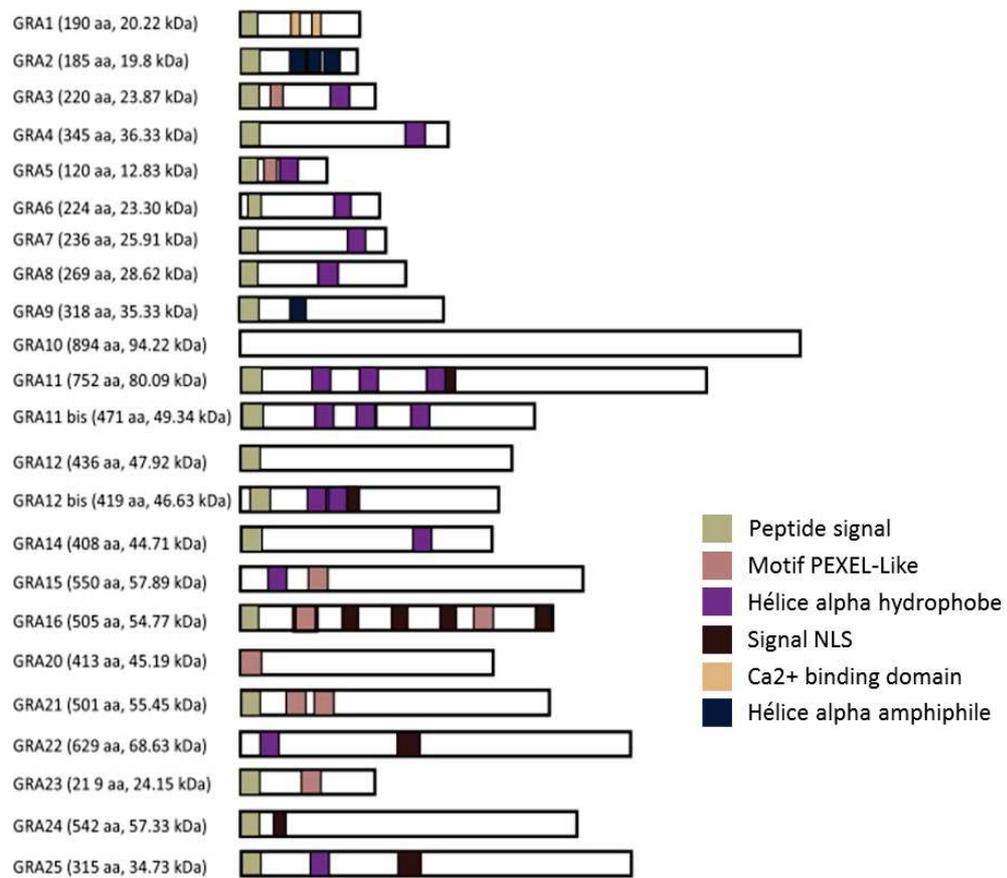


Figure 6. Représentation de la structure protéique des GRAs. (Mercier & Cesbron-Delauw, 2015)

2. Biogenèse et Adressage

La biogenèse des granules denses est peu connue. On estime qu'elle est dirigée par un mécanisme d'agrégation des protéines (Venugopal & Marion, 2018). Il n'y a aucun motif commun aux GRAs adressant ces protéines à l'organite. MYR1, MYR2 et MYR3, des protéines clivées de granules denses, qui localisent dans la PV et sont associées à la membrane, sont essentielles pour le transport de certaines GRAs, en dehors de la PV dans le cytoplasme de la cellule hôte et le noyau de la cellule hôte (Franco et al., 2016; Marino et al., 2018). MYR1 et MYR3 forment un complexe stable à la membrane de la PV, suggérant qu'elles font partie d'un translocon. ROP17, une protéine sérine/thréonine kinase de rhoptries, semble également être impliquée dans la translocation des GRA à travers la PVM (Panas et al., 2019).

3. Sécrétion

La sécrétion des granules denses a lieu après l'invasion, dans ce que l'on appelle un « burst » et une fois la vacuole parasitophore formée la sécrétion est dite constitutive. Elle persiste durant la totalité de la réplication, les GRAs étant détectées dans la vacuole parasitophore jusqu'à sa rupture lors de la sortie de la cellule (V. Carruthers & Sibley, 1997). Une petite GTPase, Rab11a est impliquée dans le transport et la sécrétion du contenu des granules denses dans l'espace vacuolaire (Venugopal et al., 2020).

4. Fonction

Les GRA sont impliquées dans la maturation de la vacuole parasitophore et de la paroi des kystes dans le cas de la conversion en bradyzoïtes (Mercier & Cesbron-Delauw, 2015). Elles sont également sécrétées dans la cellule hôte où elles modulent notamment l'expression génique en étant adressées au noyau, comme GRA15, GRA16 ou GRA24 (Bougdour et al., 2013; Braun et al., 2013; Rosowski et al., 2011). GRA2 et GRA6 participent à la formation d'un réseau de tubules sous membranaires connectés à la membrane de la vacuole parasitophore (Mercier et al., 2002; Sibley et al., 1995). GRA17 et GRA23 permettent les échanges entre la PV et la cellule hôte en formant des pores dans la membrane de la PV (Gold et al., 2015). *In vitro*, la délétion des gènes de GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7 ou GRA14 n'affecte pas la croissance des parasites (Mercier & Cesbron-Delauw, 2015).

5. Micronèmes

Les micronèmes sont des organites abondants en forme de bâtonnets arrondis aux extrémités, qui sont regroupés au pôle apical des parasites Apicomplexes. Chez *T. gondii*, ils sont concentrés sous le conoïde, mais on observe également une seconde localisation préférentielle des micronèmes au niveau périphérique, le long de la membrane. Les micronèmes contiennent de nombreuses protéines, qui une fois sécrétées sont impliquées dans les mécanismes de motilité, sortie et invasion et dans la sécrétion des rhoptries.

1. Composition

Les protéines de micronèmes regroupent différentes classes et fonctions. On retrouve des perforines-like, comme PLP1, mais également des protéines possédant des motifs d'adhésion. Ces adhésines sont nommées MIC, et forment des complexes qui s'assemblent durant le trafic dans des pré-micronèmes. Les domaines d'adhésion permettent notamment la liaison à l'acide sialique (Friedrich et al., 2010).

Parmi les protéines MIC, MIC8 n'est pas impliquée dans l'adhésion mais est indispensable à la sécrétion des rhoptries et donc à la formation de la jonction mobile (décrite dans le chapitre III) (Kessler et al., 2008).

La dernière classe de protéines composant les micronèmes sont nommées Apical Membrane Antigen, AMA. Elle comprend AMA1, AMA2, AMA3 et AMA4 et sont connues pour interagir avec des protéines de rhoptries (RON2, RON2_{L1} et RON2_{L2}) durant l'invasion (M. H. Lamarque et al., 2014).

2. Biogenèse et Adressage

La transcription des protéines de micronèmes a lieu en fin de mitose, ce que l'on nomme la phase Mitose/Cytodiérèse (M/C) (Nishi et al., 2008). Le trafic des protéines de micronèmes chez *T. gondii* utilise le système endocytaire via un peptide signal d'adressage au RE et impliquant notamment un récepteur transmembranaire du Golgi, la sortiline SORTLR, dont la déplétion affecte la biogenèse des rhoptries et micronèmes (Sloves et al., 2012). Un compartiment de type endosome, les pré-micronèmes, permet ensuite la maturation des MIC par clivage protéolytique de leur propeptide (El Hajj et al., 2008; Parussini et al., 2010). La protéine DrpB, une dynamine qui localise au niveau du Golgi et de ce compartiment, permet leur adressage à ce compartiment intermédiaire (Breinich et al., 2009).

On estime qu'il y aurait deux populations de protéines de micronèmes, qui suivraient deux voies de trafic différentes. En effet, MIC3, MIC8 et MIC11 sont affectées par la surexpression des petites GTPases Rab5A et Rab5C, et la déplétion des complexes d'adressage endosomaux ; « homotypic fusion and vacuolar protein sorting » (HOPs) et « Class C core vacuole/endosome tethering » (CORVET), sont eux impliqués dans l'adressage de MIC2, MIC6 et AMA1 (Kremer et al., 2013; Morlon-Guyot et al., 2015).

L'implication de transporteurs, comme TFP1, localisé aux micronèmes ou TFP4 localisé au Golgi, dans la biogenèse ou la maturation des micronèmes a été démontrée, bien

que le substrat transporté ne soit pas encore connu à ce jour (Hammoudi et al., 2018). De plus, la localisation des micronèmes est étroitement liée aux microtubules subpelliculaires (Leung et al., 2017), et les composants des complexes moteurs, kinésine ou dynéine, associés aux microtubules semblent être impliqués dans la bonne localisation des micronèmes au site d'exocytose (Lentini et al., 2019).

3. Sécrétion

La cascade de signalisation est initiée par la production de cGMP par une guanylate cyclase, ce qui permet l'activation de la protéine kinase G (PKG) (Bisio et al., 2019; Brown et al., 2017).

Les changements de concentration en K^+ extracellulaire, induisent l'activation de la phosphoinositide-phospholipase C (PLC), qui transforme le PI(4,5)P₂ en Inositol triphosphate (IP₃) et Diacylglycerol (DAG) (Brochet et al., 2014; Fang et al., 2006). Le DAG est converti en acide phosphatidique (PA) par la DAG kinase 1 (Bullen et al., 2016). Le PA ainsi produit est détecté à la surface des micronèmes par une protéine nommée APH contenant un domaine pleckstrin-homology (PH) acétylé. Elle est indispensable à la sécrétion des micronèmes. Bien que la fusion membranaire entre les micronèmes et la membrane plasmique ne soit pas encore comprise, et que nous ignorions si elle est médiée par des protéines de type Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors, (SNARE) qui ne sont pas encore identifiées, DOC2.1 permettrait le rapprochement des membranes en recrutant la machinerie indispensable à cette fusion (Farrell et al., 2012).

La production d'IP₃ par la PLC induit la libération de Ca^{++} intracellulaire, ce qui permet l'activation de protéines kinases calcium dépendantes (CDPK), qui seraient impliquées dans la phosphorylation de protéines permettant l'exocytose des micronèmes et la motilité (Treeck et al., 2011).

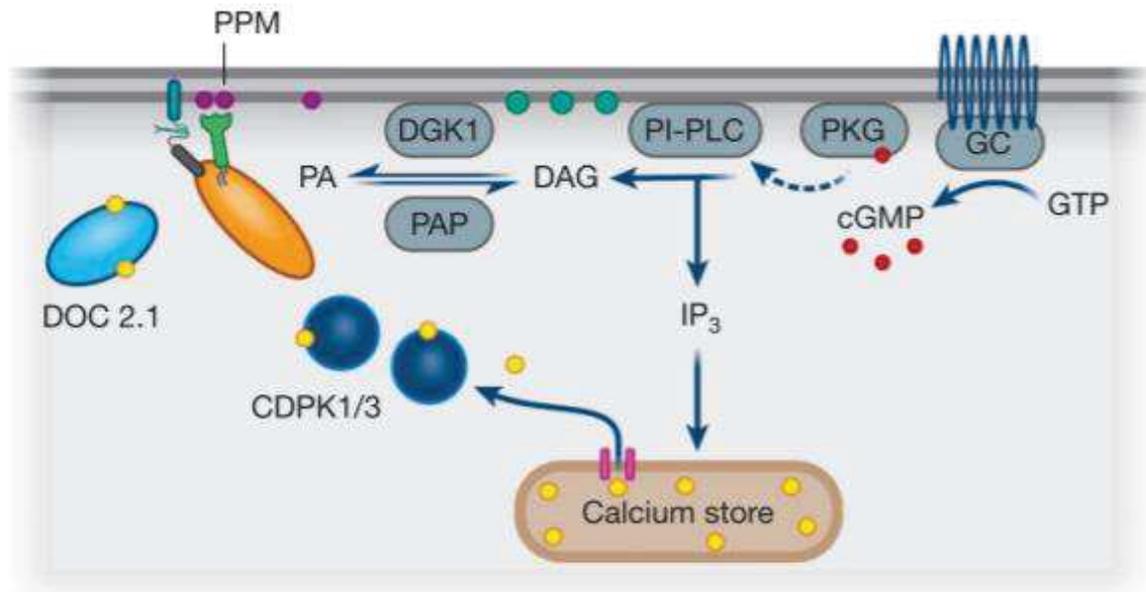


Figure 7. Cascade de signalisation donnant lieu à la sécrétion des micronèmes. (Dubois & Soldati-Favre, 2019)

Le cytosquelette et notamment celui du conoïde, joue un rôle dans la sécrétion des micronèmes. Les micronèmes sont alignés sur les microtubules corticaux et cette organisation est indispensable à leur sécrétion et permettrait leur transport (Leung et al., 2017). Durant la sécrétion des micronèmes, le conoïde protude puis se rétracte. RNG2, une protéine de l'anneau apical polaire contribue à la sécrétion des micronèmes sans que son absence ne modifie la structure du conoïde ou de l'APR (Katris et al., 2014). Une seconde protéine localisée au pôle basal, la centrine 2, est également indispensable à la sécrétion des micronèmes (Lentini et al., 2019; Leung et al., 2019). De plus, les protéines centrine ont la capacité de lier le calcium, ce qui pourrait lui conférer un rôle important dans la cascade de signalisation (Dubois & Soldati-Favre, 2019; Leung et al., 2019).

4. Fonction

Les protéines de micronèmes sont cruciales au sein des mécanismes de reconnaissance de la cellule hôte, d'invasion, de sécrétion des rhoptries, de motilité, et de sortie de la cellule.

Avant l'invasion, c'est-à-dire l'entrée dans la cellule hôte par le parasite, discutée dans le chapitre III.1., les protéines de micronèmes sont transloquées à la surface du parasite, elles permettent la reconnaissance et un attachement non serré à la cellule hôte. AMA1 est ainsi relocalisée sur la membrane, on la retrouve couvrant toute la surface des parasites extracellulaires, puis elle se lie à des protéines de rhoptries dans ce que l'on nomme la jonction mobile (III, 1, 1.2). AMA1 forme dans cette jonction un complexe de

haute affinité avec RON2, comme AMA4 et RON2_{L1} ou AMA3 et RON2_{L2}, RON2 peut également former un complexe avec AMA2 bien que l'affinité soit plus faible (M. H. Lamarque et al., 2014; Tonkin et al., 2011).

MIC2 et MIC1 possèdent des domaines thrombospondine-like qui en font des protéines d'attachement, MIC2 contient également un domaine integrin-like. La protéine SPATR possède également un domaine thrombospondine-like et est impliquée dans l'invasion mais son rôle dans l'attachement n'est pas démontré (My-Hang Huynh et al., 2014). MIC2 en complexe avec MIC2 associated protein (M2AP) connecte le moteur actino-myosine du parasite au substrat ou à la cellule hôte et permet la motilité (Chapitre III) (M.-H. Huynh, 2003; Jacot et al., 2016). MIC3 se lie à la surface de toute cellule nucléée, elle est sécrétée en surface durant l'invasion et contient 5 domaines epidermal growth factor (EGF)-like et un domaine lectine. MIC6, MIC7, MIC8 et MIC9 contiennent aussi des domaines EGF-like. MIC4 contient des motifs *apple*, et interagit avec les cellules hôtes ainsi que MIC1 (My-Hang Huynh et al., 2014; Dominique Soldati et al., 2001).

MIC1 et MIC13 contiennent un domaine nommé MAR (microneme adhesive repeat), et ce domaine leur permet de reconnaître et de se lier à l'acide sialique en surface des cellules hôtes (Friedrich et al., 2010).

Après l'invasion, les complexes d'adhésion sont transloqués vers le pôle basal puis clivés par une protéase à activité MPP1, 2 et 3 (Chapitre III) (Buguliskis et al., 2010; V. B. Carruthers, Sherman, et al., 2000; C. Opitz, 2002; Zhou et al., 2004).

6. Rhoptries

Les rhoptries sont des organites sécrétoires localisés au pôle apical. Les rhoptries sont de forme allongée dite en « battes de baseball », et sont longues de 2 à 3 micromètres. Dans la forme tachyzoïte, on en dénombre une douzaine. Les rhoptries et donc les protéines qui les composent se divisent majoritairement en deux parties, le bulbe, qui est la base de la rhoptrie, et le col qui est la partie allongée au contact de l'apex. Un troisième compartiment est constitué de protéines retrouvées à l'interface entre le col et le bulbe (Mueller et al., 2013, 2016).

1. Composition

Les protéines dites du col des rhoptries sont nommées RON, pour Rhoptry Neck. RON2, RON3 et RON11 contiennent des domaines transmembranaires. Les protéines du bulbe des rhoptries sont appelées ROP. Certaines protéines de rhoptries possèdent une tout autre nomenclature, comme la Toxofiline (présente dans le bulbe et le col), qui interagit avec l'actine, ou SUB2, une protéase. De nombreuses ROPs, comme les protéines de la famille de ROP2 possèdent des domaines kinase (ROP-kinases), on en dénombre plus de 44 (Peixoto et al., 2010).

Les rhoptries sont également constituées de lipides et notamment de cholestérol, contenus dans des membranes à l'intérieur de la rhoptrie (Hakansson et al., 2001).

D'autre part, sur la membrane des rhoptries on observe plusieurs protéines notamment ARO, impliquée dans le positionnement des rhoptries par l'interaction avec la myosine F et l'actine (Beck et al., 2013; Mueller et al., 2013, 2016), et également RASP2, qui couvre l'apex des rhoptries et est impliquée dans la sécrétion via des domaines de liaison aux lipides (Chapitre IV) (Suarez et al., 2019).

2. Biogenèse et adressage

Les rhoptries, comme les micronèmes, sont synthétisées *de novo* durant l'endodyogenèse. La transcription des gènes a lieu avant celle des micronèmes, en phase S/M (Nishi et al., 2008). De la même manière, les protéines de rhoptries sont porteuses d'un peptide signal en N-terminal qui permet l'adressage au RE et sont maturées dans un compartiment post Golgi de type endosome, appelé pré-rhoptries. Les pré-rhoptries mûrissent ensuite dans leur forme pour évoluer en rhoptries fonctionnelles, positionnées sous le conoïde, dont au moins deux γ sont insérées, notamment grâce à l'action de ARO.

Le trafic des protéines de rhoptries met en jeu SORTLR et la protéine DrpB, comme pour le trafic des protéines de micronèmes. De même, elles utilisent la voie de transport endosomale impliquant Rab5a et Rab5c, ainsi que les complexes HOPS et CORVET (Kremer et al., 2013; Morlon-Guyot et al., 2015).

ROP2 et ROP4 possèdent un domaine di-leucine et un motif de ségrégation tyrosine (YXX Φ) qui est impliqué dans leur adressage aux pré-rhoptries, reconnu par l'adaptine AP μ 1 (Hoppe et al., 2000; Ngô et al., 2003). D'autre part, AP μ 1 est impliqué dans le trafic endosomal des protéines pro-ROP en fonctionnant avec Rab5a et également dans la maturation des pré-rhoptries (Venugopal et al., 2017). La maturation de ROP1 et ROP13 par

l'aspartyl protéase ASP3 se fait au niveau post-Golgi tandis que la maturation protéolytique de certaines protéines de rhoptries, comme ROP2 par la cathepsine B toxopain-1, se fait dans les rhoptries matures (Que et al., 2002). La maturation des protéines de rhoptries n'est donc pas nécessaire pour la bonne formation d'organites matures (Dogga et al., 2017).

Les protéines de rhoptries possèdent une séquence consensus SΦXE, et sont pour certaines clivées par la subtilisine SUB2 (une protéine de rhoptries également) dans les pré-rhoptries (Miller et al., 2003; Turetzky et al., 2010).

3. Sécrétion

La sécrétion du contenu des rhoptries n'a lieu qu'au moment de l'invasion. Elle a lieu après la sécrétion du contenu des micronèmes (V. Carruthers & Sibley, 1997). Certaines protéines de micronèmes, comme MIC8 et CLAMP, sont indispensables à la sécrétion des rhoptries mais n'affectent pas la sécrétion des autres protéines de micronèmes (Kessler et al., 2008; Sidik et al., 2016), évoquant une potentielle implication des protéines de micronèmes dans l'induction d'une cascade de signalisation donnant lieu à l'exocytose du contenu des rhoptries. Les connaissances à ce jour sur la sécrétion des rhoptries seront détaillées dans le chapitre IV.

S'il est possible d'induire artificiellement la sécrétion des micronèmes grâce, par exemple, à des ionophores de Ca^{++} (V. B. Carruthers & Sibley, 1999), il n'y a, à ce jour aucun système permettant d'induire la sécrétion des rhoptries *in vitro*. De fait, la voie de signalisation et les mécanismes donnant lieu à l'exocytose du contenu des rhoptries sont, à ce jour, inconnus.

Certaines protéines de rhoptrie sont secrétées librement dans la cellule hôte, comme ROP16, d'autres comme ROP1 sont secrétées au sein d'e-vacuoles, des petites vésicules qui fusionnent ensuite avec la membrane de la vacuole parasitophore. Ces différences de sécrétion (libres ou associées à des lipides) pourraient expliquer les localisations multiples des protéines de rhoptries qui sont retrouvées aux membranes de la PV ou du parasite, mais également dans le cytoplasme de l'hôte ou au noyau, et ont des fonctions variées liées à leur localisation (Voir 6.4).

4. Fonction

Au moment de la sécrétion des rhoptries, les protéines du col des rhoptries RON2, RON4, RON5, RON8 et RON4_{L1} forment un complexe et s'insèrent dans la membrane de la

cellule hôte via RON2. RON2 se lie à AMA1 et ces protéines ensemble forment la jonction mobile, un attachement irréversible entre la membrane du parasite et la cellule hôte (Besteiro et al., 2009; Guérin, El Hajj, et al., 2017). La formation et la composition de la jonction mobile sont détaillées dans le chapitre III.

Au stade bradyzoïte, ou lorsque l'expression de AMA1 est affectée, c'est par exemple RON2 qui se lie à AMA2 ou RON2L1 qui se lie à AMA4, ou encore RON2L2 à AMA3 (au stade sporozoïte (M. H. Lamarque et al., 2014; Poukchanski et al., 2013).

RON 9 et RON10 ne sont pas impliquées dans la jonction mobile, et leur fonction à ce jour reste inconnue, bien que l'on sache qu'elles forment un complexe stable (M. H. Lamarque et al., 2012).

Les protéines du bulbe des rhoptries sont secrétées dans la cellule hôte également au moment de l'invasion, mais ne participent pas à la formation de la jonction mobile. On observe notamment ROP1 sous la forme de vésicules appelées e-vacuoles secrétées dans le cytoplasme de la cellule hôte lors d'invasion avortées ou de parasites bloqués en cytochalasine D (Hakansson et al., 2001).

Les protéines ROP sont impliquées dans la modulation des réponses de l'hôte, comme ROP16, qui grâce à son activité tyrosine kinase phosphoryle et active STAT6 et STAT3, deux facteurs de transcription, et permet de limiter la réponse cytokinique de l'hôte (Butcher et al., 2011; Ong et al., 2010) ou ROP18 qui agit sur la virulence en inhibant la voie apoptotique mitochondriale (Wu et al., 2016). De plus, il a été démontré que ROP5, ROP17 et ROP18 forment un complexe évitant le recrutement de GTPases à la vacuole et la destruction de la vacuole (Etheridge et al., 2014; Fentress et al., 2010; Steinfeldt et al., 2010). ROP38 participe à la régulation de gènes de l'hôte liés à la cascade des MAP kinases, et donc de la prolifération ou l'apoptose (Peixoto et al., 2010).

CHAPITRE III. Cycle lytique

La forme tachyzoïte de *T. gondii* réalise un cycle lytique au sein des cellules hôtes se divisant ainsi : invasion, réplication à l'intérieur de la vacuole parasitophore, sortie avec rupture de la membrane de vacuole parasitophore et de la cellule hôte, puis motilité glissante pour sortir et permettant la nouvelle invasion des cellules à proximité.

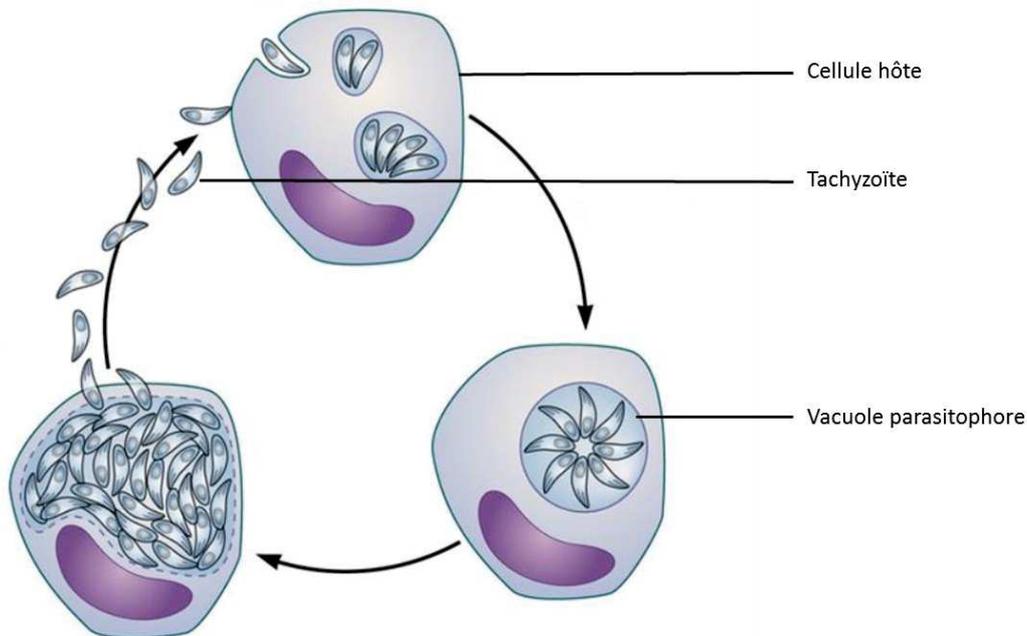


Figure 8. Représentation du cycle lytique de *T. gondii*. D'après (Zhang et al., 2013).

1. Invasion

L'invasion est un processus de 25 à 40 secondes qui se déroule en plusieurs étapes (Morisaki et al., 1995; Tardieux & Baum, 2016). Le parasite reconnaît la cellule hôte par contact des membranes, puis s'y attache réversiblement. Puis on observe une réorientation du parasite verticalement due à sa motilité qui permet lors du contact de l'apex la sécrétion des protéines de rhoptries et la formation la jonction mobile. Par un processus actif mettant en action le moteur actino-myosine, le parasite entre dans la cellule au sein d'une vacuole parasitophore initiée par l'invagination de la membrane de la cellule hôte. La jonction mobile se referme et la vacuole parasitophore se détache de la membrane de la cellule hôte.

1. Reconnaissance de la cellule hôte et attachement

SAG1, protéine de surface ancrée dans la membrane du parasite, reconnaît en surface des cellules hôtes des glycosaminoglycanes sulfatés et permet un premier attachement faible du parasite à la cellule hôte (V. B. Carruthers, Håkansson, et al., 2000; Grimwood & Smith, 1992; He et al., 2002; Mineo et al., 1993). SAG3, qui partage 24% d'identité avec SAG1, est aussi une protéine de surface et est également impliquée dans ce mécanisme d'attachement (Dzierszinski et al., 2002).

Après contact avec la membrane, les micronèmes fusionnent avec la membrane du parasite et leur contenu est sécrété en surface.

MIC2, qui contient un domaine de type thrombospondin est sécrétée avec M2AP (Jewett & Sibley, 2004) et interagit avec l'héparine (un protéoglycane de la matrice extracellulaire) et ICAM-1 (une molécule d'adhésion de la famille des immunoglobulines) (Barragan et al., 2005; Harper et al., 2004).

MIC6, qui est une protéine transmembranaire forme un complexe avec MIC1 et MIC4 et permet leur ancrage à la membrane, et donc leur interaction avec la cellule hôte (Reiss et al., 2001). MIC1 et MIC4 sont des adhésines et interagissent respectivement avec l'acide sialique (Friedrich et al., 2010) en surface des cellules hôtes et le sucre galactose (Marchant et al., 2012).

MIC3 et MIC8 sont sécrétées ensemble, MIC8 agissant comme un chaperon (Meissner, Reiss, et al., 2002) pour MIC3 qui est une adhésine soluble qui reconnaît des carbohydrates via son domaine lectine (Cerede, 2002).

D'autres protéines de micronèmes sont sans doute impliquées dans l'adhésion et sécrétées en surface, comme GAMA, qui se lie à différents types de cellules hôtes mais dont le récepteur n'est pas connu (My-Hang Huynh & Carruthers, 2016).

Après cet attachement, le clivage des adhésines en surface par des protéases de type rhomboïdes (notamment ROM4) permet le déplacement et changement d'orientation du parasite à la surface de la cellule hôte et donc le contact de l'extrémité apicale avec la cellule hôte au niveau du site d'exocytose des rhoptries (Rugarabamu et al., 2015; Shen et al., 2014).

2. Jonction mobile

On ignore à ce jour quel est le mécanisme suivant l'adhésion et la réorientation du parasite et induisant l'exocytose du contenu des rhoptries. La sécrétion est le mécanisme global d'export du contenu des rhoptries dans la cellule hôte, tandis que l'exocytose est le processus de fusion membranaire induisant l'ouverture du compartiment vers l'extérieur. L'exocytose des rhoptries reste la seconde étape cruciale de l'invasion après la reconnaissance et l'attachement à la cellule hôte.

AMA1, protéine de micronèmes, est exposée à la membrane du parasite extracellulaire une fois sécrétée. Les protéines du col des rhoptries, RON2, RON4, RON4_{L1}, RON5 et RON8 (Besteiro et al., 2009; Guérin, El Hajj, et al., 2017) sont secrétées dans la cellule hôte. RON2 est inséré dans la membrane de l'hôte et se lie de façon forte à AMA1 via sa portion C-terminale (M. Lamarque et al., 2011; Tyler & Boothroyd, 2011). RON4, RON4_{L1}, RON5 et RON8 sont exposés du côté du cytoplasme de la cellule hôte.

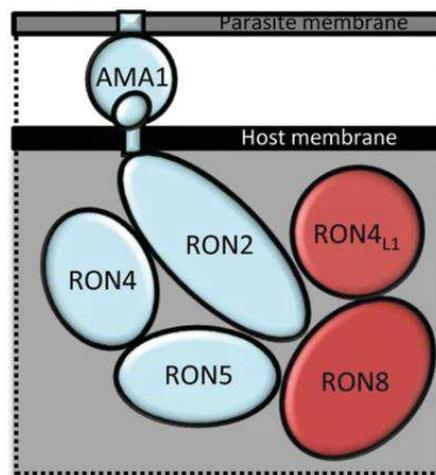


Figure 9. Schématisation de la jonction mobile. (Guérin, El Hajj, et al., 2017).

Ensemble, les RONs composant la jonction mobile permettent le recrutement de protéines de l'hôte, ALIX, TSG101, CIN85 et CD2AP, qui sont des protéines adaptatrices et qui lient les protéines de membrane au cytosquelette de l'hôte (Guérin, Corrales, et al., 2017). En revanche, en présence de cytochalasine D, les parasites restent capables de sécréter les rhoptries et d'établir une jonction mobile même si l'invasion ne peut pas s'effectuer, la jonction mobile en elle-même n'est donc pas dépendante de l'actine (Hakansson et al., 2001).

En l'absence d'AMA1, il existe des complexes AMA-RON dits alternatifs, qui permettent l'établissement d'une jonction mobile. Il s'agit des complexes AMA2-RON2, AMA4-RON2_{L1} (M. H. Lamarque et al., 2014) et AMA3-RON2_{L2} (uniquement au stade sporozoïte) (Fritz et al., 2012; Poukchanski et al., 2013).

Après sa formation au niveau apical, la jonction mobile est maintenue durant le processus d'invasion et est visible comme un anneau contractile migrant jusqu'au pôle basal. A la fin du processus d'invasion, la jonction mobile est toujours observable au point de fermeture de la vacuole parasitophore, et ce bien après le détachement de la PV de la membrane de la cellule hôte.

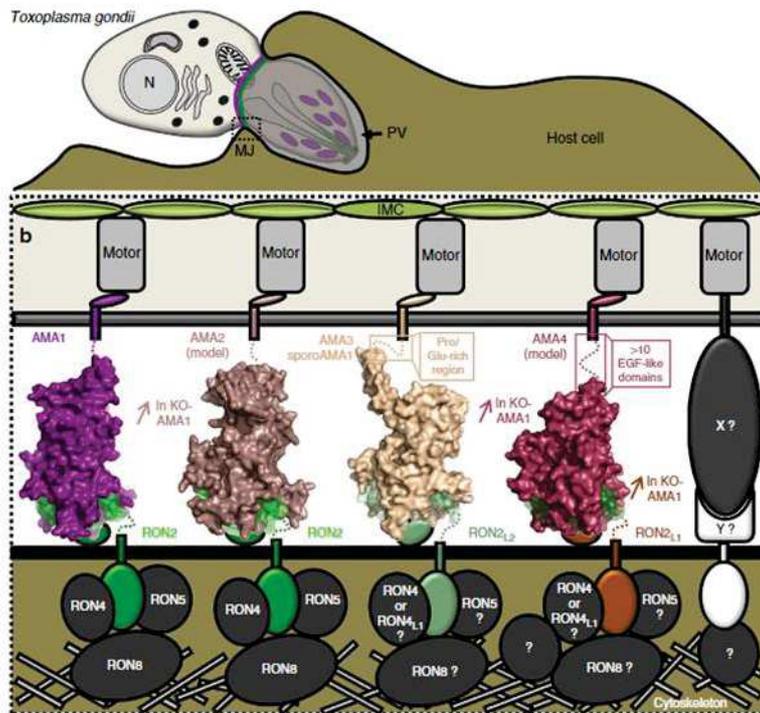


Figure 10. Représentation des différents complexes AMAs-RONs. (M. H. Lamarque et al., 2014).

3. Vacuole parasitophore

Après formation de la jonction mobile, le moteur actino-myosine du parasite permet au parasite de se tracter à l'intérieur de la cellule hôte (Dobrowolski et al., 1997; Dobrowolski & Sibley, 1996). La membrane plasmique s'invagine et forme la membrane de la vacuole parasitophore (Suss-Toby et al., 1996). La vacuole parasitophore déplétée des protéines de la cellule hôte est protégée de la fusion avec les voies d'endocytose de la cellule hôte, et donc des marqueurs lysosomaux, ce qui permet au parasite de survivre dans cette niche sans qu'elle risque d'être dégradée (Mordue et al., 1999).

La vacuole parasitophore est modifiée par la fusion des ROP secrétées sous forme d'e-vacuoles à la PVM (Chapitre II, 6.4), mais également par les GRAs, comme GRA16 et GRA2 qui participent à la formation du réseau de tubules sous membranaires (Mercier et al., 2002; Sibley et al., 1995). Le réseau de tubules sous membranaires est un ensemble de nanotubules de 60 à 90nm de diamètre qui augmentent la surface d'échange entre la cellule hôte et le parasite.

Les complexes d'adhésion entre le parasite et la membrane de la cellule hôte sont déplacés vers le pôle basal du parasite par l'action du moteur actino-myosine, puis clivés au niveau de leurs domaines transmembranaires par les rhomboïdes à activité protéase MPP1, MPP2 et MPP3 (V. B. Carruthers, Håkansson, et al., 2000; Corinna Opitz & Soldati, 2002; Rugarabamu et al., 2015; Zhou et al., 2004). Ceci constitue la fin du processus d'invasion, la dissociation entre la membrane du parasite et la PVM.

2. Réplication

La réplication des tachyzoïtes est une simple mitose, c'est-à-dire la formation de deux cellules filles issues d'une seule cellule mère. En revanche, le mécanisme de division est particulier et se nomme endodyogénie. L'endodyogénie est la formation des deux cellules filles à l'intérieur de la cellule mère, la cytodierèse étant la dernière étape, également appelée bourgeonnement des cellules filles.

On observe donc le passage de 1 tachyzoïte par vacuole parasitophore à 2, 4, 8, 16, 32 et 64 parasites, et ce à peu près toutes les 8h.

1. La réplication de l'ADN

Les gènes associés à la biosynthèse et au métabolisme sont transcrits en phase G1 ; en phase S/M (mitose) sont transcrits les gènes associés au cytosquelette, aux organites de sécrétion, et à la réplication de l'ADN ; environ 1/3 des gènes sont transcrits en 2 vagues séquentielles. Il n'y a pas de phase G2 séparant la phase S de la mitose (Radke, 2001).

2. Formation des cellules filles

La duplication du centrosome est précédée par la duplication du Golgi, qui est la première étape de la division. Elle a lieu en phase G1 (Pelletier et al., 2002).

Les protéines de l'IMC sont exprimées au moment de leur assemblage. L'IMC est donc formé *de novo*, et de façon hiérarchique, les protéines qui s'assemblent en premier permettant le recrutement des secondes. L'acylation de ces protéines permet le bon recrutement spatial des protéines de l'IMC (Beck et al., 2010).

La voie de sécrétion polarisée de *T. gondii* permet le bon positionnement des organites de sécrétion, granules denses, micronèmes et rhoptries dans chaque cellule fille. Ces organites sont formés *de novo*, et les protéines de micronèmes et de rhoptries sont d'abord sous forme de précurseurs. Les pré-rhoptries et pré-micronèmes s'associent ensuite avec l'apex des cellules filles, dans un mécanisme encore inconnu.

Le réticulum endoplasmique se divise au moment de la mitose comme le Golgi, en s'allongeant et prenant une forme de fer à cheval.

Le génome de l'apicoplaste est répliqué par des protéines d'origine bactérienne issues de l'ancêtre endosymbionte, et il s'associe avec le centrosome pour la ségrégation dans chaque cellule fille.

Le dernier organite à se diviser et pénétrer les deux cellules filles est la mitochondrie, juste avant le bourgeonnement (Nishi et al., 2008). Au pôle basal du parasite on trouve le complexe basal composé de MORN1 et de la centrine 2, qui en se contractant comme un anneau permet la fin de la division (Gubbels et al., 2008; Hu et al., 2006).

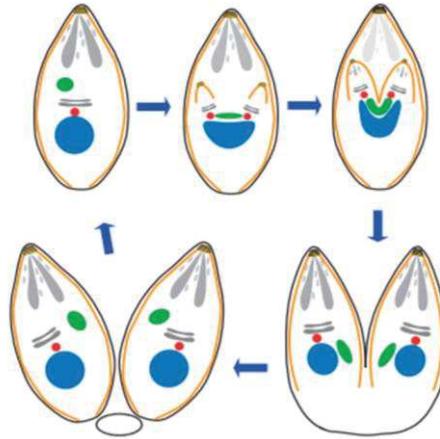


Figure 11. Représentation de l'endodyogénie. (Jacot et al., 2013)

3. Sortie

Après 5 à 6 rounds de réplication, c'est-à-dire 48h post infection, les tachyzoïtes sortent de la cellule. C'est un processus actif qui met en jeu la motilité glissante et la sécrétion des protéines de micronèmes. Au moment de la sortie, ou « egress », on observe une chute du pH à l'intérieur de la vacuole parasitophore.

Durant la phase intracellulaire, la forte concentration en ion potassium (K^+) permet l'inhibition de la sécrétion des micronèmes (Roiko et al., 2014). La réponse immunitaire des lymphocytes T CD8⁺ de l'hôte est responsable de dégâts liés aux perforines et voies Fas/Fas ligand, qui induisent une chute de la concentration en ion potassium (Moudy et al., 2001; Persson et al., 2007).

L'augmentation de la concentration de calcium dans le cytoplasme induit la sécrétion des micronèmes et la sortie de la cellule. L'augmentation de la concentration de calcium après stimulation provient de différentes sources, notamment le réticulum endoplasmique via les canaux SERCA, les acidocalcisomes et l'IMC (Luo et al., 2005; Nagamune et al., 2007). Il peut également provenir de la cellule hôte, en étant importé via des pores de la membrane de la vacuole parasitophore (Arrizabalaga et al., 2004), et s'accumulant ensuite dans le réseau tubovésiculaire. Ce lien entre concentration calcique et sortie de la cellule hôte permet la synchronisation de la sortie de parasites en culture, via l'utilisation d'ionophores de calcium.

Les messagers de la cascade de signalisation donnant lieu à la sécrétion des micronèmes ont été décrits dans le chapitre II.

La sécrétion des micronèmes permet la libération de protéases, dont notamment la perforine like protéine 1 (PLP1), et d'adhésines (Roiko & Carruthers, 2009). PLP1 s'insère et permet la formation de pores dans la membrane de la vacuole parasitophore et potentiellement de la cellule hôte, ce qui a lieu quelques minutes avant la sortie (Kafsack et al., 2009).

La capacité à sécréter les micronèmes est requise pour la sortie de la cellule, de même que la polymérisation de l'actine (Mehta & Sibley, 2011) et la motilité. Lorsque les capacités motrices sont affectées, les parasites sont dans l'incapacité de sortir de la cellule (Frénal et al., 2010, 2014; Graindorge et al., 2016; Meissner, Schlüter, et al., 2002).

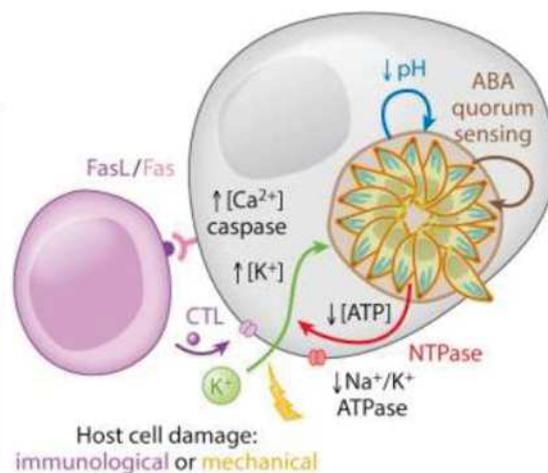


Figure 12. Cascades de signalisations donnant lieu à la sortie des parasites de la cellule hôte. (Blader et al., 2015)

4. Motilité

Les tachyzoïtes sont hautement mobiles, et effectuent dans une matrice en 3 dimensions (3D) un mouvement de type hélicoïdal, en aspect de tire-bouchon (Leung et al., 2014), avec une vitesse d'à peu près $3\mu m.s^{-1}$ (Herm-Gotz, 2002). Cette motilité des tachyzoïtes est un processus séquentiel, qui débute par la sécrétion des micronèmes.

Les protéines sécrétées s'insèrent dans la membrane plasmique du parasite et se lient à l'actine intracellulaire. Le moteur myosine qui s'ancre dans l'IMC permet la translocation des filaments d'actine vers le pôle basal, puis des protéases permettent la coupure au niveau des protéines de micronèmes. Ce système permet donc une motilité en « tapis roulant » et induit la libération des protéines de micronèmes sur le substrat.

L'ensemble des protéines impliquées dans cette motilité actine-myosine est appelé le glideosome (Frénal et al., 2010; Corinna Opitz & Soldati, 2002). Ce glideosome s'ancre entre la membrane plasmique du parasite et l'IMC (Keeley & Soldati, 2004).

1. Le glideosome

Le glideosome sert à la fois à la motilité glissante et à l'invasion. Il fonctionne grâce à l'actine intracellulaire (Dobrowolski & Sibley, 1996), et un moteur myosine (MyoA) ainsi que sa protéine associée MLC1. Les protéines ancrant le glideosome à l'IMC sont nommées glideosome associated proteins, GAP40, GAP45 et GAP50 (Figure 13).

MyoA est associé à la membrane plasmique en permanence, et son adressage dépend de la présence de deux résidus basiques en C-terminal. Elle se lie à une protéine enroulée (coiled-coil) nommée MADP, ancrée à la membrane et à une calmodulin-like myosine light chain, MLC1 (Herm-Gotz, 2002). Au pôle basal, c'est MyoC, une autre myosine, qui remplace MyoA (Frénal et al., 2014) tandis que MyoH se situe au pôle apical (Graindorge et al., 2016).

La partie C-terminale de GAP45 permet le recrutement de MLC1 et donc MyoA (Frénal et al., 2010). Deux orthologues de GAP45, GAP70 et GAP80, sont présents au niveau des pôles apical et basal respectivement et assure le rôle de recrutement au glideosome de MyoA et MyoC. Le récepteur de ce complexe MyoA-MLC1 dans l'IMC est GAP50. GAP45 et GAP50 assurent l'ancrage dans l'IMC du glideosome (Figure 13) (Frénal et al., 2010; Gaskins et al., 2004).

Le glideosome est ensuite connecté aux microtubules sous pelliculaires par des protéines associées au glideosome appelées GAPM (Bullen et al., 2009).

2. Le mouvement de motilité glissante

La sécrétion des protéines de micronèmes contenant des domaines d'adhésion permet l'attachement à la cellule hôte via des récepteurs ou sucres en surface (Chapitre III). Mic2 est sécrétée en complexe avec une protéine associée, M2AP, et fait le lien entre la membrane de la cellule hôte à laquelle elle se lie, et la membrane du parasite, en interagissant avec l'actine via GAC (Glideosome associated connector)(Jacot et al., 2016), et se connectant ainsi au glideosome, bien qu'on ait longtemps soupçonné l'aldolase d'effectuer ce rôle (Jewett & Sibley, 2003, 2004; Keeley & Soldati, 2004). GAC se lie à l'actine, est transloqué sur tout le long du parasite durant la motilité tout comme les complexes d'adhésion.

A l'extrême pôle apical du parasite on observe la présence de MyoH, qui agit en amont de MyoA ou MyoC. Après la protrusion du conoïde, MyoH permet l'initiation du moteur et la propagation de la motilité (Graindorge et al., 2016), en déplaçant les complexes d'adhésion-GAC vers le pôle postérieur, ce qui par la suite est effectué par MyoA puis MyoC à l'extrême pôle basal.

Pour permettre au parasite d'effectuer cette motilité dite « glissante », les rhomboïdes comme ROM4 clivent les complexes d'adhésion notamment MIC2/M2AP au niveau transmembranaire, pour permettre leur libération et donc le détachement du substrat (Buguliskis et al., 2010; Rugarabamu et al., 2015; Shen et al., 2014).

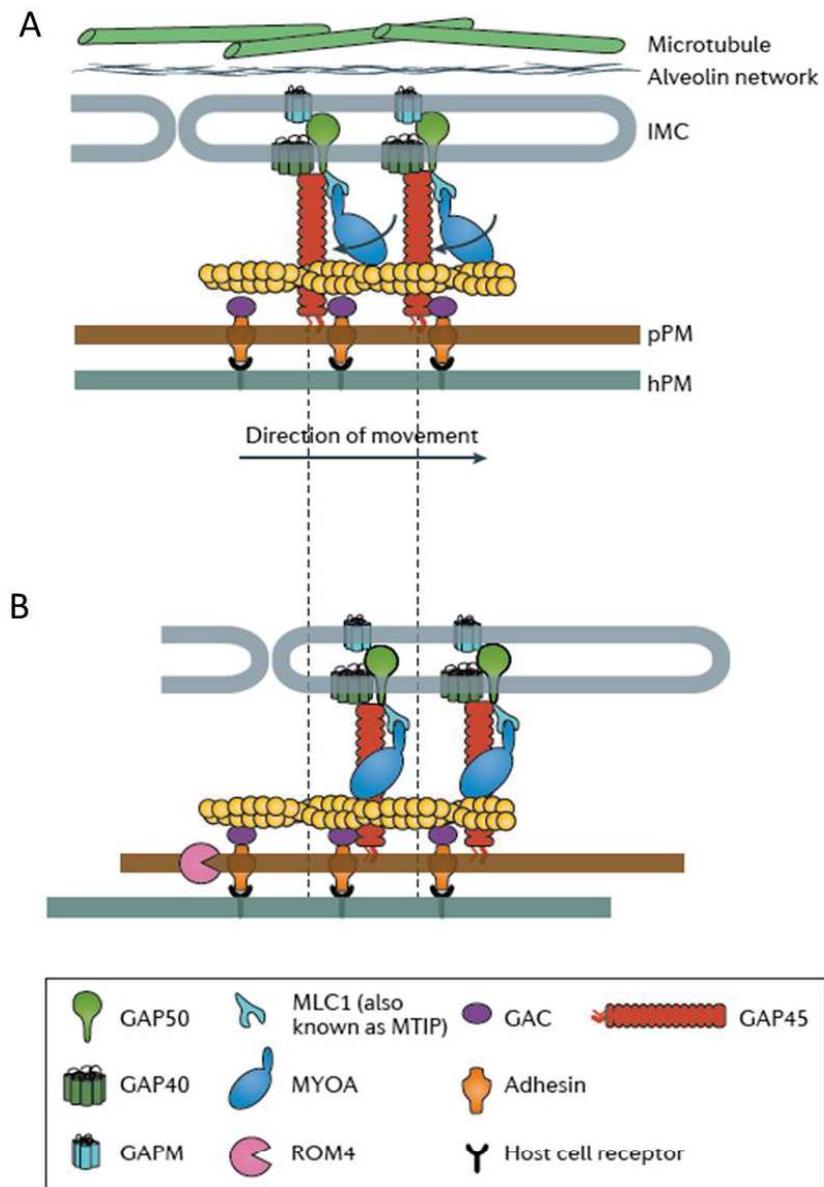


Figure 13. Le glideosome. A. Composition du glideosome **B.** changement conformationnel donnant lieu au mouvement de glissement (Frénal et al., 2017)

CHAPITRE IV. Mécanismes d'exocytose

Les travaux de ma thèse s'intéressent aux mécanismes d'exocytose chez *T. gondii*, pour comprendre les mécanismes permettant l'induction de la sécrétion des rophies, mais aussi à la conservation de ses mécanismes au sein des Apicomplexes et des Alveolés.

1. L'exocytose chez les métazoaires

Il existe deux types d'exocytose, l'exocytose régulée par une augmentation de calcium (Figure 14), et l'exocytose constitutive. L'exocytose constitutive est un moyen pour la cellule de renouveler sa membrane plasmique, et ne sera pas détaillée dans ce chapitre (Stojilkovic, 2005).

L'exocytose régulée, permet la libération de différentes molécules, dont par exemple des médiateurs de la communication cellulaire comme des hormones et neurotransmetteurs. Elle est effectuée par des cellules spécialisées appelées cellules sécrétrices. Je décrirai ce mécanisme ici dans les synapses de mammifères.

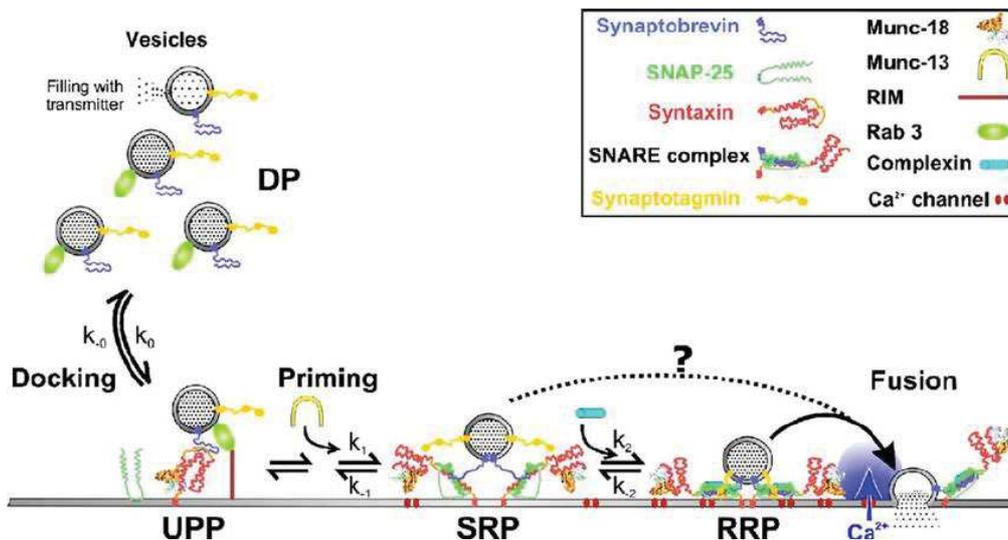


Figure 14. Molécules impliquées dans l'exocytose calcium dépendante. (Becherer & Rettig, 2006)

L'exocytose est un mécanisme comprenant différentes étapes qui suivent un influx de calcium. La première consiste en une accroche lâche entre la vésicule synaptique et la membrane, appelée docking, puis ce lien est rapproché dans un état appelé priming. Ce lien rapproché rend les vésicules synaptiques ancrées compétentes à la fusion. L'ensemble des vésicules synaptiques amorcées est appelé « Readily Releasable Pool » (RRP). Les stades d'arrimage et d'amorçage sont encore débattus en partie en raison de la disparité des techniques employées pour les étudier. La dernière étape est la fusion des membranes, puis l'ouverture d'un pore, qui permet la libération du matériel intravésiculaire. Les vésicules d'exocytose sont adressées à la membrane plasmique grâce à la présence à leur surface de

protéines GTPases comme Rab3A qui est ensuite reconnue par des protéines situées à la membrane plasmique (Darchen et al., 1995; Johannes et al., 1996; Wang et al., 1997).

1. Docking et Priming

Le complexe SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptor) est formé des protéines v-SNARE situées sur la vésicule et des protéines t-SNAREs sur la membrane cible, bien qu'on puisse retrouver les v-SNAREs et les t-SNAREs sur la même membrane (Lang et al., 2002; Tagaya et al., 1995, 1996; Yoon & Munson, 2018). Dans les synapses, les protéines v-SNARE sont la synaptobrevine (VAMP2) et les protéines t-SNAREs sont SNAP25 et la syntaxine. Les SNAREs s'assemblent en hétérotrimères et permettent de maintenir la vésicule synaptique en contact étroit avec la membrane plasmique dans une conformation favorisant la fusion ultérieure des membranes (Figure 15).

L'étape de priming est régulée par plusieurs protéines qui maintiennent le complexe sous une forme incapable d'interagir, comme Munc18 qui stabilise la syntaxine (Toonen et al., 2006; Voets et al., 2001).

L'assemblage des SNAREs peut être arrêté pendant le processus et permettre par la suite une sécrétion très rapide, par exemple par la complexine qui empêche l'association complète des SNAREs (Giraudo, 2006).

L'assemblage des SNAREs correspond à l'étape de priming ; Munc13 se lie à la syntaxine et déplace donc Munc18, ce qui permet un changement de conformation de la syntaxine et l'assemblage du complexe v/t-SNARE (Ma et al., 2011; Sassa et al., 1999). La synaptotagmine, présente au site d'exocytose, contient des domaines C2 permettant de lier le calcium ainsi que des sites de liaison aux lipides. En cas de d'influx de calcium, elle permet l'assemblage des SNARE en rompant la liaison avec la complexine (Giraudo, 2006).

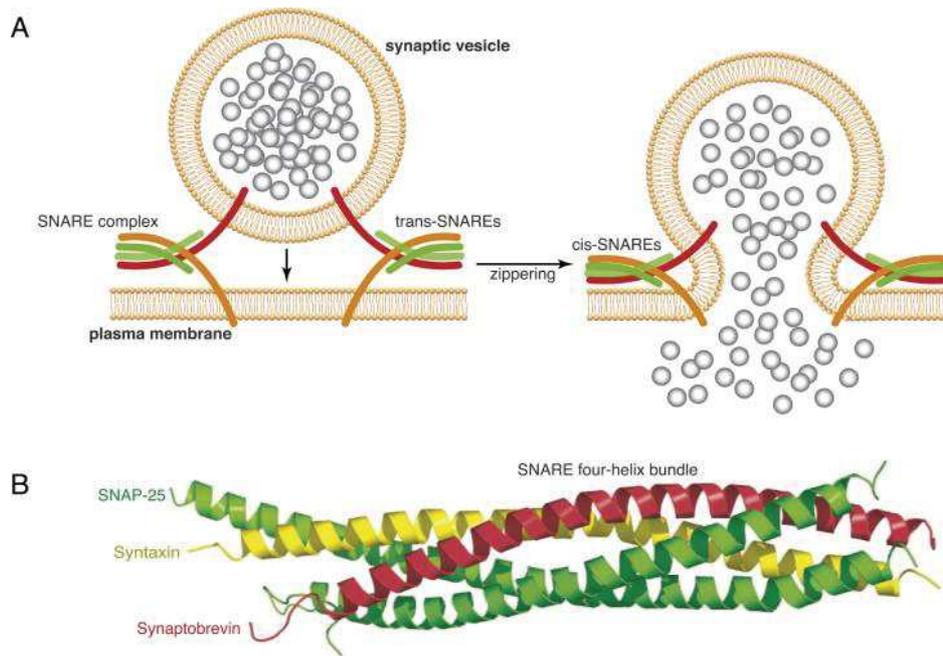


Figure 15. Assemblage des complexes SNARE et rapprochement des membranes. A. formation du complexe SNARE et rapprochement permettant la fusion membranaire B. Structure de l'hétérotrimère formé par les SNAREs (Zucker et al., 2014)

2. La fusion des membranes

Le complexe SNARE est fermé par contact des différentes hélices alpha ce qui permet d'initier la fusion membranaire (Li et al., 2007). Par la suite, les deux membranes rapprochées fusionnent, s'associent en une seule bicouche lipidique et le pore s'ouvre. Il est également admis des protéines des deux membranes s'associent, changent de conformation et forment un pore protéique (Jackson & Chapman, 2006, 2008).

Si le pore reste étroit et transitoire, et donc que la vésicule se referme après libération partielle de petites molécules, on parle de « kiss and run ». La vésicule est ensuite refermée et garde son intégrité de membrane. Un pore plus gros permet également une sécrétion partielle du contenu de la vésicule, c'est la cavapture. La fusion peut également être complète, et la vésicule disparaît dans la membrane cible et est ensuite recyclée par endocytose (Harata et al., 2006).

L'accumulation d'acide phosphatidique à la membrane qui permet de modifier la courbure du feuillet interne participe à la fusion des deux membranes au site de l'exocytose (Ammar et al., 2013; Bader & Vitale, 2009; Chasserot-Golaz et al., 2010; Humeau et al., 2001; Kooijman et al., 2005).

2. L'exocytose chez les Ciliés

Comme décrit dans le chapitre I, *T. gondii* partage la présence d'organites sécrétoires avec les autres organismes du superphylum des *Alveolates*. Parmi ceux-ci, les Ciliés ont servi d'organismes modèles pour l'étude de l'exocytose, notamment *Paramecium*.

1. *Paramecium*

Paramecium est un organisme unicellulaire de 50 à 300µm de long, recouverts de cils lui permettant de se déplacer. Les paramécies possèdent deux types de noyaux, pour *P. tetraurelia* il s'agit d'un macronoyau polyploïde qui sert à la transcription et deux micronoyaux diploïdes. *Paramecium*, comme tous les Ciliés, a la particularité d'avoir un cycle végétatif de division par mitose, et un cycle sexuel, appelé conjugaison ou autogamie. Dans le cas d'une déficience en nutriment, « starvation », la cellule entre en autogamie ou en conjugaison (Figure 16) (Van Houten, 2019). Lors de la conjugaison, chaque cellule entre en méiose et produit deux noyaux dont l'un est conservé. Puis ce noyau est divisé par mitose. Les deux nouveaux noyaux produits sont échangés de sorte que chaque cellule conserve un de ses noyaux d'origine, et le noyau échangé fusionne avec le noyau résident. Après la conjugaison les cellules entrent en multiplication végétative. Lors de l'autogamie ce sont les deux noyaux mitotiques d'une seule cellule qui fusionnent entre eux.

Ce cycle de reproduction induit des profils d'expression géniques particuliers. La quantité d'ARN est mesurée dans trois phases différentes : la croissance, puis la starvation pendant 24h, puis la conjugaison avec un autre type cellulaire pendant 18h. On observe que les gènes dont les fonctions sont similaires sont co-exprimés au cours de ce « cycle ». Pour les analyses génétiques, de nos jours est surtout étudié le Cilié *Tetrahymena thermophila* (Xiong et al., 2011).

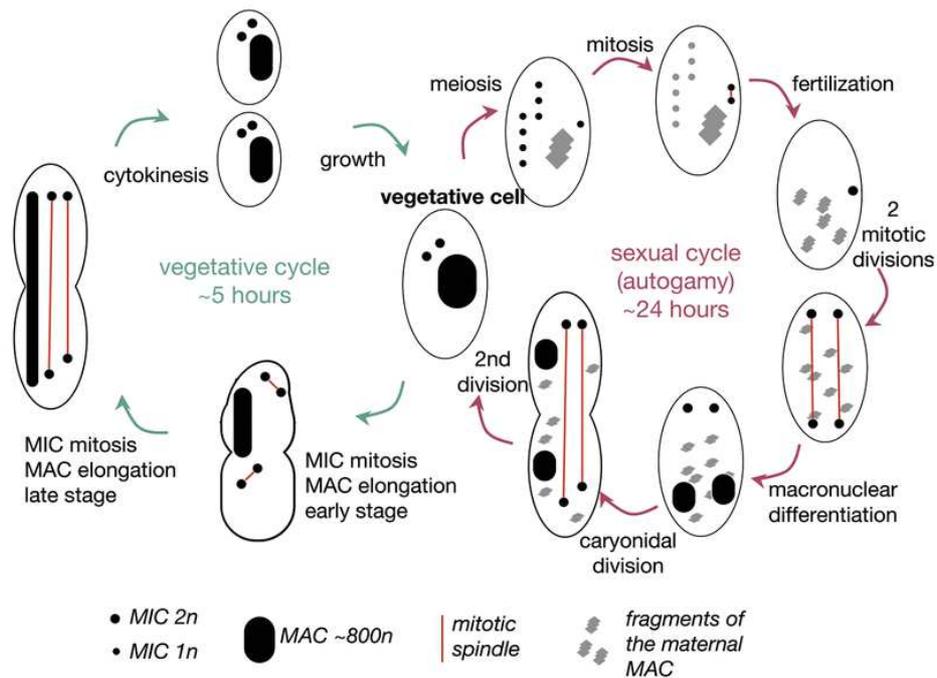


Figure 16. Cycle sexué et végétatif de *P. tetraurelia*. (Beisson et al., 2010)

Les organites sécrétoires de *Paramecium* sont appelés les trichocystes (Figure 17). Ce sont des structures en forme de batte de baseball, de 2 à 3 μm de longueur, arrangés sous la membrane, espacés régulièrement. On estime qu'il y en a 1000 par paramécie. Les trichocystes proviennent du RE et du réseau transgolgien (TGN) et forment d'abord des précurseurs appelés pré-trichocystes qui mûrissent en trichocystes. Les protéines qui composent les trichocystes subissent un clivage protéolytique durant cette étape (Helmut Plattner, 1993). Après leur biogenèse, les trichocystes matures sont transportés au niveau d'une structure membranaire appelée ring, composée de particules intramembranaires, et leur arrimage induit la formation de la rosette au centre du ring, qui est le lieu de fusion de la pointe du trichocyste lors de l'exocytose (Figure 18). Les protéines contenues dans la base du trichocyste sont appelées « matrix proteins » (TMP).

2. La sécrétion des trichocystes

L'exocytose des trichocystes est régulée par le calcium, et a lieu après stimulation dans un mécanisme de défense. Les stimuli permettant l'exocytose sont par exemple l'acide picrique, l'aminéthyl-dextrane (AED) ou le contact avec un prédateur (Helmut Plattner, 2017). Après stimulation, l'exocytose se produit en 80ms (Klauke et al., 2000; G. Knoll et al., 1991; Helmut Plattner, 2014; Helmut Plattner & Klauke, 2001).

Le rôle du calcium est encore controversé (G. Knoll et al., 1991; Matt et al., 1980; H. Plattner et al., 1980; Satir & Oberg, 1978). Il serait libéré des sacs alvéolaires (correspondant à l'IMC chez *T. gondii*) par des canaux ryanodine-sensitifs et proviendrait également du milieu extracellulaire d'où il entrerait dans la cellule via des canaux SOC (store-operated channel), non identifiés à ce jour. Le senseur de ce calcium au site d'exocytose semble être la calmoduline (Kerboeuf et al., 1993; Momayezi et al., 1986), requise pour l'assemblage fonctionnel du site d'exocytose. Les calmodulines sont connues pour lier la synaptobrevine chez les mammifères et affecter ainsi les complexes SNAREs.

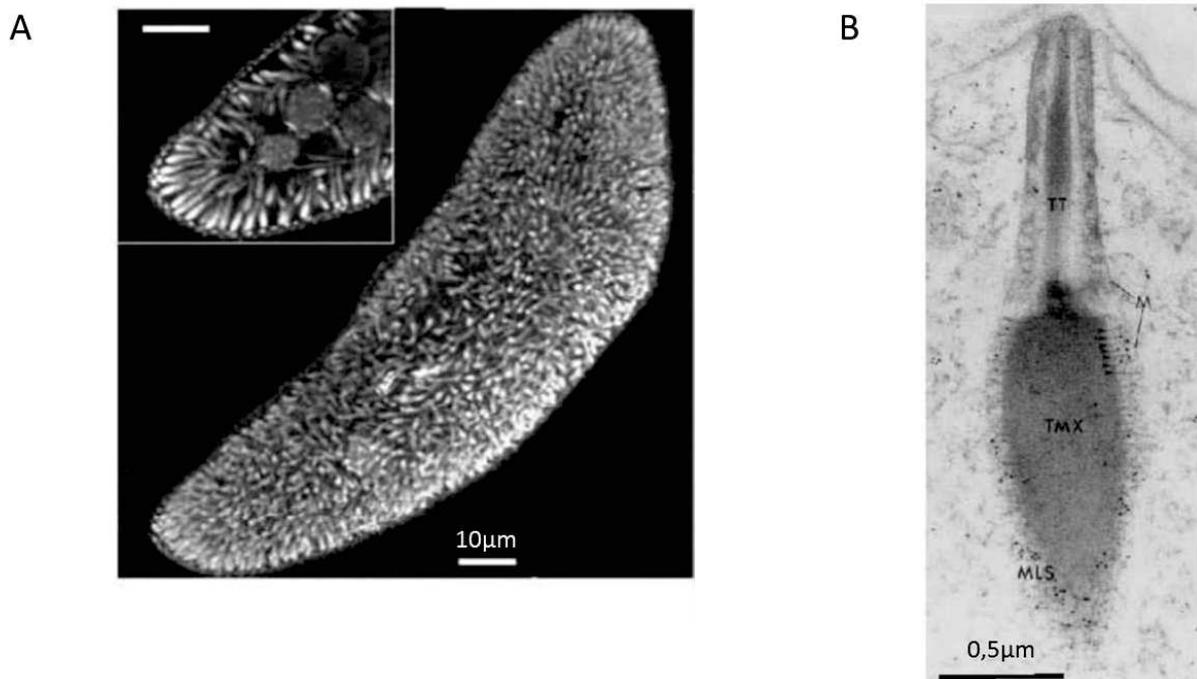


Figure 17. Aspect des trichocystes. A. Apparence des trichocystes marqués anti-TMP4 (matrice) B. Microscopie électronique d'un trichocyste TMX : matrice, M: membrane, TT : tip. Marquage des connexions entre membrane et matrice (MLS) et anticorps secondaire couplé à des billes d'or (Helmut Plattner, 2017)

Le système d'arrimage puis de fusion à l'aide des protéines SNARE semble conservé. La protéine PtSyb5 correspondrait à la synaptobrevine (v-SNARE) et PtSyx1 à la syntaxine (t-SNARE) dont le rôle dans l'exocytose a été confirmé, bien que cette dernière ne soit pas présente qu'au site d'exocytose (Kissmehl et al., 2007). NSF (NEM-sensitive factor) est un chaperon spécifique des SNARE et est impliquée dans l'assemblage du site de docking de la rosette, décrite en troisième partie de ce sous-chapitre (Marine Froissard et al., 2002).

La fusion membranaire permet l'ouverture d'un pore de 10nm (Helmut Plattner & Hentschel, 2006) qui s'élargit par la suite, il s'agit d'une exocytose de type « kiss and run ».

Après la sécrétion des trichocystes, la biogenèse s'effectue *de novo* et de manière synchronisée, on observe en effet une augmentation de la transcription des gènes correspondant aux TMP et protéines impliquées dans la biogenèse (Arnaiz et al., 2010; Haddad & Turkewitz, 1997).

3. La rosette

Des techniques de cryo-fracture ont permis de démontrer la présence d'une rosette de particules au site de docking et de fusion des trichocystes. Cette rosette est composée de 8 particules et une centrale, et mesure 60 nm de diamètre. Autour de la rosette, on observe un anneau « ring » composé également de particules transmembranaires, d'une largeur de 300 nm (Beisson et al., 1976; Matt et al., 1980; Olbricht et al., 1984; Helmut Plattner & Kissmehl, 2003).

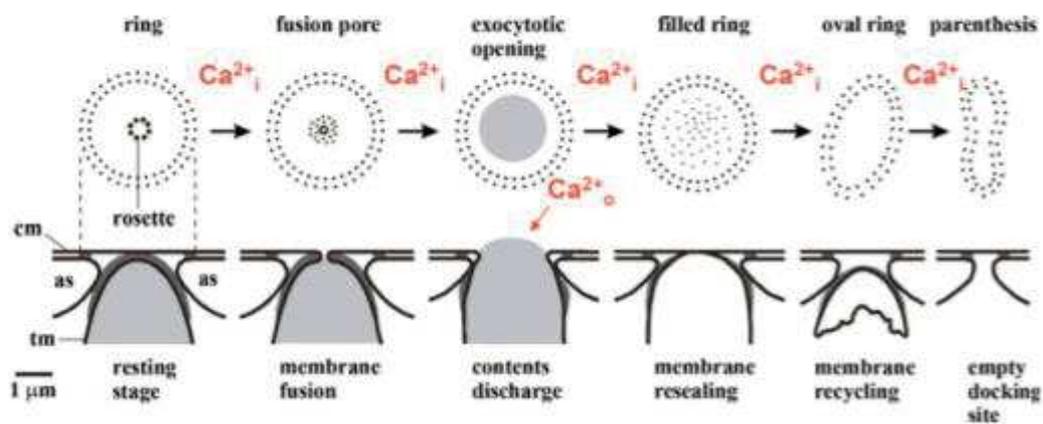


Figure 18. Etapes de fusion du trichocyste. (Helmut Plattner, 2014)

Le trichocyste est dirigé à la membrane plasmique au niveau du ring. Au moment de son docking, la rosette se forme (Figure 18). Avant induction, le trichocyste reste arrimé au niveau de la rosette. L'influx de calcium est associé à la sécrétion du contenu après ouverture du pore. Après la fermeture du pore, la membrane se reforme et l'on observe des particules intramembranaires au centre du ring. La membrane du trichocyste est ensuite recyclée et le ring adopte une forme en parenthèse (H. Plattner et al., 1980; Helmut Plattner, 2014, 2017; Helmut Plattner & Kissmehl, 2003).

Chez *Paramecium* l'étude des mécanismes de fusion a été initiée notamment par l'étude phénotypique de mutants, ces phénotypes étant par la suite attribués à des gènes, ce qui permet d'en déterminer la fonction. De nombreux mutants sont connus mais peu de gènes sont identifiés. Dans le cas de gènes impliqués dans l'exocytose, 18 gènes ont pu être identifiés ainsi, on les appelle les gènes Non-Discharge (Nd). Ces études ont permis de démontrer l'implication de la rosette dans l'exocytose. En effet, dans le cas de ces mutants qui sont incapable de sécréter leurs trichocystes, il y a une corrélation avec l'absence d'une rosette ou une rosette mal assemblée, alors que les trichocystes sont présents à la membrane.

D'autre part, entre la rosette et le cône du trichocyste, on observe la présence d'un matériel dense aux électrons, appelé connecting material (Figure 19). Ce matériel dense aux électrons manque dans les mutants Nd et apparaît normalement après docking du trichocyste à la rosette. On observe également une activité calcium ATPase au site de la rosette, qui disparaît dans le mutant Nd9 (Figure 19), ce qui a démontré l'importance du connecting material et du calcium dans l'exocytose (H. Plattner et al., 1980). Cette activité calcium ne serait pas impliquée dans la fusion membranaire lors de l'exocytose (G. Knoll et al., 1993) mais plutôt dans la décharge du contenu des trichocystes. Les phénotypes associés aux gènes *Nd* connus de la paramécie sont décrits dans le tableau 1.

Chapitre IV. Mécanisme d'exocytose

Tableau 1. Gènes Nd connus chez la paramécie et leurs phénotypes associés. (Beisson et al., 1980; Bonnemain et al., 1992; M. Froissard et al., 2001; Gogendeau et al., 2005; Kerboeuf & Cohen, 1990; Lefort-Tran et al., 1981; Nyberg, 1978; Orias et al., 1983; Sonneborn, 1974)

Gène	référence	Rosette et connecting material	Localisation	Caractéristiques
Nd9	Froissard et al., 2001	non	cytosol	ARM repeats
Nd3	Sonneborn, 1974 ; Cohen et Beisson 1980; Nyberg, 1978; Bonnemain et al., 1992	non	membrane	
Nd6	Gogendeau et al., 2005 Lefort-Tran et al., 1981	non	membrane	RCC1 like domain
Nd16	Bonnemain et al., 1992	non	cytosol	
Nd126	Nyberg et al., 1978 Bonnemain et al., 1992	non	trichocyst	
Nd169	Nyberg et al., 1978 Bonnemain et al., 1992 Froissard et al., 2004	non	trichocyst	EGF domain, plexin, integrin
Nd18	Bonnemain et al., 1992	non		
Nd203	Nyberg, 1978 Bonnemain et al., 1992	non		
Nd17	Cohen et Beisson, 1980	non		
Nd12	Cohen et Beisson, 1980 Pouphile et al., 1986 Kerboeuf et Cohen, 1990	oui		
Nd19	O. Garnier et al. Non publié			
Nd20	Orias et al., 1983			
Nd21	O. Garnier et al. Non publié			
Nd146	Nyberg, 1978			
Nd2	Froissard et al., 2004		trichocyste	EGF domain, plexin, integrin
Nd7	Froissard et al., 2005 Lefort-Tran et al., 1981	non	trichocyste	EGF domain, plexin, integrin
Nd22	Froissard et al., 2006		trichocyste	EGF domain, plexin, integrin
Nd11	Gogendeau et al., 2005			
Nd26	Gogendeau et al., 2006			
Nd28	Gogendeau et al., 2007			
Nd29	Gogendeau et al., 2008			
Nd49	Gogendeau et al., 2009			

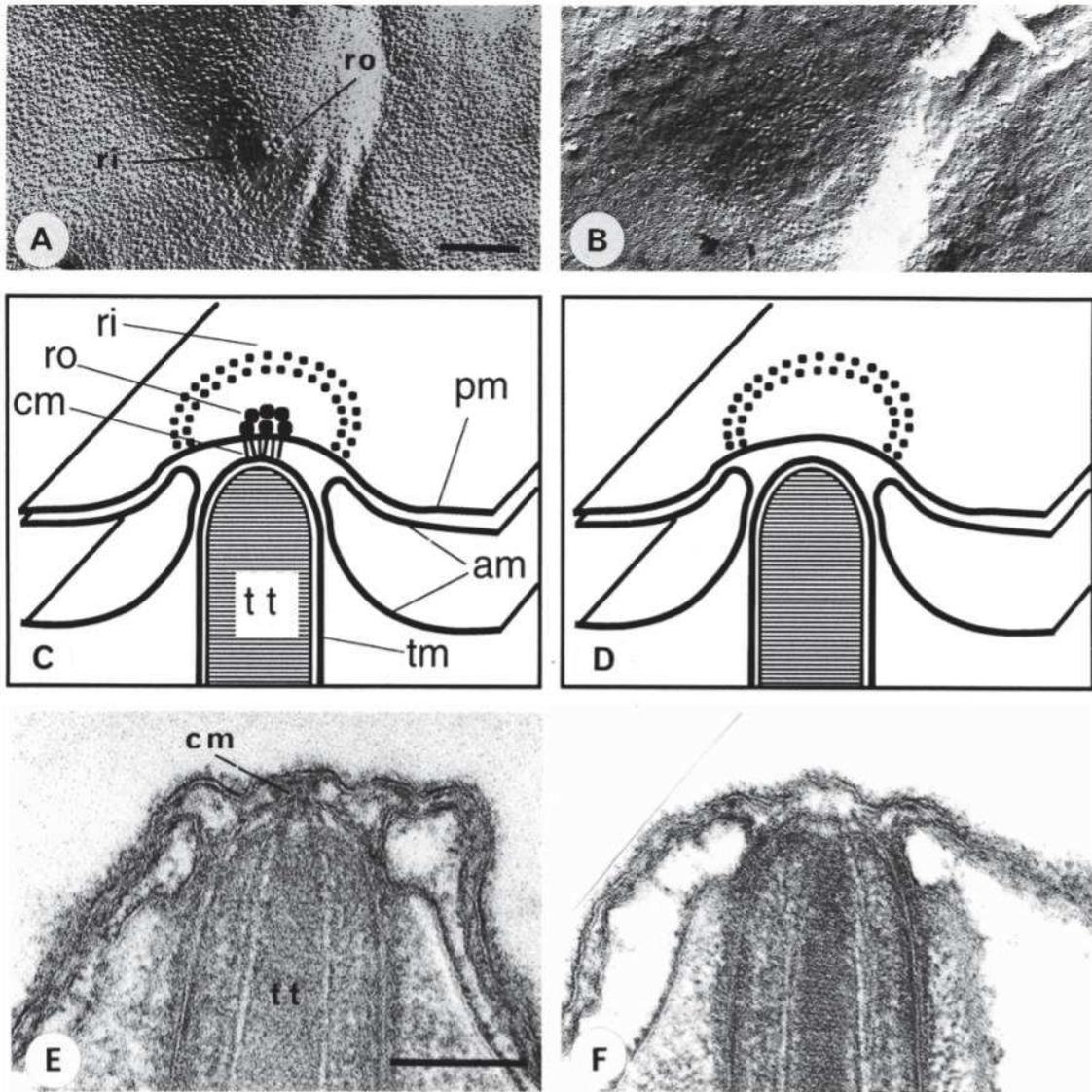


Figure 19. Comparaison du site d'un trichocyste de paramécie WT et mutant Nd9. On observe la présence du trichocyste et du ring, mais l'absence de connecting material et de rosette. TT : trichocyst tip, CM : connecting material, AM : alveoles, PM : membrane plasmique, RO : rosette, RI : ring. (Vayssié, 2000).

3. Conservation du mécanisme d'exocytose entre Ciliés et Apicomplexes

Il a été démontré il y a plusieurs décennies l'existence d'une rosette de particules intramembranaires à l'apex de plusieurs Apicomplexes comme *Plasmodium*, *Eimeria*, *Sarcocystis* ou *T. gondii* (Figure 20)(J.F. Dubremetz & Torpier, 1978; Porchet & Torpier, 1977).

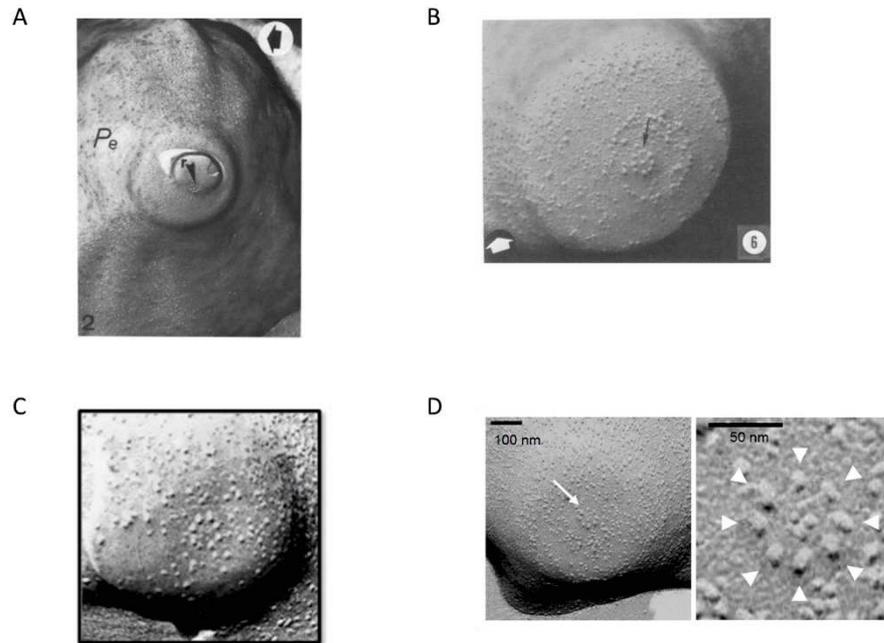


Figure 20. Observation en microscopie électronique de l'apex de plusieurs Apicomplexes et de la présence d'une rosette de particules transmembranaires. A. Apex de *Sarcocystis* (x60000) **B.** Rosette apicale d'un sporozoïte de *Eimeria* (x100 000). **C.** Apex d'un merozoïte de *Plasmodium* (Dr. J-F Dubremetz) **D.** Apex d'un tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* (Aquilini et al., 2020; J.F. Dubremetz & Torpier, 1978; Porchet & Torpier, 1977).

Par analogie entre la forme du trichocyste et celle des rhoptries, l'hypothèse que la rosette des Apicomplexes constituerait le lieu de docking et d'exocytose des rhoptries avait été proposée.

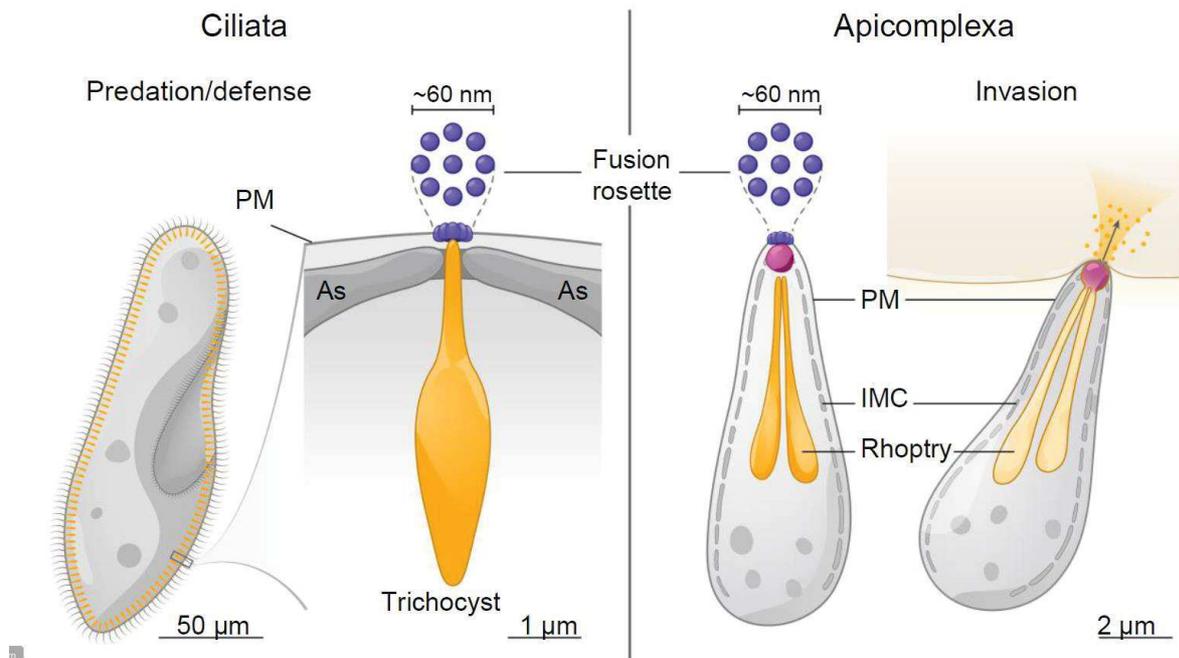


Figure 21. Analogie entre la rosette des ciliées et celle de *T. gondii*. (Aquilini et al., 2020).

A la différence des trichocystes des Ciliés, *T. gondii* exporte le contenu de ses rhoptries dans la cellule hôte. L'électrophysiologie, une technique permettant de mesurer des différences de potentiels électriques de membrane, a permis de démontrer que la membrane de la cellule hôte est percée d'un pore au début du mécanisme d'invasion, et que celui-ci est transitoire et se referme après fermeture de la vacuole parasitophore (Suss-Toby et al., 1996). Des observations de microscopie électronique (Cryo-fracture) suggèrent également la présence d'un pore de 40nm entre la membrane de la PVM et celle du parasite qui pourrait constituer le point d'exocytose du contenu des rhoptries (Figure 21) (Jean François Dubremetz, 2007; Nichols et al., 1983). De plus, il semble qu'une ou deux rhoptries seulement sont secrétées à chaque invasion, comme l'indiquent la présence d'une seule grande vésicule vide dans le tachyzoïte à l'invasion et l'espace disponible au site d'exocytose (Figure 21). D'autre part, l'absence de RON dans la vacuole parasitophore permet d'affirmer qu'il n'y a pas exocytose « secondaire » de rhoptries après formation de la jonction mobile (Jean François Dubremetz, 2007).

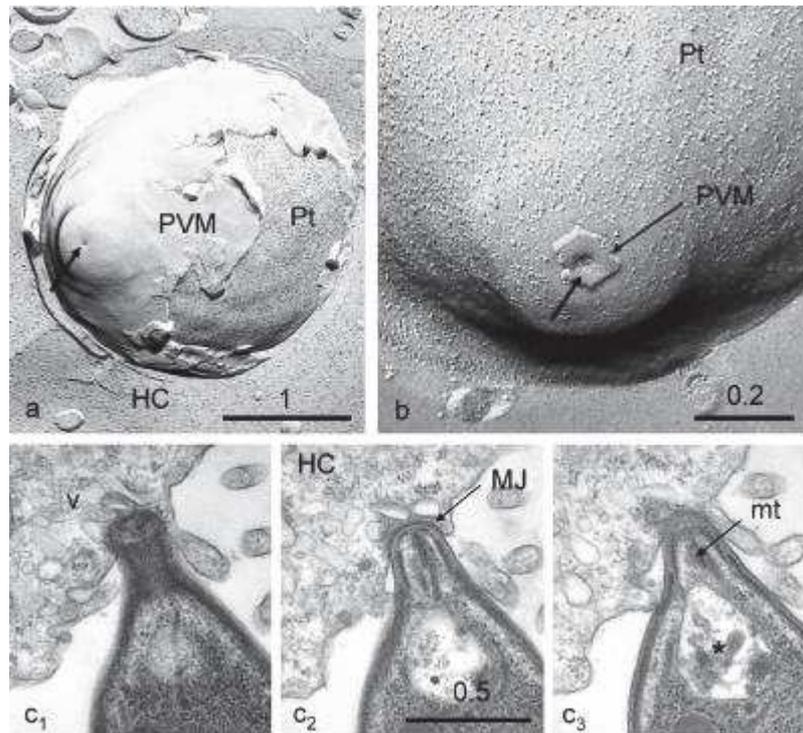


Figure 22. Images de microscopie électronique et par cryofracture de la sécrétion des rhoptries d'un tachyzoïte. On observe la rhoptrie vidée de son contenu* (Jean François Dubremetz, 2007).

Notre laboratoire a démontré que des protéines impliquées dans l'exocytose des trichocystes étaient conservées au sein des *Apicomplexes*, comme Nd9 et Nd6. Nd9 et Nd6 qui sont indispensables à la sécrétion des rhoptries chez *T. gondii*, ainsi qu'à la formation de la rosette pour Nd9, mais ne sont pas liées à la sécrétion des micronèmes. Chez *P. falciparum*, Nd9 est également indispensable à l'invasion et la sécrétion des rhoptries, son absence n'affectant pas la sécrétion des micronèmes. Le mécanisme d'exocytose des rhoptries semble donc être conservé au sein des *Alveolés* (Aquilini et al., 2020). Chez *T. gondii*, Nd9 et Nd6 sont localisées dans le cytoplasme, sous forme de puncta, et Nd6 présente en plus une accumulation en un point apical.

Des expériences d'immunoprécipitation réalisées avec des tachyzoïtes possédant une version taguée de Nd9, ont permis d'identifier de nouvelles protéines inconnues impliquées dans la sécrétion des rhoptries comme NdP1 et NdP2. NdP1 possède un domaine Armadillo comme Nd9, et NdP2 contient un domaine C2 de liaison calcium. NdP1 et NdP2 sont également des protéines cytoplasmiques (NdP2 montre également comme Nd6 une accumulation apicale) impliquées dans la sécrétion des rhoptries et la rosette est absente chez les mutants. Il est important de noter que cette étude a également permis de montrer que NdP1 et NdP2, inconnues jusqu'alors chez les Ciliées, étaient impliquées dans

l'exocytose des mucocystes de *Tetrahymena* (similaires aux trichocystes de *Paramecium*)(Aquilini et al., 2020). L'identification de ces deux nouvelles protéines a permis de caractériser un complexe formé par Nd9, Nd6, NdP1 et NdP2, mais également une interaction de celles-ci avec la Ferlin 2 et avec une protéine de type GTPase. Nd6 possédant des domaines de type Guanine Exchange Factor (GEF), ceci lie les éléments du complexe dans un ensemble fonctionnel permettant aux auteurs de proposer un modèle pour le rôle des Nds.

Etant cytoplasmiques, les Nd ne sont donc pas les constituants de la rosette mais agissent vraisemblablement en complexe pour son assemblage et sont ainsi essentielles à l'exocytose des rhoptries. Deux types de solutions sont proposées par Aquilini, Cova et al., les protéines Nd étant soit des acteurs majeurs du processus de fusion, agissant en complexe formé par Nd9/Nd6/NdP1/NdP2/Ferlin2/GTPase et régulant l'exocytose des rhoptries, soit des éléments impliqués dans la régulation en amont et l'assemblage de la rosette et de la machinerie de sécrétion, auquel cas Nd9 et NdP1 interagiraient transitoirement avec NdP2 et Nd6 localisées au niveau de la vésicule apicale pour assembler la rosette. Les deux modèles ne sont pas exclusifs et il est possible que certains acteurs du complexe participent à la fusion tout en permettant avec les Nds globalement d'assembler la rosette et la machinerie de fusion.

Contrairement à *Paramecium*, les rhoptries de *T. gondii* ne sont pas directement arrimées à la membrane plasmique mais à une vésicule apicale qui est elle-même connectée à la membrane plasmique en étroite connexion avec la rosette (Aquilini et al., 2020). Elle semble être partie intégrante du mécanisme d'exocytose des rhoptries de part son lien entre les deux membranes.

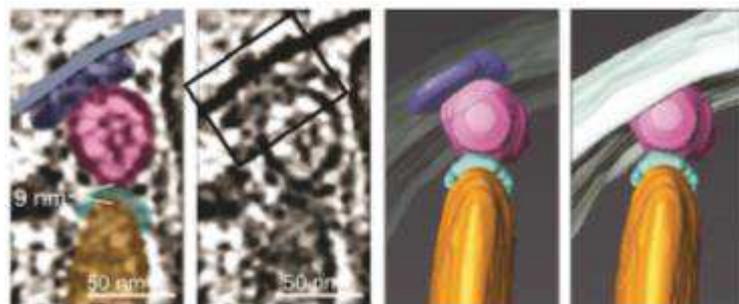


Figure 20. Image de tomographie magnifiée et reconstruction 3D montrant la connection entre la rhoptrie, l'extrémité de la rhoptrie, la vésicule apicale et la rosette. Rhoptrie : orange, tip de la rhoptrie : vert, vésicule apicale : rose, rosette : bleu. (Aquilini et al., 2020).

Il est possible d'imaginer que, comme dans le modèle proposé par Aquilini, Cova et al., contrairement aux trichocystes, les rhoptries ne fusionnent pas directement avec la membrane lors de l'exocytose, mais que cette vésicule soit un intermédiaire. Il est d'ailleurs important de noter, que dans le cadre de l'absence de rhoptrie au pôle apical, comme dans le mutant ARO, où les rhoptries ne sont pas positionnées à la membrane, la rosette ainsi que la vésicule apicale sont toujours présentes. Ceci suggère que contrairement aux trichocystes, la machinerie d'exocytose ne requiert pas le positionnement de la rhoptrie à la membrane plasmique mais que c'est la rosette et la vésicule apicale qui sont au centre de cette machinerie.

Aucune SNARE eucaryote n'a à ce jour été associée à la sécrétion des rhoptries chez *T. gondii*. Elles sont en revanche associées au trafic vésiculaire entre le RE, le golgi et le compartiment de type endosomal, et par cela au trafic de protéine jusqu'aux organites comme les rhoptries, les micronèmes et l'apicoplaste (Bisio et al., 2020). Comme décrit dans le chapitre II, RASP2, une protéine recouvrant le col des rhoptries possède la capacité de lier les lipides comme le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2, précurseur du DAG et de l'IP3) et le PA. Le modèle suggéré est que RASP2 lierait les phospholipides membranaires et permettrait donc le rapprochement entre la rhoptrie et la membrane plasmique. Or depuis la mise en évidence du docking des rhoptries avec la vésicule apicale et de celle-ci avec la membrane, nous pensons que RASP2 pourrait plutôt permettre l'initiation du docking des rhoptries avec la vésicule avant une fusion médiée par des v/t-SNARE non identifiées à ce jour (Suarez et al., 2019).

Les derniers travaux réalisés en ce sens, comme la découverte de RASP2 (chapitre IV), ou du complexe de Nds et de la Ferline 2 (Aquilini et al., 2020; Coleman et al., 2018) ont permis de démontrer l'existence d'effecteurs impliqués uniquement dans la sécrétion des rhoptries et non dans celle des micronèmes, sans être des membres de la jonction mobile. En revanche, ces mêmes travaux soulèvent un point important : ces deux protéines impliquées dans l'exocytose des rhoptries ne possèdent pas d'homologues dans les organismes modèles connus comme la levure, la drosophile ou les mammifères. Il convient donc d'imaginer de nouvelles manières d'identifier les effecteurs de l'exocytose que la recherche par homologie classique à partir des systèmes modèles, humain ou levure.

Depuis plusieurs décennies, il était connu que *T. gondii* et d'autres Apicomplexes possédaient une rosette de particules transmembranaires comme les Ciliés. Il n'était pas en revanche démontré que cette rosette puisse être impliquée dans la sécrétion comme elle l'est pour *Paramecium* ou *Tetrahymena*, comme cela a été donc fait récemment.

Nous avons donc émis l'hypothèse, qu'en plus de partager la présence d'organites sécrétoires, les ciliés partagent également des mécanismes d'exocytose communs.

MÉTHODES

Culture des parasites et des cellules

Les tachyzoïtes sont maintenus en culture sur des cellules de type HFF (ATCC- SRSC 1041) cultivées en milieu de culture Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco BRL). Le milieu de culture est supplémenté avec 5% de sérum de veau foetal (SVF), 2mM de glutamine et 100µg/ml pénicilline/streptomycine (Gibco). Les cultures sont placées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

Clonages et constructions

Les amplifications PCR d'ADN donneur ont été réalisées avec la polymérase KOD (Merck-Millipore) et les criblages des clones avec la polymérase GoTaq (Promega). Les amorces utilisées dans ce travail sont listées dans la table 3. Les ARNg ont été définis avec l'outil CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Les ADN synthétiques ont été générés par la société IDT Biolabs.

Création des souches exprimant Nd11 HA3 et Nd12 HA3 (Figure 29)

L'ADN donneur a été amplifié à partir du plasmide pLIC- CAT-HA3 (My-Hang Huynh & Carruthers, 2009) avec les amorces ML3287/ML3288 pour Nd11 ou ML3277/ML3278 pour Nd12. Les amorces ML3283/ML3284 et ML3279/ML3280 ont été hybridées puis clonées dans le plasmide pU6-Cas9-YFP (Striepen lab) ouvert par l'enzyme *Bsa*I pour obtenir les ARNg permettant une coupure au début du 3'UTR de *Nd11* et *Nd12* respectivement. L'insertion des oligonucléotides dans les plasmides pU6-Cas9-YFP-Nd11 et pU6-Cas9-YFP-Nd12 a été vérifiée par séquençage.

Création des souches KD-Nd11 et KD-Nd12 exprimant Nd11 et Nd12 sous contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotétracycline (Figure 33)

L'ADN donneur a été amplifié à partir du plasmide DHFR-TetO7Sag4 (Sheiner et al., 2011) avec les amorces ML3317/ML3318 pour le gène *Nd11* et ML3315/ML3316 pour le gène *Nd12*. Les amorces ML3342/ML3343 et ML3338/ML3339 ont été hybridées puis clonées dans le plasmide pU6-Cas9-YFP pour permettre une coupure juste en amont du codon START de *Nd11* et *Nd12* respectivement. L'insertion des oligonucléotides dans les plasmides pU6-Cas9-YFP-Nd11kd et pU6-Cas9-YFP-Nd12kd a été vérifiée par séquençage.

Création de la souche TY3 Nd12 HA3 exprimant Nd12 taguée TY en N-terminal et HA3 en C-terminal (Figure 30)

Un fragment d'ADN a été synthétisé contenant la région d'homologie 1 dans le 5'UTR du gène *Nd12*, puis la séquence du tag triple TY précédée par un codon START, suivie de 45pb recodonnées correspondant à la zone de coupure de l'ARNg dans la séquence endogène et enfin la région d'homologie 2 correspondant à 155pb de l'exon1. Ce fragment d'ADN a été cloné dans un vecteur Zero Blunt™ TOPO™ (Thermofisher). L'ADN donneur a ensuite été amplifié avec les amorces ML3723/ML3724. Les amorces ML3719/ML3720 ont permis de cloner l'ARNg dans le plasmide pU6-Cas9-YFP-Nd12tagNt qui a été vérifié par séquençage.

Création de la souche TM-TY3-Nd12 HA3 exprimant Nd12 taguée TY après le domaine transmembranaire et HA3 en C-terminal, et Ty3-Nd12 Nd11 HA3 (Figure 30)

Un fragment d'ADN synthétique de 120pb de l'exon 1 comprenant le domaine transmembranaire (HR1) suivi d'un tag triple TY 18pb après la séquence correspondant au TM suivi d'une portion recodonnée de 42pb et de la région d'homologie 2 de 223pb a été cloné dans un vecteur TOPO. L'ADN donneur a ensuite été amplifié avec les amorces ML3744/ML3387. Les amorces ML3742/ML3743 ont permis de cloner l'ARNg dans le plasmide pU6-Cas9-YFP-Nd12tagTM qui a été vérifié par séquençage.

Création des souches Nd12Cterm recodWT et Nd12Cterm recodPA exprimant une version recodonnée de Nd12 (Figure 44)

Un fragment d'ADN synthétique contenant une première région d'homologie de 193pb dans l'exon 10 suivie d'une portion recodonnée WT ou S>A de 459pb, d'un tag HA3, d'une portion de 3'UTR de SAG1 (329pb) et de la région d'homologie 2 dans l'UTR de Nd12 (181pb) a été synthétisé puis cloné dans un vecteur TOPO. L'ADN donneur a ensuite été amplifié avec les amorces ML3725/ML4168. Les amorces ML3811 et ML3812 ont permis de cloner l'ARNg dans le plasmide pU6-Cas9-YFP-Nd12Cter.

Création des souches KD-Nd11-SeCreEt et KD-Nd12-SeCreEt possédant le système SeCreEt au locus *UPRT* dans les souches KD-Nd11 et KD-Nd12 (Figure 40)

L'ADN donneur a été amplifié à partir du plasmide toxofilin-Cre (Anita Koshy's lab) (Koshy et al., 2010) avec les amorces ML3522/ML3523. Les amorces ML3445/ML3446 et ML2087/ML2088 ont permis de cloner les ARNg permettant la coupure par la Cas9 en 5' et en 3' du locus *UPRT* dans les plasmides pU6-Cas9-YFP-UPRT3' et pU6-Cas9-YFP-UPRT5' vérifiés par séquençage.

Création des souches Compl-SeCreEt et S1409A-SeCreEt possédant le système SeCreEt au locus *UPRT* dans les souches Δ TgPL3-complémentée et Δ TgPL3-S109A (Figure)

L'ADN donneur a été amplifié à partir du plasmide toxofilin-Cre (Anita Koshy's lab) (Koshy et al., 2010) avec les amorces ML3522/ML3523. Les amorces ML3445/ML3446 et ML2087/ML2088 ont permis de cloner les ARNg permettant la coupure par la Cas9 en 5' et en 3' du locus *UPRT* dans les plasmides pU6-Cas9-YFP-UPRT3' et pU6-Cas9-YFP-UPRT5' vérifiés par séquençage.

Tableau des amorces

Tableau 3. Table des amorces

Table des amorces		
NOM	SEQUENCE	FONCTION
ML3277	ACAATTGAAGAAGCCCGGGTCTCCGAAACAGGAgTACCCGTACGACGTCC	tag HA en Cterm de Nd12
ML3278	ACATTTCCGCGGGTCTTTTTATTCTCGGTCTAGAAGTGTGGATCCCC	tag HA en Cterm de Nd12
ML3279	aagttCCATGTGAAGGCCGATCAGGAg	ARNg pour le tag HA en Cterm de Nd12
ML3280	aaaacTCCTGATCGGCCTTCATGGa	ARNg pour le tag HA en Cterm de Nd12
ML3287	AGGGAACACTACGAGCGGCTCCCGACGACGGTCTgTACCCGTACGACGTCC	tag HA en Cterm de Nd11
ML3288	TGCTTGA AAAAAGCGCTATTCTTTGTTGTGTCTAGAAGTGTGGATCCCC	tag HA en Cterm de Nd11
ML3283	aagttGTGAAGACGCTGTCTTTGCACg	ARNg pour le tag HA en Cterm de Nd11
ML3284	aaaacGTGCAAGACAGCGTCTTCACa	ARNg pour le tag HA en Cterm de Nd11
ML3346	GACGTGAAGAATCTGGATCGGA	Intégration tag HA en Cterm de Nd12
ML3347	CCTGCTCACGTTAGCGATAGT	Intégration tag HA en Cterm de Nd12
ML3348	GACTGCTGTAAGTCGAA	Intégration tag HA en Cterm de Nd11
ML3349	CTCCTATCGTACAAGCTGTGAAC	Intégration tag HA en Cterm de Nd11
ML3315	CCCCGCGACACCAGTCCAGGGCAAGCGACGAAGCTTCGCCAGGCTGTA	Changement de promoteur Nd12
ML3316	GTTGTTGCGATCCGACGCCAGAGAATCATAGATCTGGTTGAAGACAGAC	Changement de promoteur Nd12
ML3317	TCTGCAGCCGCTGTGGACGCTTGTCTGGACTCAAGCTTCGCCAGGCTGTA	Changement de promoteur Nd11
ML3318	AACGCGGAGATGTTCCGTTGCGCTCTGCATAGATCTGGTTGAAGACAGAC	Changement de promoteur Nd11
ML3338	aagttGAAACAGGGAGAGTGGGCACg	ARNg pour changement de promoteur Nd12
ML3339	aaaacGTGCCACTCTCCTGTTTCa	ARNg pour changement de promoteur Nd12
ML3342	aagttGCTTTCGACTCGAGCAAGCGGg	ARNg pour changement de promoteur Nd11
ML3343	aaaacCCGCTTGCTGCTGAGTCAAGCa	ARNg pour changement de promoteur Nd11
ML3386	GCCAATGCGACATAATCCACACA	intégration Changement de promoteur Nd12
ML3387	TCGATCGACTTCGCGTCTCA	intégration Changement de promoteur Nd12
ML3388	TACAGACGCCACTGCTTC	intégration Changement de promoteur Nd11
ML3389	CGAAGACACTTCGACTGCAAGTGTCT	intégration Changement de promoteur Nd11
ML3719	AAGTTGAACAACTCCAGCAGCGCAGg	ARNg pour ajout du tag en Nterm de Nd12
ML3720	AAAACCTGCGCTGCTGGAGTTGTTCa	ARNg pour ajout du tag en Nterm de Nd12
ML3811	AAGTTGCGGCACAACAAAAGGGCa	ARNg pour modifications Cterm Nd12(phosphorylations)
ML3812	AAAACCTGCCCTTTGTTGTGCCGCa	ARNg pour modifications Cterm Nd12(phosphorylations)
ML3723	AGCGCCGAACAGACAGACAT	Amplification ADN donneur tag Nterm Nd12
ML3724	GGACAAGAAAGAACGCCACCA	Amplification ADN donneur tag Nterm Nd12
ML3725	TCACACATGGGGACGAGT	Amplification ADN donneur modifications Cterm Nd12
ML4168	CAGAGGGTCCGTTCTCCAT	Amplification ADN donneur modifications Cterm Nd12
ML3727	ATCACTGGCCAAGGAGGAC	Intégration tag Nterm Nd12
ML3728	AGCTCAACGTAGGAGAAATCGG	Intégration modifications Cterm Nd12
ML3729	CTTGATTGGTATGCACTTCG	Rev dans TY tag
ML3742	AAGTTGATCTGCTGTCGCGACCGCGg	ARNg pour ajout du tag en apres le TM de Nd12
ML3743	AAAACCGCGGTCGGCACGAGCAGATCa	ARNg pour ajout du tag en apres le TM de Nd12
ML3744	GGGAAGGGCTACGAAAGT	Amplification ADN donneur tag TM Nd12
ML3387	TCGATCGACTTCGCGTCTCA	Amplification ADN donneur tag TM Nd12
ML3745	TACCACTGCCGAGGAA	Intégration tag TM Nd12
ML1476	CAGCGTAGTCCGGGACGTCTGAC	Rev dans HA
ML2456	ACGCGTCGACGATACT	For dans promoteur sag4
ML388	ACAGTACTGCGATGAGTGGC	FOR dans CAT
ML687	GTTTGAATGCAAGGTTTCGTGTCTCG	REV dans DHFR
ML3522	TTGGTACGCGCTCCACAAGCGTATTCTCAAAGCACGGAGAGAGACG	Insertion du SeCreEt system dans le locus UPRT
ML3523	CTTGTCGCGCACCAGGCGCTCACAATATAGGCACCCAGGCTTTACA	Insertion du SeCreEt system dans le locus UPRT
ML3445	AAGTTGACAGGGCTTCTAAAATGGCGG	ARNg pour inserer au locus UPRT 1
ML3446	AAAACGCGCATTCTTGAAGCCCTGCA	ARNg pour inserer au locus UPRT 1
ML2087	AAGTTGGTCTCCACGTCCCTCACCATG	ARNg pour inserer au locus UPRT 2
ML2088	AAAACATGGTGAAGGACGTGGAGCCA	ARNg pour inserer au locus UPRT 2
ML3547	GTATCAGTTGTGCGCGGAAG	Intégration du SeCreEt system
ML3190	TCCCGTTACAGTTTACGGG	Intégration du SeCreEt system
ML3546	GAGGGCTAGCAAAGCGTC	Intégration du SeCreEt system
ML3187	CTCGGCTCCATCTCATTCC	Intégration du SeCreEt system
ML3635	GAGTCCACACGAACCA	FOR dans TY Tag

Transfections

La souche de base utilisée dans ce travail est la souche RH de type 1 déficiente pour le gène *ku80* ($\Delta ku80$) et exprimant le transactivateur TATi (TATi- $\Delta ku80$), considérée comme souche WT (My-Hang Huynh & Carruthers, 2009).

Les transfections ont été réalisées avec 20×10^6 tachyzoïtes extracellulaires préalablement lavés avec 2mL de Cytomix (Sidik et al., 2014) et couplés à 20 μ g de plasmide pU6-Cas9-YFP contenant l'ARNg et 2x50 μ L de réaction PCR de l'ADN donneur (précipités puis resuspendus dans 20 μ L d'H₂O), 8 μ L d'ATP (Sigma), 8 μ L de CaCl₂, 8 μ L de glutathion (Sigma) et 380 μ L de Cytomix. Les parasites ont été électroporés dans un système BioRad avec les paramètres : 50 Ω , 25 μ F, 2,02 kV comme décrit précédemment (Suarez et al., 2019).

Les parasites ont ensuite été sélectionnés avec du chloramphénicol (sélection CAT) ajouté à J0, ou de la pyriméthamine (sélection DHFR) ajoutée à J1, ou FUDR (perte de l'UPRT) ajouté à J1 ou triés par FACS après 48h.

L'obtention des clones s'est faite par la technique des dilutions limites ou après triage FACS en plaque 96puits.

Immunofluorescence

Les cellules sur lamelles de verre infectées ont été fixées en para formaldéhyde à 4% dilué dans du tampon phosphate (PBS) pendant 20 min, puis lavées en PBS 3 fois, et perméabilisées avec du triton 0,15% pendant 10min. Le blocage a été effectué durant 1h avec du PBS-SVF 10%.

Les anticorps primaires et secondaires ont été dilués dans du PBS-SVF 2% et incubés pendant 1h. La coloration Hoechst a été incubée 5min en PBS.

Les lamelles ont été montées en milieu de montage Immu-mount (Thermoscientific).

Les images ont été acquises sur un microscope Zeiss Axioimager Z1 et une caméra Zeiss AxioCam MRm CCD à l'objectif à immersion 100X/1.4.

Western-blot

Les échantillons ont été préparés dans du tampon Laemmli avec DTT (Tris pH6.8 0,0625M, SDS 2%, Glycérol 10%, Bleu de bromophénol 0,002% DTT 10%) et chargés sur gel de polyacrylamide SDS-Page à 10% (Sécrétion des micronèmes) ou Gel Tris-acétate 3-8% NuPAGE (Thermofisher). Le marqueur de taille utilisé est le Page Ruler (Thermofisher) ou Spectra multicolor high range (Thermofisher). Les gels ont été transférés sur membrane de PVDF (PolyVinylidene Fluoride) compte tenu de la grande masse moléculaire de Nd11 et Nd12. Le blocage et les incubations d'anticorps ont été faits en tampon Tris-NaCl-Tween-5% lait durant 1h. La révélation a été faite suivant les anticorps secondaires avec le substrat BCIP/NBT (Promega) ou avec ECL Clarity max (Biorad) et imagées sur un Biorad ChemiDoc à la plateforme qPHd de l'Université de Montpellier.

Anticorps

Anticorps	Espèce	Dilution IFA	Dilution WB	Référence
Anti-HA	Rat	1:1000	1:1000	clone 3F10, Roche
Anti-TY	Souris	1:200	1:100	Jean-François Dubremetz
Anti-MIC2	Souris	1:200		(Achbarou et al., 1991)
Anti-MIC1	Souris	T10 IF7		Jean-François Dubremetz
Anti-MIC8	lapin	1:1000		Dominique Soldati Favre
Anti-GAP45	lapin	1:7000		(Mann, 2001)
Anti-SAG1	Souris T4IE5	1:2000		Jean-François Dubremetz
Anti-SAG1	Lapin	1:1000		
Anti-AMA1 folded	Lapin	1:5000		(M. Lamarque et al., 2011)
Anti-AMA1 ectodomain	Lapin		1:2000	(Lamarque et al. 2011)
Anti-ARO	Lapin	1:1000		Dominique Soldati Favre
Anti-ROP1	Lapin	1:5000		(Dubremetz et Puijalon, non publié)
Anti-MIC6	Lapin	1:1000		(Reiss et al., 2001)
Anti-GRA3	Souris T62H11	1:100	1:100	(Achbarou et al., 1991)
Anti-247195 N-ter	Lapin		1:1000	Furio Spano
Anti-247195 C-ter	Lapin		1:1000	Furio Spano
Anti-HIS	Souris		1:3000	Sigma H1029
Anti-IgG de lapin HRP	Ane		1:10 000	711-035-152 Jackson Immunoresearch
Anti- IgG de rat PA			1:2500	Promega
Anti-IgG de lapin-PA			1 :7500	Promega
Anti-IgG de souris-PA			1 :7500	Promega
Anti IgG de rat-Alexafluor488	Chèvre	1 :2000		Thermofisher A11006
Anti-IgG de rat-Alexafluor594	Chèvre	1:4000		A11007
Anti IgG de lapin-Alexafluor594	Chèvre	1:4000		A11012
Anti IgG de lapin-Alexafluor488	Chèvre	1:10 000		A11008
Anti-IgGde souris-Alexafluor488	Chèvre	1:4000		A11001
Anti-IgGde souris-Alexafluor488 HCA	Chèvre	1:4000		A11029
Anti-IgGde souris-Alexafluor594	Chèvre	1:4000		A11005

Plages de lyse

Les tachyzoïtes fraîchement extracellulaires ont été centrifugés 5min à 1800rpm et resuspendus à une concentration de 2×10^5 p/mL dans du milieu complet +/- ATc. 35µL de cette suspension de parasite a été déposé dans les puits de la première ligne d'une plaque 24 puits contenant des HFFs et du milieu complet +/-ATc puis des dilutions sériées au $\frac{1}{4}$ ont été effectuées sur les 3 autres lignes de la plaque.

Les cellules infectées ont été placées durant 7 jours dans un incubateur à 37°C sans que la plaque ne soit bougée, puis les cellules ont été fixées et marquées avec les solutions Diff-Quick I et II (Medion diagnostics). Les plages de lyses ont été mesurées avec le logiciel ZEN (Zeiss) sur des images de Loupe Olympus au zoom 4. Pour chaque condition la plus grande et la plus petite plage de lyse ont été exclues des calculs de moyenne.

Réplication

Les tachyzoïtes fraîchement extracellulaires ont été centrifugés 5min à 1800rpm puis resuspendus à une concentration de 2×10^6 p/mL dans du milieu complet avec ou sans ATc. 2×10^5 tachyzoïtes ont été déposés en triplicats sur une plaque 24 puits contenant des cellules HFFs préalablement cultivées sur lamelles de verre. La plaque a été incubée à 37°C. Après 2h les cellules infectées ont été lavées 5 fois avec 1mL de HBSS et la plaque a été incubée 22h de plus.

Les cellules ont été fixées et l'IFA a été effectuée selon le protocole décrit précédemment avec anticorps anti-SAG1.

Les comptages sont réalisés sur un microscope à épifluorescence Leica au grossissement x60 sur 20 champs sélectionnés aléatoirement.

Les parasites contrôles et les parasites mutants KD-Nd11 + ATc ont été cultivés au préalable 24h dans un milieu contenant de l'ATc. Les parasites contrôle et KD-Nd12 + ATc ont été traités ATc uniquement le temps de l'expérience.

Egress

Les tachyzoïtes fraîchement extracellulaires ont été centrifugés 5min à 1800rpm puis resuspendus à une concentration de 1×10^6 p/ml dans du milieu complet avec ou sans ATc. 1×10^5 tachyzoïtes ont été déposés sur une plaque 24puits contenant des cellules HFF préalablement cultivées sur lamelles de verre (6 par condition) et la plaque a été incubée à 37°C. Après 2h d'incubation les cellules ont été lavées 5 fois avec 1mL de HBSS et les cellules infectées ont été incubées de nouveau pendant 28h à 37°C.

La sortie des parasites a été induite, sur 3 lamelles par condition avec $3 \mu\text{M}$ d'ionophore de calcium A23187 (Sigma) et 3 lamelles par conditions ont servies de contrôle et ont été traitées par DMSO dilué dans du DMEM ($15 \mu\text{L}/10\text{mL}$), durant 8min à 37°C.

Les cellules infectées ont été fixées et l'IFA a été effectuée selon le protocole décrit précédemment avec les anticorps anti-GRA3 et anti-GAP45.

Les comptages sont réalisés sur un microscope à épifluorescence Leica au grossissement x60 sur 200 vacuoles.

Les parasites contrôles et mutants KD-Nd11 + ATc ont été cultivés au préalable 24h dans un milieu contenant de l'ATc. Les parasites contrôle et KD-Nd12 + ATc ont été traités ATc uniquement le temps de l'expérience.

Gliding

Les parasites fraîchement sortis ont été centrifugés à 1800rpm durant 5min et resuspendus à $2 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ en tampon de motilité (DMEM sans SVF, $3 \mu\text{M}$ A23178). $100 \mu\text{L}$ de suspension de parasites a été déposé sur lame recouverte de poly-L-Lysine en triplicats et les lames ont été incubées 10min à 37°C en chambre humide. Les parasites ont été fixés et l'IFA a été effectuée comme décrit précédemment avec l'anticorps anti-SAG1.

Les parasites contrôles et KD-Nd11 + ATc ont été cultivés au préalable 48h dans un milieu contenant de l'ATC et 24h pour les parasite contrôles et ND-Nd12 + ATc.

Invasion

Les tachyzoïtes fraîchement sortis ont été centrifugés et resuspendus à 5×10^6 p/ $300 \mu\text{L}$ dans du milieu complet froid. $300 \mu\text{L}$ de la suspension de parasites a été déposée sur une plaque 24 puits contenant des HFF sur lamelles de verre en triplicats et la plaque a été placée 20min sur glace. La plaque a ensuite été placée à 37°C durant 5min.

Les cellules infectées ont été fixées en paraformaldéhyde à 4% dilué dans de l'HBSS (Hank's balanced salt solution) pour éviter la perméabilisation des cellules. Une première

Méthodes

partie de l'IFA est réalisée en HBSS sans étape de perméabilisation avec l'anticorps anti-SAG1 (marquage des parasites extracellulaires) et une seconde partie après perméabilisation saponine 1% diluée dans du PBS avec l'anticorps anti-ROP1 (marquage de la totalité des parasites) est effectuée comme décrite précédemment.

Les comptages sont réalisés sur un microscope à épifluorescence Leica au grossissement x60 sur 20 champs sélectionnés aléatoirement.

Les parasites contrôles et KD-Nd11 + ATc ont été cultivés au préalable 48h dans un milieu contenant de l'ATc et 24h pour les parasites contrôles et ND-Nd12 + ATc.

Sécrétion des micronèmes

100×10^6 tachyzoïtes par conditions ont été récoltés et lavés puis resuspendus dans 1mL d'Intracellular buffer (5 mM NaCl, 142 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 5.6 mM glucose and 25 mM HEPES, pH 7.2) à température ambiante. 500µL ont été répartis dans 2 eppendorfs et centrifugés à 18°C, 200g durant 2min. Les culots ont été resuspendus dans 100µL de DMEM puis 0,5µL de propranolol ou 0,5µL de DMSO a été ajouté (induit/non induit) et les parasites ont été incubés 10min à température ambiante et 20min à 37°C. Les tubes ont été centrifugés à 2000g, 4°C durant 5min. Les surnageant ont été transférés dans un eppendorf et centrifugés à 4000g, 4°C durant 5min, le second surnageant obtenu contient les ESA. Le culot a été lavé avec 90µL de PBS froid puis centrifugé à 2000g, 4°C durant 5min, et resuspendu dans 90µL de PBS. 30µL de Laemmli buffer 4X et 12µL de DTT a été ajouté dans chaque échantillon.

10µL des culots et 30µL des ESA ont été chargés sur un gel de polyacrylamide à 10% et transférés sur membrane PVDF. Le WB a été effectué comme décrit précédemment avec un anticorps anti-AMA1 et anti IgG de lapin – HRP.

Les parasites contrôles et KD-Nd11 + ATc ont été cultivés au préalable 48h dans un milieu contenant de l'ATc et 24h pour les parasites contrôles et ND-Nd12 + ATc.

Sécrétion des rhoptries : evacuoles

Les tachyzoïtes fraîchement sortis ont été centrifugés à 1800rpm durant 5min puis resuspendus à 5×10^6 p/300 μ L dans du milieu complet. Ils ont été incubés durant 10 min après ajout d'1 μ M de cytochalasine D. 300 μ L de suspension de parasites a été déposée sur une plaque 24 puits contenant des cellules HFFs préalablement cultivées sur lamelles de verre et la plaque a été centrifugée 1min à 250g puis placée à 37°C durant 15min.

Les cellules infectées ont été fixées puis l'IFA a été effectuée comme décrit précédemment avec un anticorps anti-SAG1 et anti-ROP1.

Les comptages sont réalisés sur un microscope à épifluorescence Leica au grossissement x60 sur 20 champs sélectionnés aléatoirement.

Les parasites contrôles et KD-Nd11 + ATc ont été cultivés au préalable 48h dans un milieu contenant de l'ATc et 24h pour les parasite contrôles et ND-Nd12 + ATc.

Sécrétion des rhoptries : SeCreEt system

Les cellules DsRed ont été cultivées à 80% de confluence puis divisées en flasques F25 à $2,5 \times 10^5$ cellules par flasque et cultivées pendant 24h. Les cellules ont ensuite été infectées avec 3×10^6 tachyzoïtes fraîchement sortis et incubées 24h à 37°C. Après 6h, les cellules infectées ont été lavées 2 fois en HBSS. Dans le cadre du projet PL3, les cellules infectées sont lavées 2 fois en HBSS après 1h ou 6h. Après 24h de culture, les cellules infectées ont été traitées par 1mL de trypsine 20% en HBSS et la trypsine a été inactivée par 1mL de milieu complet. Les cellules ont été triées par un cytomètre LSR FORTESSA (Becton Dickinson) selon leur taille, granulosité et fluorescence dans le canal vert (GFP).

Les parasites contrôles et KD-Nd11-SeCreEt + ATc ont été cultivés avant infection des DsRed 48h dans un milieu contenant de l'ATc et 24h pour les parasite contrôles et ND-Nd12-SeCreEt + ATc.

Co-immunoprécipitations

Les tachyzoïtes ont été cultivés sur des cellules Vero (ATCC CCL-81) dans du milieu complémenté avec 3% de SVF, 2mM de glutamine et 100 μ g/ml pénicilline/streptomycine. 100×10^6 tachyzoïtes fraîchement extracellulaires ont été repris en tampon de lyse (1% NP40, 50mM Tris-HCL pH8, 150mM NaCl, 4mm EDTA et inhibiteurs de protéases (cOmpete, Roche) durant 4h à 4°C avec agitation. Le lysat a été incubé une nuit à 4°C avec agitation avec des billes recouvertes d'anticorps anti-HA (Thermofisher) préalablement lavées avec du tampon de lyse. Les billes ont ensuite été lavées 5fois avec du tampon de lavage (50mM Tris-HCl

Méthodes

pH8, 1M NaCl, 0,5% NP40) froid. Les protéines capturées ont été éluées avec du tampon Laemmli et 5 min d'incubation à 95°C. Le western blot a été effectué comme décrit précédemment avec des anticorps anti-HA, anti-TY, anti-247195 et anti-RON4.

Spectrométrie de masse

Les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées comme décrit dans (Aquilini et al., 2020). L'immunopurification avec les billes recouvertes d'anticorps anti-HA a été effectuée comme décrit ci-dessus.

Brièvement, les protéines éluées ont été chargées sur un gel de polyacrylamide SDS-Page et digérées à la trypsine. Les échantillons ont ensuite été chargés sur une colonne de chromatographie en phase inverse et séparées avec un système de séparation rapide Ultimate 3000 (ThermoFisher) couplé à un spectromètre de masse Q Exactive HFX (ThermoFisher). Les analyses MS/MS ont été effectuées en mode data-dependant. Les données ont été acquises à une résolution de 60,000 à 200m/z. Les spectres ont été comparés aux protéomes UniProt de référence de *T.gondii* et de l'Homme (UP000001529 et UP000005640 respectivement) et à la table de contaminant MaxQuant.

Statistiques

Les données sont présentées sous la forme de moyennes et les barres d'erreur présentées montrent la déviation standard. Les tests de significativité ont été réalisés (après un test de Fisher sur l'égalité des variances) avec un t.test bilatéral.

Remerciements

Nous remercions Christophe Duperray et la plateforme MRI-Cytométrie à l'Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy (IRMB) et Elodie Jublanc et Vicky Diakou de la plateforme d'imagerie MRI à l'Université de Montpellier (plateforme membre de France-Bioimaging et supportée par l'ANR).

Nous remercions Dr. Furio Spano pour les anticorps anti-MIC15 Cter et Nter. Le Dr Soldati-Favre pour les anticorps anti-ARO et anti-MIC8.

Méthodes

Nous remercions Dr. Anita Koshy pour les cellules DsRed et Dr Helen Blau pour les cellules reportrices DsRed.

Nous remercions Serge Urbach de la plateforme de protéomique fonctionnelle de Montpellier.

RÉSULTATS – PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION

Il existe donc une étape du cycle lytique de *T. gondii* qui reste très mal décrite, celle qui donne lieu à l'exocytose du contenu des rhoptries après la sécrétion des micronèmes. C'est précisément ce que notre équipe cherche à comprendre. Nous souhaitons identifier les récepteurs de l'hôte, les transducteurs de signaux et les effecteurs parasites, qui permettent cette sécrétion et donc l'invasion. Ce projet de thèse a donc pour objectif d'identifier de nouveaux effecteurs de l'exocytose des rhoptries et de comprendre les mécanismes de reconnaissance de la cellule hôte ou d'effecteurs permettant d'initier la cascade de signalisation précédant la sécrétion des rhoptries.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans la continuité de l'étude d'Aquilini et Cova, qui a montré une analogie entre le mécanisme de sécrétion des rhoptries des Apicomplexes et celle des organelles de sécrétion des Ciliés. Nous avons proposé l'hypothèse que le profil d'expression des gènes de *Tetrahymena* impliqués dans la sécrétion des mucocystes pouvait être utilisé pour identifier de nouvelles protéines de sécrétion qui auraient des homologues chez *Toxoplasma*.

Dans une première partie, je vais décrire les résultats du crible informatique réalisé chez *Tetrahymena*, qui avait été réalisé avant mon arrivée au laboratoire en collaboration avec l'équipe d'Aaron Turkewitz, de l'université de Chicago, puis la caractérisation de deux protéines de *Toxoplasma* issues de ce crible. Nous avons cherché à comprendre la fonction de ces nouvelles protéines, à déterminer leur localisation, si elles étaient indispensables à la survie des parasites, et si elles étaient, comme les autres protéines Nd conservées, impliquées dans la sécrétion des rhoptries. Nous nous sommes demandé si elles agissaient comme un récepteur transmembranaire permettant une transduction de signal, comme nous le laissions penser les prédictions de domaines protéiques.

RÉSULTATS

1. Criblage par profil transcriptionnel

Comme décrit brièvement dans le chapitre IV, la transcription des gènes codant pour les protéines de matrice ou les protéines impliquées dans la biogenèse des mucocystes (*Tetrahymena*) est similaire (Briguglio et al., 2013; Haddad & Turkewitz, 1997). Nous avons, grâce à la contribution de l'équipe d'Aaron Turkewitz, de l'université de Chicago, comparé le profil de transcription de gènes *Nds* de *Tetrahymena*. Nous avons fait le choix d'utiliser les données de transcriptomique de *Tetrahymena* car elles sont plus nombreuses que chez la paramécie et que sur les 5 protéines *Nds* de la paramécie, 4 sont conservées chez *Tetrahymena*.

La figure 21 montre que les gènes *Nd6*, *Nd2*, *Nd169* et *Nd9* ont un profil d'expression similaire typique et proche des protéines de mucocystes. On observe un pic d'expression consécutif à la mise en privation de nutriment qui chute très rapidement (S6), un second pic autant voire plus important lors de la mise en contact avec une cellule d'un autre type complémentaire (conjugaison), qui chute également à C6. Une dernière augmentation de la transcription est visible 12h après le début de la phase de conjugaison.

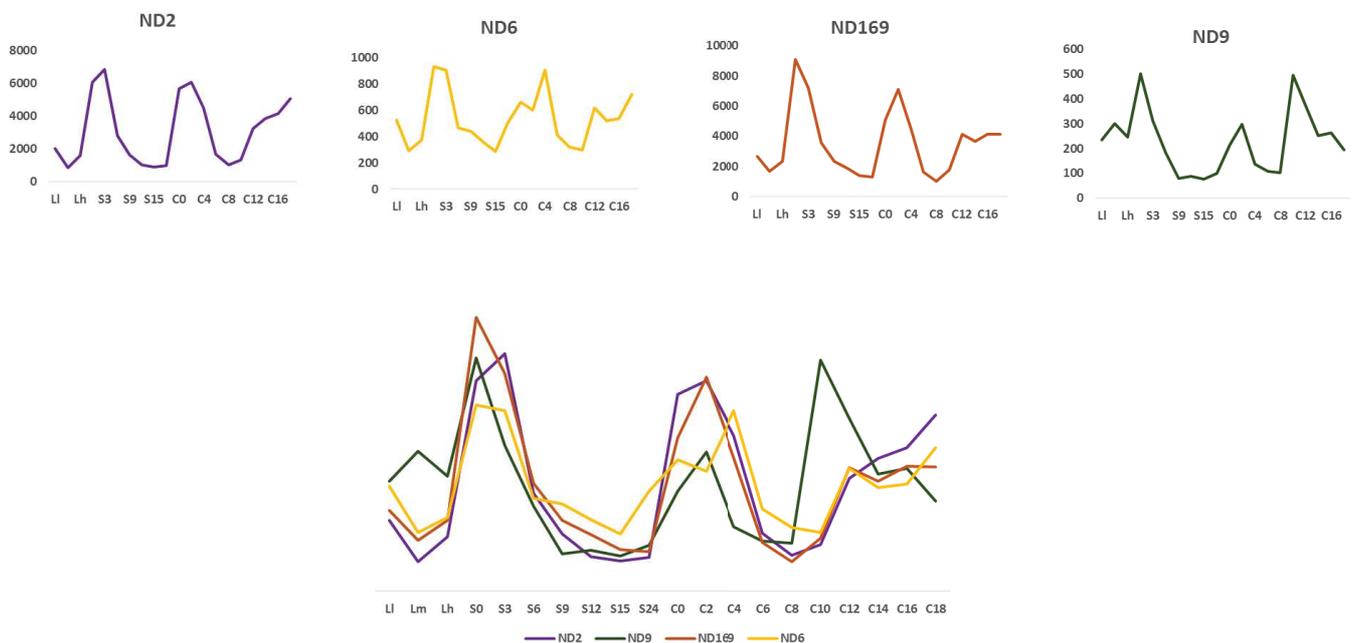


Figure 21 Profil d'expression des gènes THERM_00238300 (*Nd2*) THERM_00410160 (*Nd6*) THERM_00312200 (*Nd169*) THERM_00938850 (*Nd9*), et profils d'expression normalisés. Données issues de la base de données <http://tfgd.ihb.ac.cn/>, de 50 échantillons analysés par Gorovsky et al. et Miao et al et 10 échantillons de Pearlman et al. Les données ont ensuite été normalisées (par les moyennes) pour montrer la variation semblable d'expression au cours du cycle.

Partant du postulat que, de manière similaire, d'autres gènes impliqués dans l'exocytose des mucocystes pouvaient être aussi co-régulés, nous avons, grâce à la contribution de l'équipe d'Aaron Turkewitz, réalisé un criblage bio-informatique de la base de données transcriptomiques de *Tetrahymena*, en recherchant tous les gènes ayant un profil d'expression similaire à TT_Nd6 (Tsy-pin & Turkewitz, 2017). Comme visible sur la figure 21, l'expression de TT_Nd9 était trop faible pour utiliser ce profil de transcription pour une recherche bio-informatique fiable. Aussi, il est important de préciser ici, que ce travail a été réalisé avant la caractérisation des protéines qui interagissent avec TgNd9 (Aquilini et al., 2020). Parmi ces gènes, nous avons ensuite sélectionné ceux qui étaient conservés chez *T. gondii* et *P. falciparum*.

Le tableau 2 présente la liste des 20 gènes de *Tetrahymena* qui ont un profil d'expression le plus proche de Nd6 et qui ont un homologue chez *Toxoplasma*. Parmi les 20 gènes se trouvait comme attendu Nd6 de *T. gondii* et mais également la *Ferlin 2* (Coleman et al., 2018) et le gène *NdP1* (Aquilini et al., 2020). Ce gène a tout d'abord fait l'objet dans notre laboratoire d'une analyse fonctionnelle détaillée avant de découvrir qu'il était un partenaire du complexe Nd6/Nd9/NdP1/NdP2/Ferline2.

Nous avons également noté la présence d'une famille de 8 gènes inconnus de *Tetrahymena*, non caractérisés à ce jour, dont 5 présents parmi les premiers 20 hits (Tableau 2).

Tableau 2. Récapitulatif des 20 premiers résultats du criblage par analogie de profil d'expression avec TOTHERM_0041016

TETRAHYMENA		TOXOPLASMA		PLASMODIUM FALCIPARUM	
Gene ID	Nom connu	Gene ID	Nom connu	Gene ID	Nom connu
1 TOTHERM_01165230	Insulysin	TGME49_269885	Toxolysin 1	PF3D7_1123500	
2 TOTHERM_00442310	?	TGME49_292020		PF3D7_0718300	CRMP2
3 TOTHERM_00011840	(Nd6 homolog)	TGME49_248640	Nd6		
4 TOTHERM_01287970		TGME49_222660	NdP1	PF3D7_1432400	
5 TOTHERM_00189020					
		TgME49_292020			
6 TOTHERM_00637180	?	TgME49_207480		PF3D7_1208200	CRMP3
7 TOTHERM_00678480	?	TgME49_292020		PF3D7_1475400	CRMP4
8 TOTHERM_00283800	AVP1	TgME49_286240		PF3D7_1125700	
9 TOTHERM_00046850		TgME49_261080		PF3D7_1475400	CRMP4
10 TOTHERM_00348670		TgME49_292020		PF3D7_0911300	CRMP1
11 TOTHERM_00421210		TGME49_265205		PF3D7_1343900	
12 TOTHERM_00471040	CCF8	TGME49_287220		PF3D7_0423600	
13 TOTHERM_00214710		TGME49_265205		PF3D7_1406500	
14 TOTHERM_00440600		TgME49_260470	Ferlin 2	PF3D7_1455600	Ferlin 2
15 TOTHERM_01106190		TGME49_297360		PF3D7_1435600	
16 TOTHERM_00886960		TGME49_309420	Ferlin 1	PF3D7_0806300	
17 TOTHERM_01332070		TGME49_290720		PF3D7_0806800	
18 TOTHERM_00494660		TGME49_257625		PF3D7_0630700	
19 TOTHERM_00312310				PF3D7_1444100	
20 TOTHERM_00486980		TGME49_244620		PF3D7_1246900	

Ces gènes de *Tetrahymena* possèdent des caractéristiques communes. L'analyse des séquences protéiques a permis de mettre en évidence une homologie avec la Latrophiline/CL1 like. La latrophiline fait partie de la famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (GPCR) d'adhésion (aGPCR). La latrophiline est exprimée dans les synapses. Le domaine GPS, caractéristique des aGPCR, est présent dans les protéines THERM_00046850 et THERM_00678480 (Figure 22). Il s'agit d'un domaine conservé permettant l'auto clivage protéolytique, situé sur la partie extracellulaire des aGPCR. Les aGPCR, qui sont appelés récepteurs d'adhésion car ils possèdent ces domaines d'interaction protéine-protéine en N-terminal, sur une grande portion extracellulaire, ce qui permet l'interaction avec d'autres cellules ou également avec la matrice extracellulaire. On observe également un domaine GRIP and Coiled Coiled domain 2 et 3 (GCC2 et GCC3). Ce domaine est impliqué chez l'homme dans l'interaction de la protéine GCC2 avec des protéines Rab, liées au GTP et dans le recrutement de protéines à la membrane du TGN.

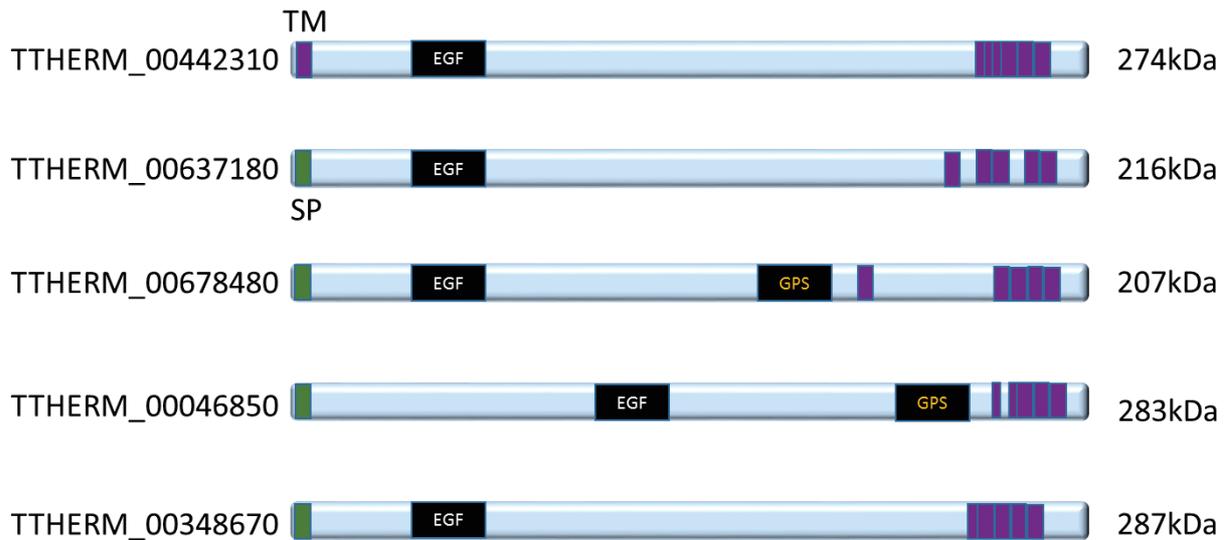


Figure 22. Schéma de l'organisation protéique des homologues de Nd11 et Nd12 chez *Tetrahymena*. Analyse réalisée par Dr. Daniela Sparvoli.

L'étude de *T. thermophila* est en cours au laboratoire. Daniela Sparvoli a réalisé des mutants chez *T. thermophila* et montré que THERM_00442310 et THERM_00637180 participaient à la sécrétion des mucocystes (données non publiées) mais ne jouaient pas de rôle dans la formation et le docking des mucocystes, validant le cribre initial.

Les homologues de ces gènes chez *Plasmodium falciparum* sont identifiés comme codant pour 4 protéines appelées cysteine repeat modular proteines (Figure 23). CRMP1 à 4 sont de longues protéines possédant comme les aGPCR de multiples domaines transmembranaires, et une grande portion contenant des motifs d'interaction protéique comme un domaine Kringle, un domaine EGF et une région riche en cystéine (Douradinha et al., 2011; Thompson et al., 2007).

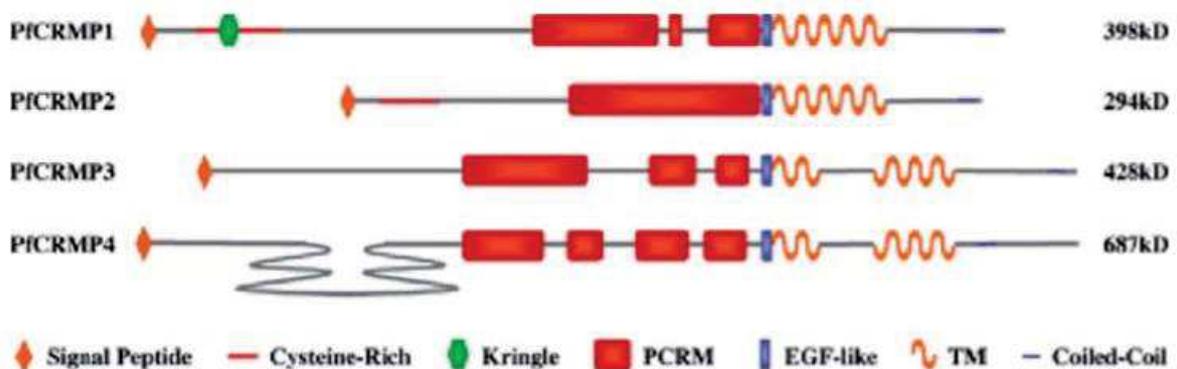


Figure 23. Représentation de la structure des protéines CRMPs de *P. falciparum* (Douradinha et al., 2011).

Les PfCRMP sont exprimées au stade sanguin et hépatique mais aussi au cours des stades chez le moustique. CRMP2 est d'ailleurs localisée en surface des sporozoïtes (Thompson et al., 2007). Les mutants n'exprimant pas les CRMP1, 2, 3 ou 4 sont, au stade sporozoïte, motiles et infectieux, et ne montrent pas de défaut au cours de la croissance intra-érythrocytaire. Les KO CRMP3 et KO CRMP4 ont en revanche un développement intrahépatocytaire affecté avec un arrêt de la croissance (Douradinha et al., 2011). CRMP1 et 2 semblent jouer un rôle dans l'adressage des sporozoïtes aux glandes salivaires du moustique, tandis que CRMP3 et 4 agissent plus en amont et sont impliquées dans la sortie des sporozoïtes de l'oocyste.

Nous observons que cette famille de gènes de *Tetrahymena* possède plusieurs homologues chez *T. gondii*, des protéines qui ont des domaines GCC2. Mais seulement deux ont une architecture similaire avec un domaine TM (transmembranaire) N-terminal et plusieurs domaines TM en C-terminal : TgME49_292020 et TgME49_261080. Ce sont également les seules prédites pour être essentielles (fitness scores : et -3,95 et -3,64 respectivement). La sécrétion des rhoptries et l'invasion étant des étapes essentielles du cycle lytique, nous nous concentrons donc sur ces gènes TGME49_261080 et TGME49_292020.

Les deux gènes étudiés codent pour des protéines possédant des répétitions de cystéines, des domaines EGF et Kringle (prédits par le programme Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk>)), un domaine transmembranaire en N-terminal et de nombreux en C-terminal, (Hamann et al., 2015). L'étude de ces gènes concernant leur implication dans la sécrétion des rhoptries nous a donc semblé pertinente. En effet, les GCPR ne sont pas connus chez *T. gondii* et il pourrait s'agir, soit des particules composant la rosette, soit de récepteurs membranaires permettant le signal donnant lieu à l'exocytose. S'ils agissent bien en tant que récepteurs, trouver les ligands qu'ils reconnaissent permettrait une grande avancée dans la connaissance des mécanismes d'invasion.

2. Séquences protéiques de TGME49_261080 et TGME49_292020

Les protéines encodées par les gènes TGME49_261080 et TGME49_292020, sont nommées dans la suite de ce travail Nd11 et Nd12 respectivement.

Nous avons dans un premier temps étudié les séquences protéiques de Nd11 et Nd12. Il s'agit de protéines de très grande taille d'une masse moléculaire (MW) prédite de 345 kilodaltons (kDa) et 817 kDa, respectivement. Les données de transcriptomique disponibles

Résultats première partie - Résultats

sur la base de données ToxoDB prédisent une expression très faible des protéines et tout au long du cycle cellulaire.

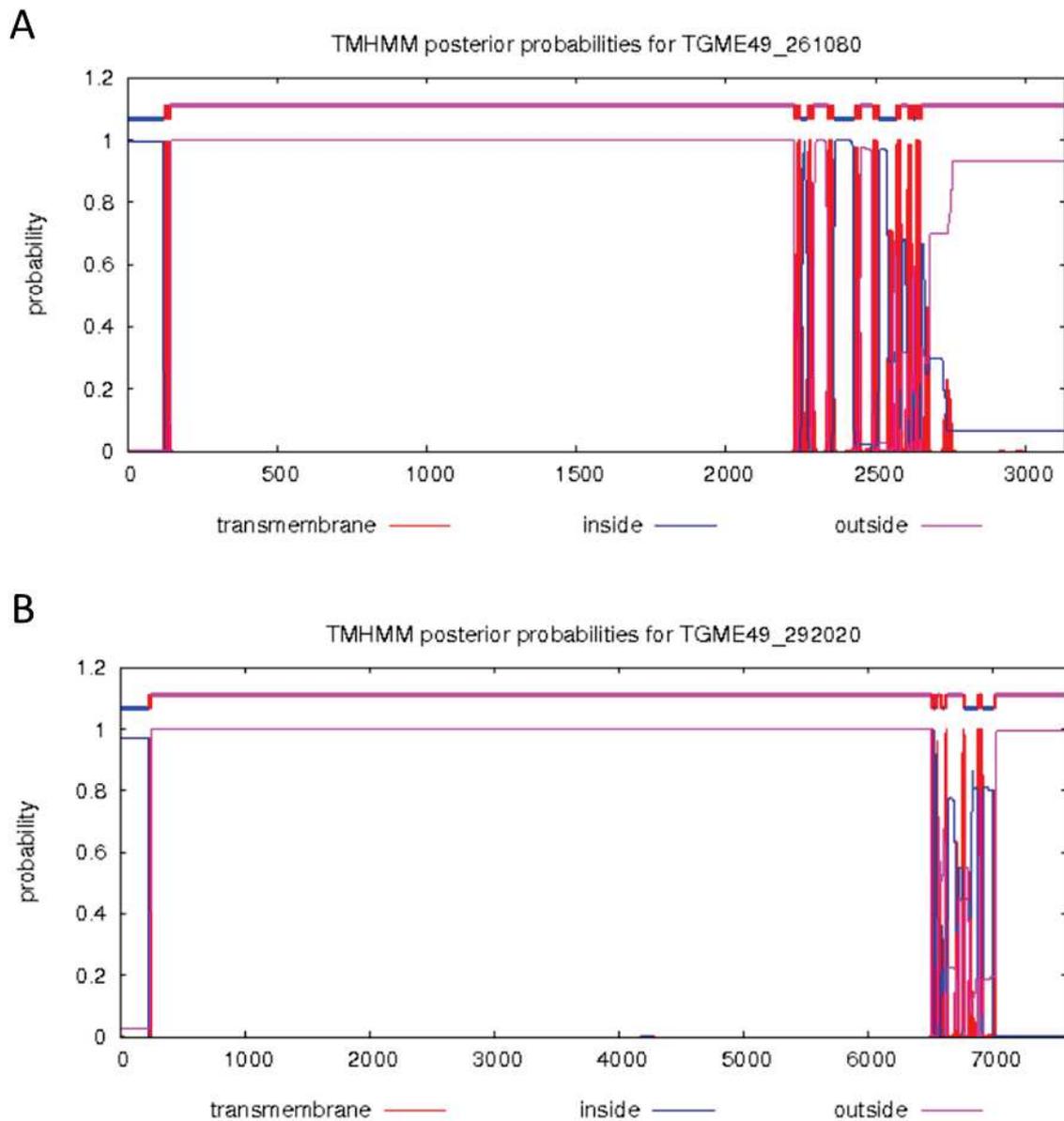


Figure 24. Prédications par le programme TMHMM <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> des hélices transmembranaires de Nd11 et Nd12.

D'après l'analyse réalisée sur le serveur TMHMM 2 (Figure 24) permettant la prédiction de domaines transmembranaires, nous observons que Nd11 et Nd12 possèderaient 1 domaine transmembranaire en N-terminal précédé d'une courte séquence d'environ 200 acides aminés, suivie d'une longue portion contenant les domaines prédits EGF et riche en cysteine, et enfin 8 domaines transmembranaires en C-terminal. Le domaine transmembranaire en N-terminal est éloigné du premier codon d'initiation de la traduction pour s'apparenter à un signal peptide permettant à Nd11 et Nd12 d'emprunter la voie de sécrétion ; mais un problème d'annotation n'est pas exclu.

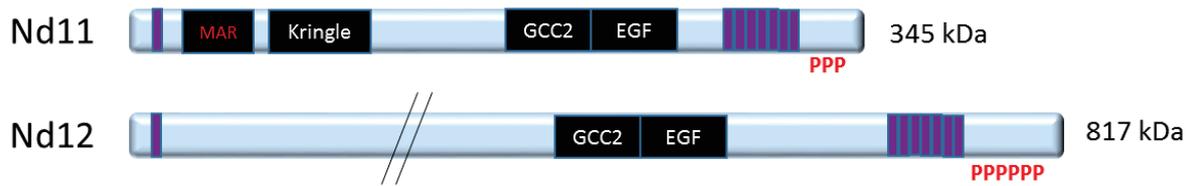


Figure 25. Schéma de l'organisation des domaines protéiques de Nd11 et Nd12. P : Sérine phosphorylée, violet : domaine TM.

L'analyse des séquences protéiques avec Phyre2 nous permet de prédire un domaine MAR (Matrix attached region) sur Nd11, domaine impliqué dans la liaison des sucres, identifié dans la protéine de micronème MIC1 de *T.gondii* ou MIC3 d'*Eimeria* (Figure 25). On retrouve également le domaine EGF récepteur comme dans les protéines homologues de *Tetrahymena* ainsi que le domaine GCC2 (Grip and Coiled). La GCC2 est une protéine transmembranaire impliquée chez l'Homme dans le transport vésiculaire entre les endosomes et le Golgi. Nd11 possède un domaine Kringle en N-terminal. Le domaine Kringle est un domaine impliqué dans la liaison protéine-protéine, ou protéine-phospholipide.

D'autre part, nous observons la présence de nombreuses sérines phosphorylées sur la queue C-terminal de Nd11 et Nd12.

Les homologues de Nd11 et Nd12 chez *Tetrahymena* possèdent pour leur part un peptide signal hormis THERM_00442310 et THERM_00348670. En revanche, THERM_00442310 possède en toute extrémité N-terminale un signal transmembranaire annoté qui pourrait être en fait un peptide signal (Figure 22). Ceci amène à s'interroger sur la nature du premier domaine transmembranaire de Nd11 et Nd12, qui semble trop éloigné du N-terminal pour être un peptide signal. Elles possèdent toutes les multiples domaines transmembranaires en C-terminal et une longue portion centrale contenant les domaines EGF et GPS. Il est intéressant de noter que la région majoritairement conservée entre ces protéines et Nd11 et Nd12 se situe au niveau C-terminal de Nd11 et Nd12, soit au niveau des domaines GCC2-EGF et des domaines transmembranaires.

En effectuant les alignements protéiques, Nd11 semble être plus proche de PfCRMP1 et CRMP2 tandis que Nd12 de CRMP3 et CRMP4. L'homologie entre ces protéines se situe de même qu'avec *Tetrahymena*, au niveau C-terminal.

Les divergences entre les CRMPs de *Plasmodium*, *Nd11* et *Nd12* et les gènes de *Tetrahymena* sont exposées dans cet arbre phylogénétique. Celui-ci a été réalisé en alignant les séquences protéiques entières. On observe bien sur cet arbre les homologies avec les PfCRMP (Figure 26).

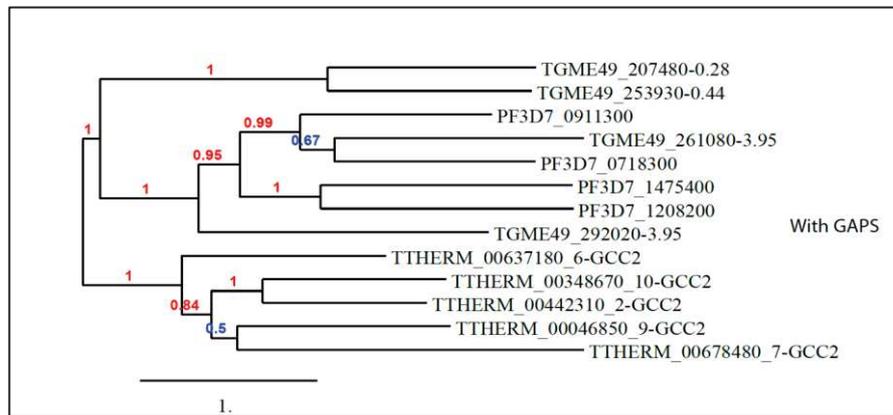


Figure 26. Divergence entre les gènes codant pour les protéines contenant des domaines « GCC2 » chez *Tetrahymena*, *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*. Réalisé par le Dr. Arnault Graindorge.

3. Localisation

Pour définir la localisation de *Nd11* et *Nd12* nous avons décidé d'ajouter un tag triple hémagglutinine (HA3) en C-terminal de la protéine endogène. Pour ceci, nous avons utilisé la stratégie CRISPR CAS9. Les ARNg ont été définis grâce à l'outil CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) pour une coupure avant le codon STOP en 3' des gènes. Après transfection et sélection nous avons obtenu des clones exprimant *Nd11_HA3* ou *Nd12_HA3*, validés par PCR (Figure 27).

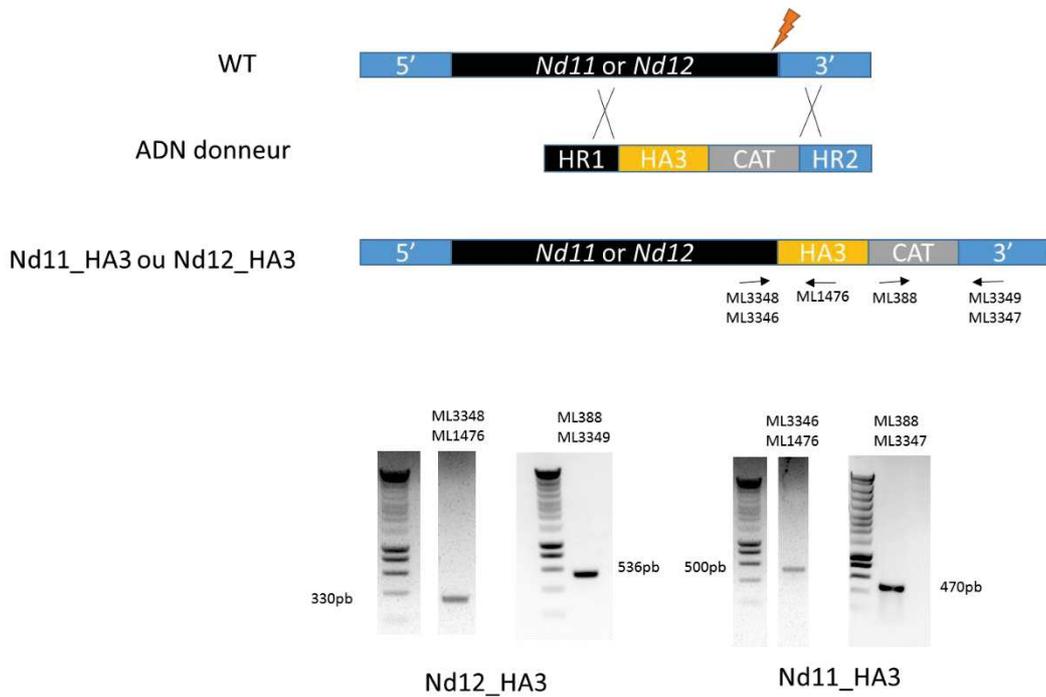


Figure 27. Stratégie et validation PCR des clones Nd11_HA3 et Nd12_HA3.

En WB, nous observons que Nd11 apparait à une taille d'environ 300kDa, ce qui est la taille attendue et correspond à la plus haute bande du marqueur de taille (Figure 28a). On observe deux bandes de tailles peu différentes si l'on considère la grande taille de Nd11, de l'ordre de la dizaine de kDa de différence, ce qui peut correspondre à un clivage ou une maturation post traductionnelle. Dans la piste Nd12, on observe une bande spécifique en haut du gel. Compte tenu de la taille attendue de Nd12 d'environ 800kDa et du manque d'un marqueur de taille adapté, nous pensons qu'il s'agit de Nd12.

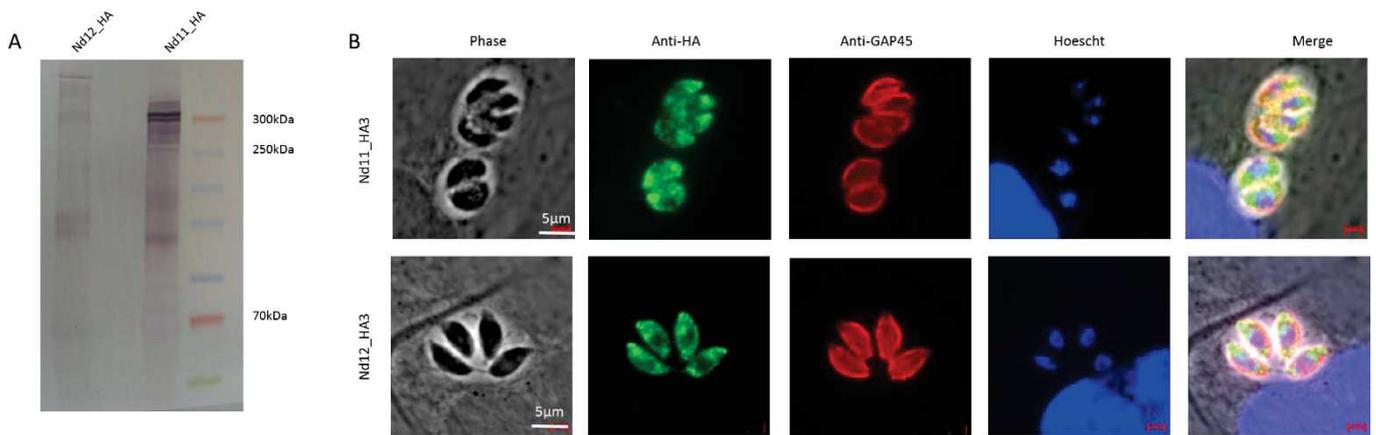


Figure 28. Nd11_HA et Nd12_HA sont localisées dans le cytoplasme. A. WB de lysat de tachyzoïte Nd11-HA et Nd12-HA. Anticorps anti HA de lapin et anti IgG de lapin-PA. Marqueur de taille Spectra HR protein ladder. B. Localisation en IFA de Nd11_HA3 et Nd12_HA3. Anticorps anti-HA et anti-GAP45. Barre d'échelle 2µm.

L'analyse en immunofluorescence (IFA) permet d'observer que Nd11 et Nd12 sont localisées dans le cytoplasme, et apparaissent dans un marquage ponctué (Figure 28b). On observe parfois qu'elles se répartissent selon un gradient de concentration apical.

Nd11 et Nd12 ne colocalisent pas avec les protéines de micronèmes MIC1, MIC2, MIC8 et MIC6.

Avec l'aide de Laurence Berry, nous avons ensuite tenté de localiser Nd11 et Nd12 en utilisant l'immuno-electro-microscopie, en utilisant des anticorps couplés à des billes d'or, mais le marquage n'était pas concluant, avec la présence de billes d'or de façon diffuse, comme dans le contrôle. En revanche, nous avons, sur certains parasites, observé un marquage plus ciblé sur des micronèmes, sans savoir si cela relevait d'un artefact (données non montrées).

Nous avons par la suite voulu déterminer la localisation de Nd11 et Nd12 dans des tachyzoïtes extracellulaires, sur lames recouvertes de poly-L-lysine, pour savoir si la localisation cytoplasmique pouvait évoluer. Sur des parasites perméabilisés, nous observons la même localisation punctiforme cytosolique. Pour tenter de déterminer si une portion de Nd11 ou Nd12 pouvait se situer à la membrane plasmique, compte tenu des nombreux domaines TM, nous avons tenté de marquer des tachyzoïtes extracellulaires non perméabilisés. Malgré de nombreuses tentatives et optimisations, nous n'avons pas réussi à obtenir une parfaite conservation de l'intégrité de la membrane plasmique et n'avons donc pas pu conclure (données non montrées).

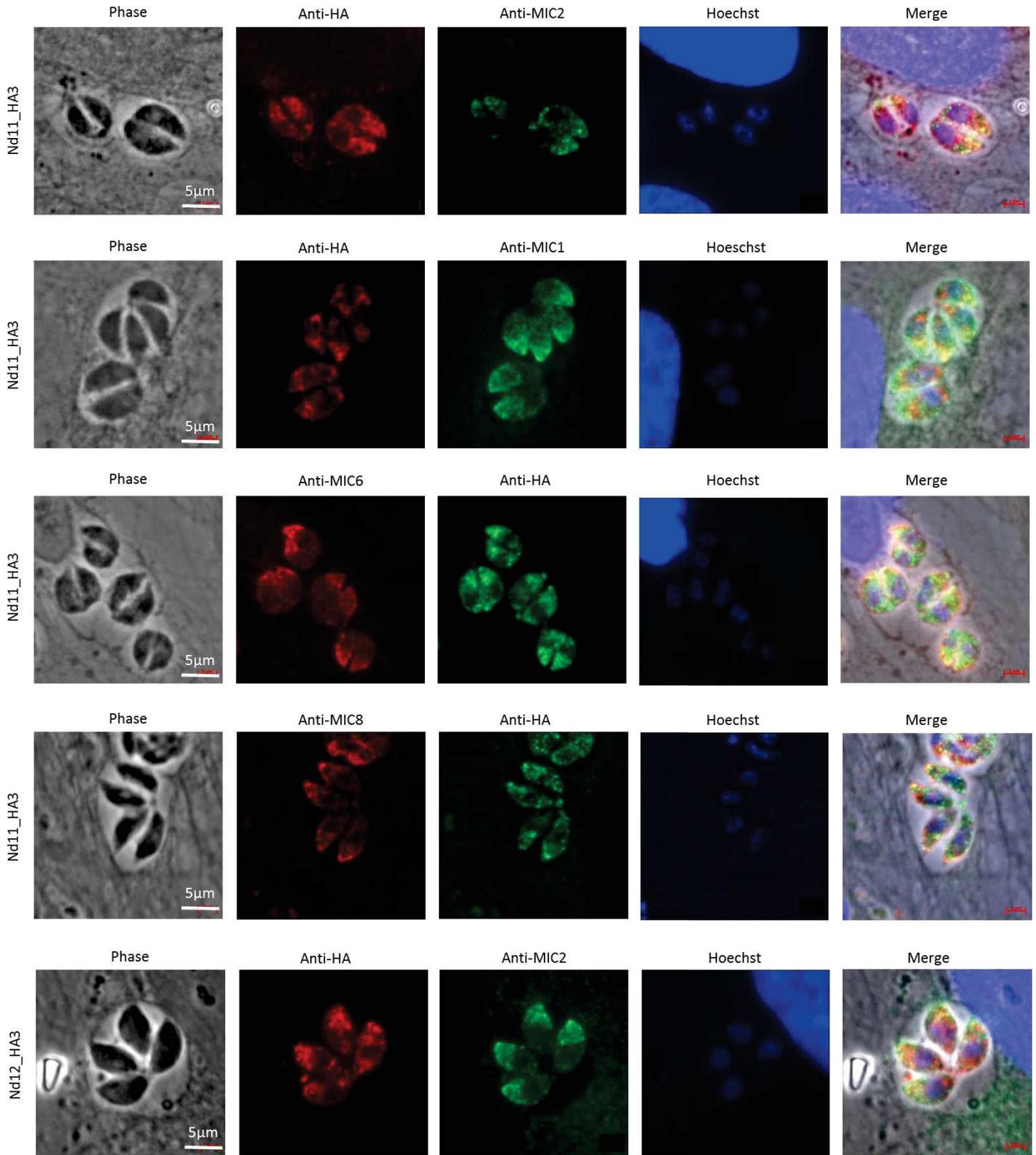


Figure 29. Localisation en IFA des protéines MIC1, MIC2, MIC6 et MIC8 dans les souches exprimant Nd11_HA3 et Nd12_HA3. Anticorps anti-HA, anti-MIC1, anti-MIC2, anti-MIC6 et anti-MIC8. Barre d'échelle 2μm. Anti-IgG de souris 488 HCA, anti IgG de lapin 594 et anti-IgG de rat 594 ou 488.

4. Typologie

La détermination de la typologie de Nd11 et Nd12, c'est-à-dire de leur organisation globale, est une manière de comprendre si elles sont insérées dans des membranes, lesquelles, et de quelle façon.

Dans un premier temps, nous avons entrepris d'étiqueter Nd12 en N-terminal (Figure 30). Pour cela nous avons ajouté une séquence codant pour un tag TY3 sans marqueur de sélection à l'extrémité 5' du gène juste après le codon START dans la souche exprimant une protéine étiquetée en C-terminal. Nous avons pu sélectionner les clones grâce à un tri FACS sur l'expression de la GFP qui est exprimée en fusion avec la Cas9.

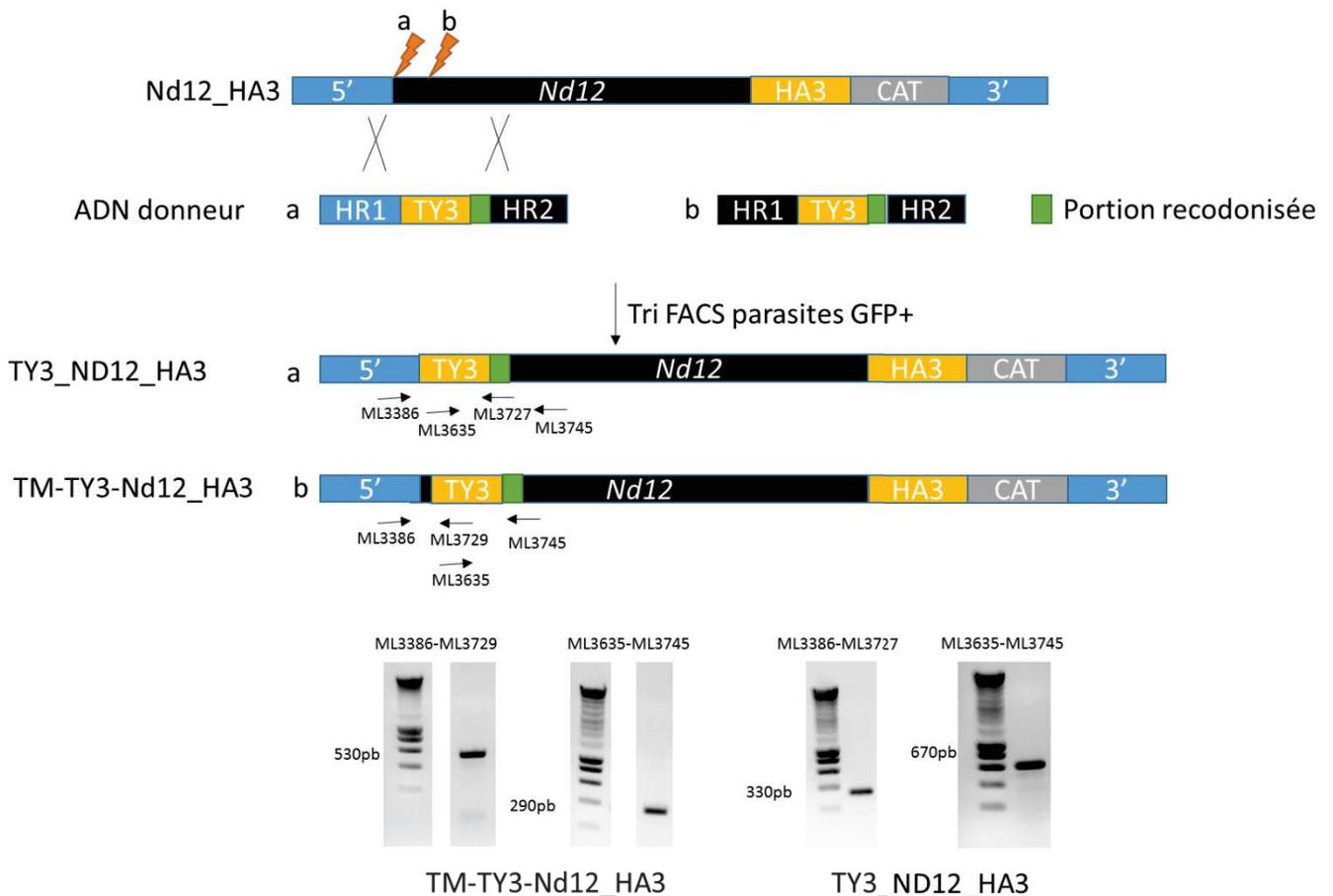


Figure 30. Stratégie et validation PCR des clones TY3_Nd12_HA3 et NterNd12_TY3_Nd12_HA3.

En IFA ou en WB, nous observons que le tag TY n'est pas visible. Nous émettons l'hypothèse d'un clivage en N-terminal, possiblement au niveau du premier domaine TM qui agirait alors comme un peptide signal. Nous avons donc généré une seconde souche exprimant Nd12 taguée avec TY3 mais cette fois après le premier TM (Figure 30b). Nous avons choisi d'insérer le tag TY 6 acides aminés après le domaine TM. Nous observons en WB que la protéine taguée TY3 en N-terminal est de même masse moléculaire apparente que la protéine taguée en C-terminal (Figure 31a). De plus, en IFA, bien que le marquage TY soit moins fort de par la spécificité des anticorps, la localisation de Nd12 est inchangée (Figure 31b). Nous concluons donc que Nd12 est soit mal annotée, soit clivée en N-terminal, possiblement après le premier domaine transmembranaire qui pourrait servir de peptide signal. Nous observons des bandes multiples avec l'anti-TY. Il peut s'agir d'un manque de spécificité de l'anticorps ou au contraire de la révélation de l'existence de clivages en C-terminal.

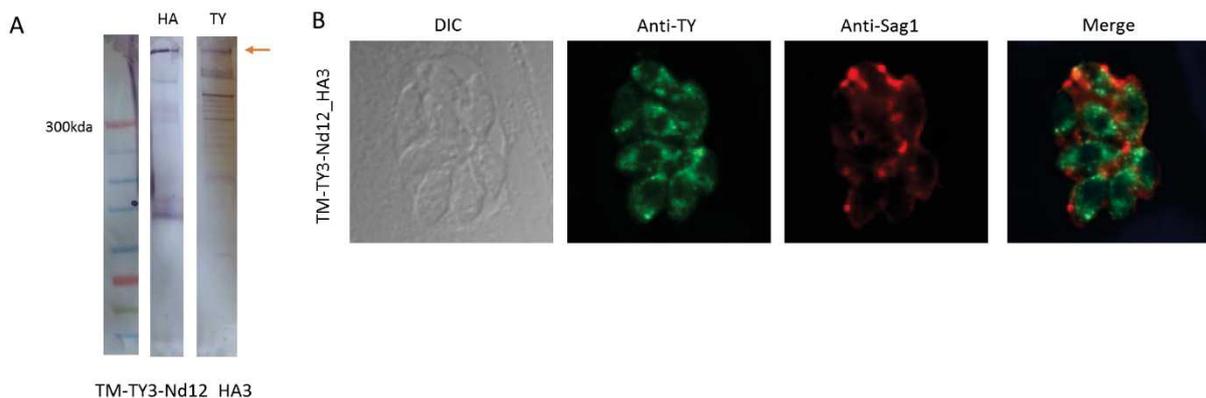


Figure 31. WB et IFA de la souche NterNd12_Ty3_Nd12_HA3. **A.** WB sur lysat de tachyzoïtes de souche TM-TY3-Nd12_HA3. Marqueur de taille spectra high range protein ladder. Anticorps anti HA et anti-TY, anti-IgG de souris – phosphatase alcaline et anti IgG de rat-phosphatase alcaline. **B.** Images en IFA de de cellules infectées par des tachyzoïtes exprimant Nd12 étiquetée TY après le premier domaine TM. Anticorps anti sag1 et anti TY. Anticorps anti IgG de souris alexa fluor 488 et anti IgG de lapin 594 (Diana Penarete).

Pour comprendre la fonction de Nd11 et Nd12, nous avons voulu déterminer si la partie centrale contenant les domaines d'interaction EGF, Kringle et MAR se situait coté lumen ou coté cytosolique, et de même pour la queue C-terminale. Pour ceci, nous avons choisi deux axes expérimentaux.

Le premier est la perméabilisation différentielle et protection contre la protéinase K. Nous avons perméabilisé des tachyzoïtes exprimant Nd12 taguée à la fois en N-ter (après le TM) et en C-ter avec différents pourcentages de digitonine. Ceci permet d'accéder de façon progressive aux compartiments membranaires, en perméabilisant d'abord la membrane du

parasite jusqu'à la membrane des rhoptries ou des micronèmes, ou tout autre compartiment vésiculaire. Nous avons ensuite traité les parasites à la protéinase K, ce qui permet de dégrader les protéines (ou portions de protéines dans le cas de protéines transmembranaires) rendues accessible par la perméabilisation. Les protéines visibles après migration sur gel SDS-page sont uniquement les protéines n'ayant pas été dégradées, et donc contenues dans des compartiments non perméabilisés. Nous pensons appliquer cette technique en observant de potentielles différences entre le tag en N-ter et le tag en C-ter. Malheureusement, nous avons observé beaucoup de variabilité dans les résultats, ce qui ne nous a pas permis de déterminer la façon dont Nd12 serait insérée dans les membranes.

Le second axe reposait sur l'utilisation de la technique développée par Harding et al., pour caractériser la topologie des protéines GAPM (Harding et al., 2019). Cela consiste en la co-expression chez le parasite d'un nanobody reconnaissant la GFP et exprimant mCherry, et de la protéine d'intérêt taguée GFP (Figure 32). Le nanobody est exprimé dans le cytosol, si la protéine d'intérêt est insérée dans la membrane de l'organelle, de telle manière que le tag est exposé coté cytosolique, le nanobody reconnaît la GFP et s'y fixe. Le signal mCherry normalement diffus devient alors membranaire. Si le tag est coté lumen, le nanobody ne peut le reconnaître et le signal mCherry reste diffus.

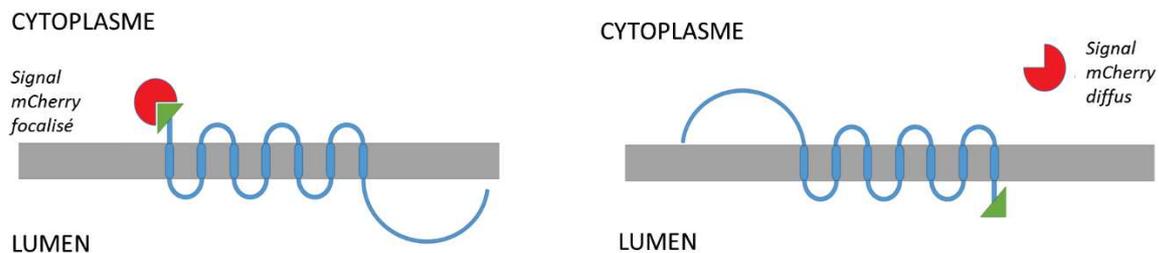


Figure 32. Schéma du fonctionnement de la méthode de détermination de la typologie selon la technique de Harding et al.

Nous avons donc décidé de taguer Nd11 et Nd12 avec la GFP, en C-ter dans un premier temps, puis via une transfection transitoire d'exprimer dans ces parasites le nanobody. Les expériences préliminaires sont encore en cours sur la souche obtenue Nd11-GFP, qui est validée uniquement par PCR sur la population totale à ce jour.

5. Génération des mutants

Nd11 et Nd12 sont prédites comme essentielles et il n'est donc probablement pas possible d'exciser le gène pour obtenir un mutant knockout (KO). Pour déterminer la fonction de ces protéines, nous avons opté pour la stratégie de changement de promoteur, pour un promoteur inductible à la tétracycline. La technique TetOff nous permettra de réguler le niveau d'expression des gènes et donc d'obtenir des mutants Knock down (KD).

Nous avons réalisé les transfections dans les souches tagués Nd11-HA3 et Nd12-HA3, pour visualiser la diminution de la quantité de protéine après traitement à l'anhydrotétracycline (ATc). Les clones obtenus KD-Nd11 et KD-Nd12 ont été validés par PCR (Figure 33).

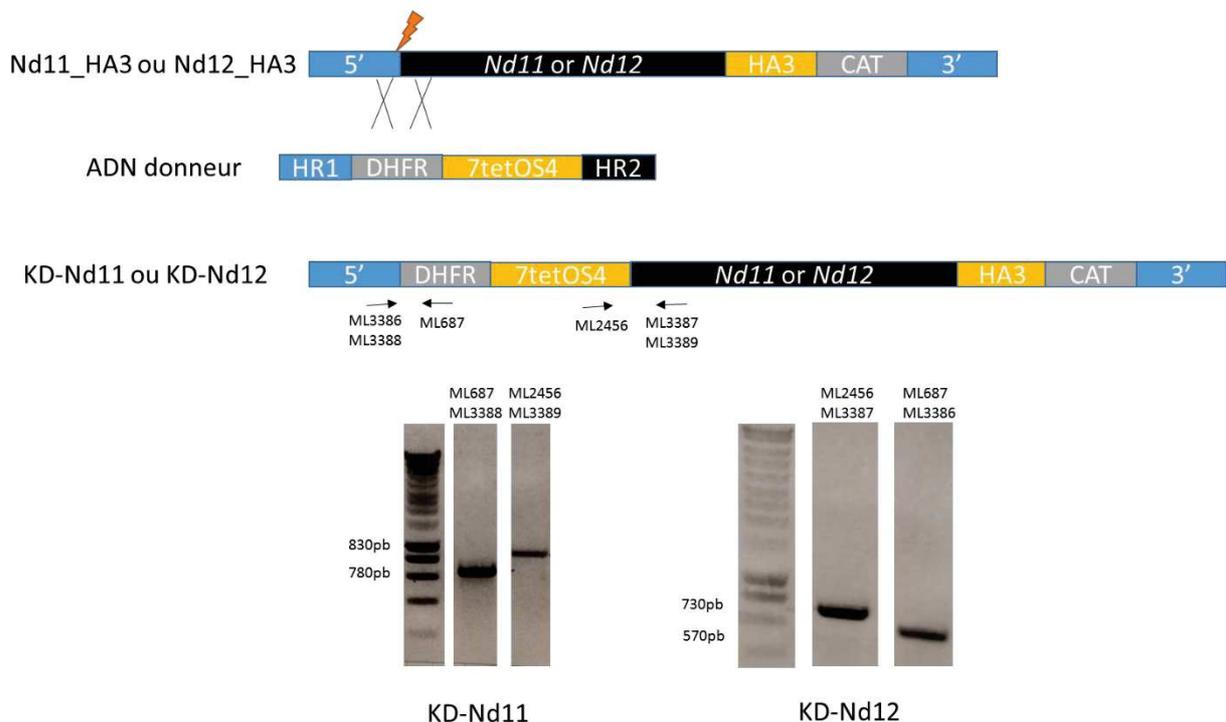


Figure 33. Stratégie et validation PCR des clones KD-Nd11 et KD-Nd12.

Les clones de KD-Nd12 ont été obtenus difficilement. L'insertion du promoteur entraînant la perte des parasites transgéniques au cours de la sélection. Nous avons donc cloné les parasites directement après la sortie des parasites transfectés des cellules soit 48h post transfection et avons ainsi pu obtenir le KD-Nd12 clonal. On observe par WB que le changement de promoteur n'a pas affecté l'expression de Nd11 qui est retrouvée à la même taille que dans la souche tagguée (Figure 34a). Après 48h de traitement ATc, la quasi-totalité de la protéine est supprimée. Dans le cas du KD-Nd12, on observe que le changement de promoteur affecte le niveau d'expression de la protéine, et que la bande correspondant à

Nd12 est de très faible intensité. Après 24h de traitement ATc, on observe plus de bande correspondant à Nd12. En IFA, la localisation de Nd11 sous contrôle du promoteur inducible semble inchangée (Figure 34b). Après 24h, le tag HA n'est plus visible avec les anticorps suggérant que la quantité de protéine est fortement diminuée. Nous observons que comme en WB, la quantité de protéine Nd12 semble fortement diminuée dans le mutant KD-Nd12 sans traitement ATc, nous n'observons qu'un très faible marquage avec les anticorps anti-HA, et le traitement ATc de 24h semble totalement supprimer l'expression de Nd12.

Les expériences sur ces mutants seront donc toutes réalisées avec 48h de traitement ATc pour la protéine Nd11 et 24h pour la protéine Nd12.

Résultats première partie - Résultats

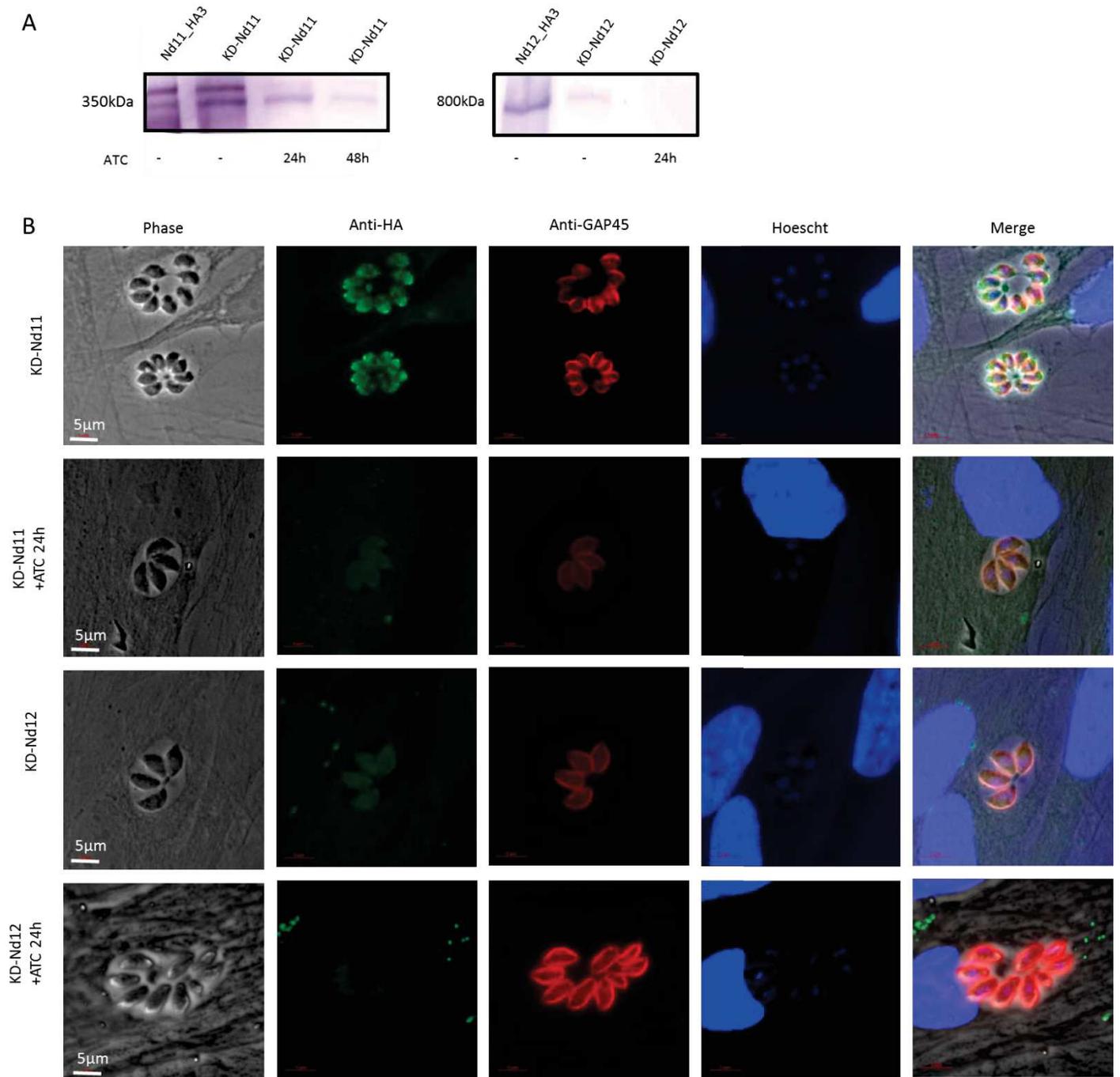


Figure 34. WB et IFA de la déplétion de Nd11 et Nd12. **A.** Western-blot de lysat de tachyzoïtes KD-Nd11 ou KD-Nd12 traités ou non avec ATC durant 24 ou 48h. Anticorps anti-HA et anti-IgG de rat couplé à la phosphatase alcaline **B.** Images d'immunofluorescence de cellules infectées par le KD-Nd11 ou KD-Nd12 durant 24h en présence ou non d'ATC. Grossissement x100, barre d'échelle 5µm.

Nous avons infecté des monocouches de cellules HFF durant 7 jours avec les parasites KD obtenus et des parasites WT, traités ou non en ATC, pour réaliser une étude des plages de lyse. Nous observons que dans le cas des KD-Nd11 ou KD-Nd12 + ATC, il n'y a aucune plage de lyse après 7 jours d'infection, ce qui conforte dans l'essentialité de Nd11 et Nd12 (Figure 35). Nous observons également que le mutant KD-Nd12 est affecté par le

changement de promoteur, puisqu'en l'absence de traitement ATc on observe une diminution de 50% de la taille des plages de lyse (Figure 35b). Ce qui corrobore les résultats en IFA et WB montrant une bonne suppression d'expression des protéines. Le phénotype semblant drastique, nous conservons tout de même ce mutant pour la suite du travail, malgré le phénotype déjà présent en l'absence d'ATc. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus en WB montrant une diminution de l'expression de Nd12 dans le KD sans traitement à l'ATc.

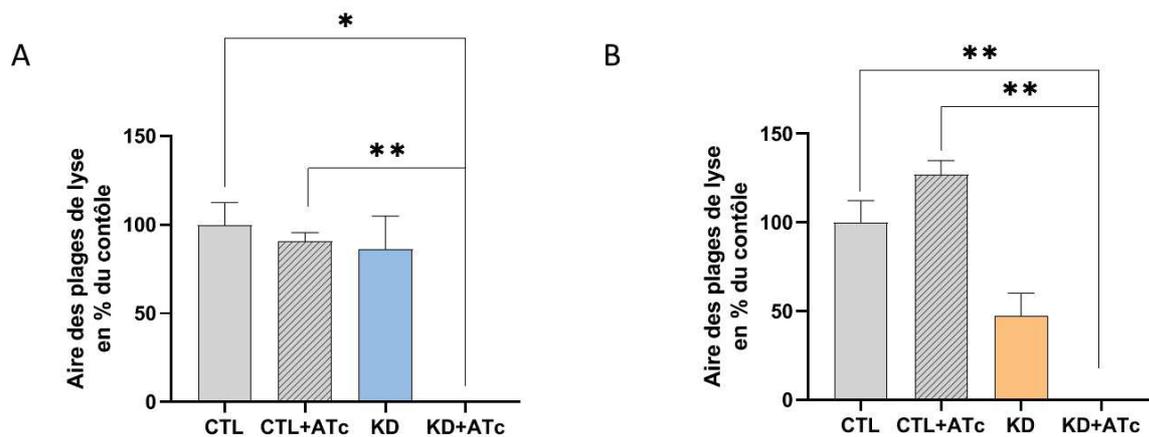


Figure 35. Aire des plages de lyse. **A.** Aire des plages de lyses après infection durant 7 jours d'une monocouche de cellules HFF infectées avec 100 parasites de souche Nd11-HA +/-ATc et Nd11-KD +/-ATc, n=3 technical replicates, une expérience représentative. Erreur : SD, Student T test ***p<0,005. **B.** Aire des plages de lyses après infection durant 7 jours d'une monocouche de cellules HFF avec n=100 parasites de souche Nd12-HA +/-ATC et Nd12-KD +/-ATc, n=3, une expérience représentative. Erreur : SD, Student T test ***p<0,005.

Par la suite, nous avons contrôlé en IFA que les rhoptries et les micronèmes étaient bien localisés et d'aspect comparable au WT après traitement ATc (Figure 36b). Grâce à Laurence Berry, nous avons également observé les mutants traités en ATc en microscopie électronique et pu conclure à l'absence d'effet du traitement ATc sur l'ultrastructure des mutants KD-Nd11 et KD-Nd12 (Figure 36a).

Résultats première partie - Résultats

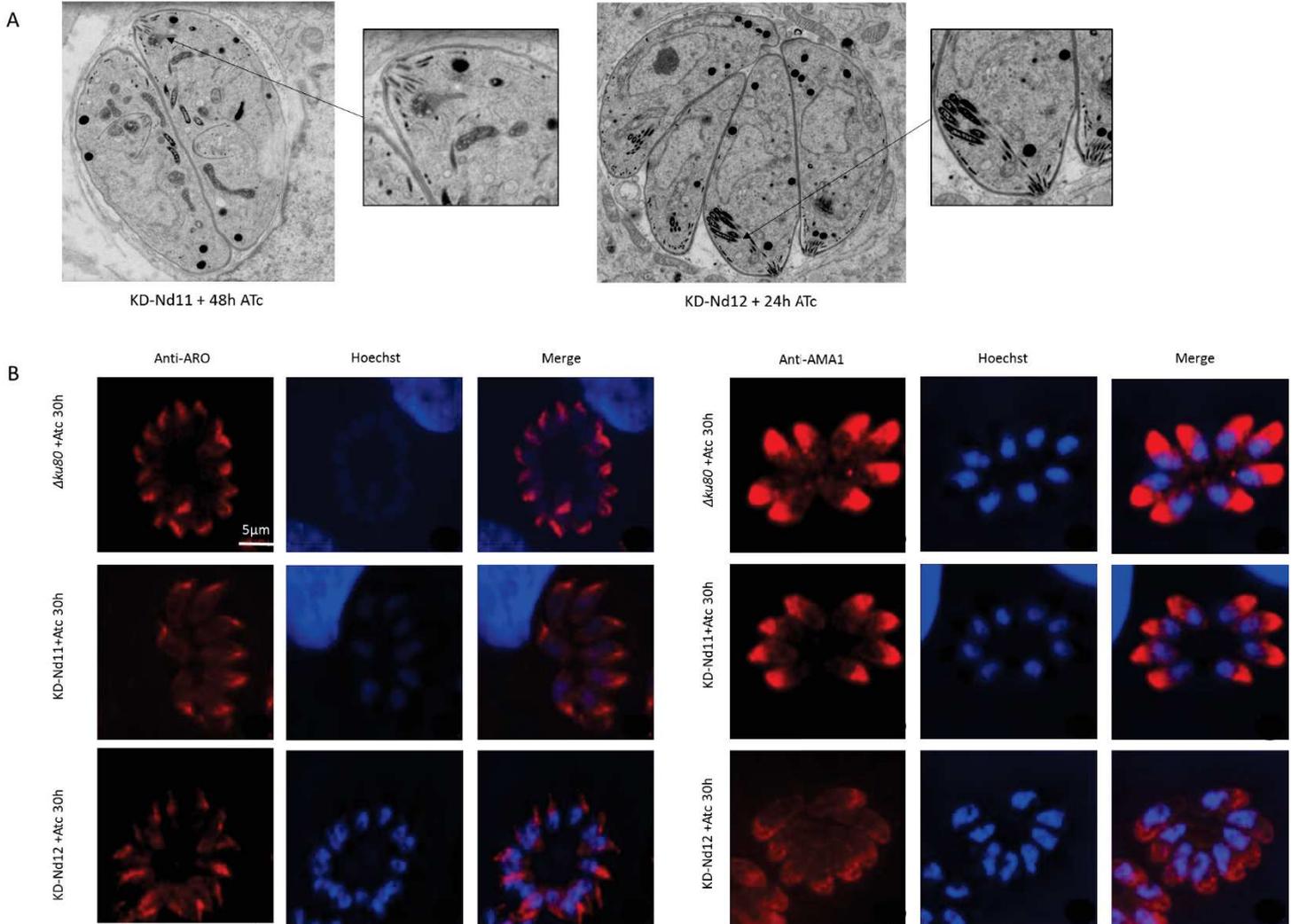


Figure 36. La diminution d'expression de Nd11 et Nd12 n'entraîne pas de défaut morphologique. A. Ultrastructure des mutants KD-Nd11+ATc après 48h de traitement et KD-Nd12 + ATc après 24h de traitement. Images de microscopie électronique ; Grossissement de l'apex permettant de visualiser le conoïde, les rhoptries (KD-Nd12) et les micronèmes (Laurence Berry-Sterkers). **B.** Localisation en IFA de AMA1 et ARO dans les souches WT, KD-Nd11 et KD-Nd12 après 30h de traitement ATc. Anticorps anti-AMA1 et anti-ARO.

6. Nd11 et Nd12 sont indispensables à l'invasion

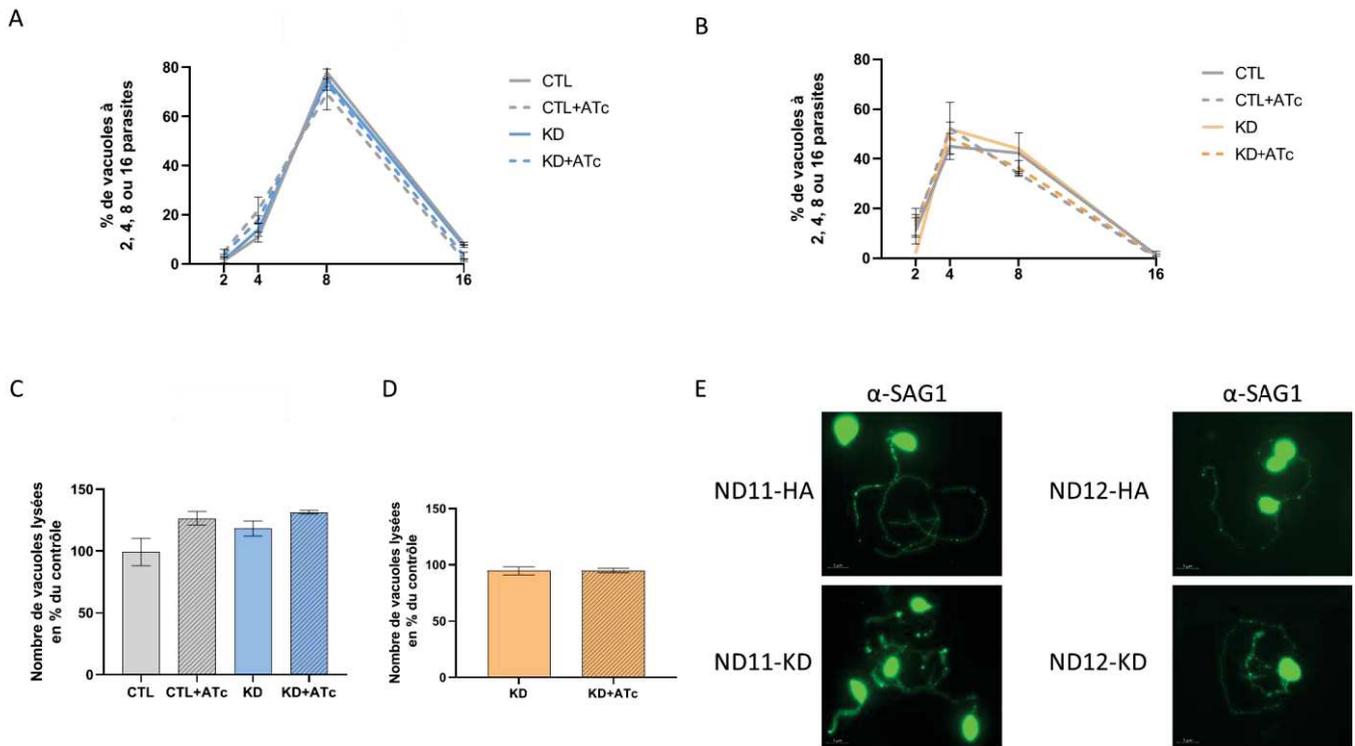


Figure 37. Nd11 et Nd12 ne sont pas impliquées dans les mécanismes de motilité, sortie et réplication. **A.** Pourcentage de vacuoles à 2, 4, 8, ou 16 parasites sur 20 champs après 24h d'infection d'une monocouche de cellules HFF par des parasites de souche Nd11-HA3 ou KD-Nd11 traités ou non en ATc durant 48h. Une expérience représentative Erreur=SD **B.** Pourcentage de vacuoles à 2, 4, 8, ou 16 parasites sur 20 champs après 24h d'infection d'une monocouche de cellules HFF par des parasites de souche Nd12-HA3 ou KD-Nd12 traités ou non en ATc durant 24h. Une expérience représentative Erreur =SD **C.** Nombre de vacuoles lysées après induction de la sortie au Ca²⁺ ionophore en pourcentage du contrôle. Induction 30h post infection de cellules HFF par des parasites de la souche contrôle Nd11_HA3 ou KD-Nd11 traités ou non en ATc le temps de l'expérience et 24h avant. Une expérience représentative. Erreur = SD. **D.** Nombre de vacuoles lysées après induction de la sortie au Ca²⁺ ionophore en pourcentage du contrôle. Induction 30h post infection de cellules HFF par des parasites de la souche contrôle Nd12_HA3 ou KD-Nd12 traités ou non en ATc le temps de l'expérience. Une expérience représentative. Erreur = SD. **E.** Motilité glissante. Trainées de protéines SAG1 par des parasites Nd11-HA3, Nd12_HA3, KD-Nd11 et KD-Nd12 traités 24h (Nd12) et 48h (Nd11) en ATc, incubés sur lame recouverte de poly-L-Lysine durant 20min à 37°C. IFA avec Anticorps anti-Sag1 de souris.

Pour comprendre la fonction de Nd11 et Nd12, nous avons analysé le phénotype des mutants au cours du cycle lytique (Figure 37). Pour toutes les expériences, le contrôle et le KD-Nd11 sont prétraités dans le but d'obtenir une incubation des parasites avec l'ATc de 48h totale. Dans le cas du contrôle et du KD-Nd12, le traitement total ATc est d'une durée de 24h. Dans un premier temps, nous avons étudié le comportement de réplication intracellulaire. Après 24h post infection (hpi), le nombre de parasites par vacuoles est le même chez les mutants traités ou non par ATc et les parasites Wild-Type (WT) (Figure 37a et 37b).

Nous n'observons pas en culture la présence de grosses vacuoles chez les mutants qui puissent laisser présager un défaut de sortie. Les parasites sont retrouvés libres dans le surnageant. Ceci est confirmé par le traitement de vacuoles 30hpi par ionophore de calcium, dans le but d'induire la sortie des parasites des cellules. En effet aucun défaut n'est observé pour les KD-Nd11 et KD-Nd12, la quasi-totalité des vacuoles a rompu après traitement au calcium ionophore comme pour les parasites WT (Figure 37c et 37d).

La sécrétion des micronèmes impacte l'invasion, la sortie et la motilité glissante. Après avoir confirmé l'absence de lien entre les fonctions de Nd11 et Nd12 et la sortie de la cellule hôte, nous avons analysé la motilité des parasites extracellulaires sur des plaques de poly-L-lysine, en observant les trainées composées de protéine SAG1 qui adhère au substrat pour permettre la motilité glissante. Nous avons confirmé que les trainées semblaient normales pour les mutants traités en ATc et une absence de différence avec le WT (Figure 37e).

Pour étudier l'invasion, nous avons infecté des cellules HFF durant 5min à 37°C par des parasites WT et les KD traités ou non en ATc. Nous observons dans le cas de Nd11, une diminution de l'invasion de l'ordre de 30% dans le KD sans traitement ATc, et lors de l'addition d'ATc nous obtenons 90% de réduction de l'invasion (Figure 38a). Dans le cas de Nd12, le phénotype observé lors de l'analyse des plages de lyses est confirmé puisque le KD-Nd12 sans traitement ATc n'a une capacité d'invasion que d'environ 40% du contrôle (Figure 38b). En revanche, la suppression de Nd12 affecte l'invasion avec une diminution de l'ordre de 98% du nombre de parasites intracellulaires. Nd11 et Nd12 sont donc des protéines probablement impliquées dans le processus d'invasion. Comme elles possèdent des domaines de liaison aux sucres, il nous faut toutefois vérifier qu'elles ne sont pas impliquées dans l'attachement aux cellules.

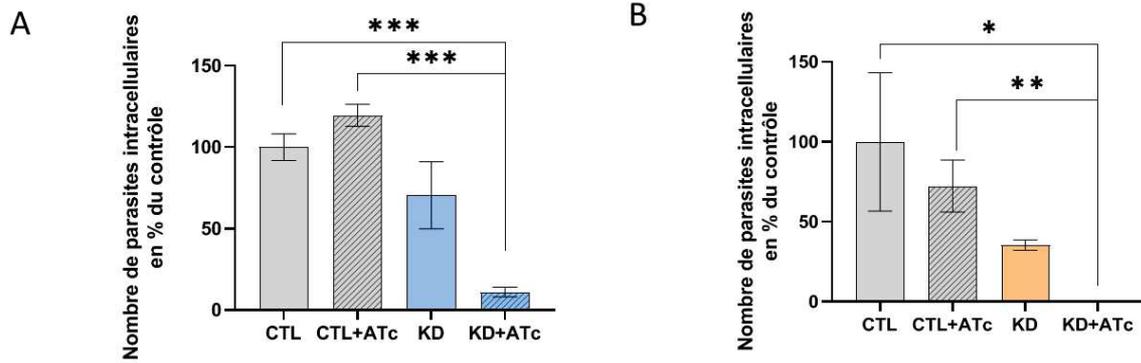


Figure 38. Nd11 et Nd12 sont essentiels à l'invasion. **A.** Nombre de parasites extracellulaires sur 20 champs après 5 min d'invasion à 37 degrés par 5×10^6 tachyzoïtes de souche contrôle Nd11-HA +/-ATc ou mutant KD-Nd11 +/-ATc sur une monocouche de cellules HFF, représenté en pourcentage du contrôle. Erreur : SD, n=3, une expérience représentative **B** Nombre de parasites extracellulaires sur 20 champs après 5 min d'invasion à 37 degrés par 5×10^6 tachyzoïtes de souche contrôle Nd12-HA +/-ATc ou mutant KD-Nd12 +/-ATc sur une monocouche de cellules HFF, représenté en pourcentage du contrôle. Erreur : SD, n=3, une expérience représentative.

7. Nd11 et Nd12 sont indispensables à la sécrétion des rhoptries mais pas à celle des micronèmes.

Le processus d'invasion est gouverné par la sécrétion des deux types d'organites apicaux, les micronèmes et les rhoptries. La sécrétion des micronèmes intervient en premier, et est indispensable à la sécrétion des rhoptries. Les micronèmes sont impliqués également dans la sortie de la cellule et la motilité glissante, qui ne sont pas affectées lors de la diminution de l'expression de Nd11 et Nd12, mais également dans l'attachement.

Pour tester la sécrétion des micronèmes en l'absence de Nd11 et Nd12, nous avons utilisé des culots de 50 millions de parasites extracellulaires, que nous avons mis en présence de propranolol ou de DMSO (Figure 39). Le propranolol permet d'induire la sécrétion des micronèmes en inhibant la PA phosphatase et en augmentant la quantité de PA. Les surnageant collectés contiennent les protéines secrétées et sont appelés ESA (Excretory secretory antigens). Nous observons, pour les mutants Nd11 et Nd12, que la protéine de micronème AMA1 est retrouvée dans le culot en l'absence de propranolol (ni) à la taille attendue pour sa forme non clivée soit environ 70kDa et dans le surnageant en présence de propranolol (i) à la taille de 55kDa environ, et donc clivée, dans le cas du contrôle WT mais également dans le cas du KD + ou - ATc. GRA3 est constitutivement secrétée et constitue le contrôle. Les blots ont par la suite été incubés avec des anti-MIC2 pour nous permettre de confirmer les résultats avec une seconde protéine de micronèmes. MIC2 est également retrouvée dans sa forme immature dans les culots et dans sa forme

clivée dans les ESA induits (non montré). Nous concluons que la sécrétion des protéines de micronèmes n'est pas affectée par l'absence de Nd11 et Nd12.

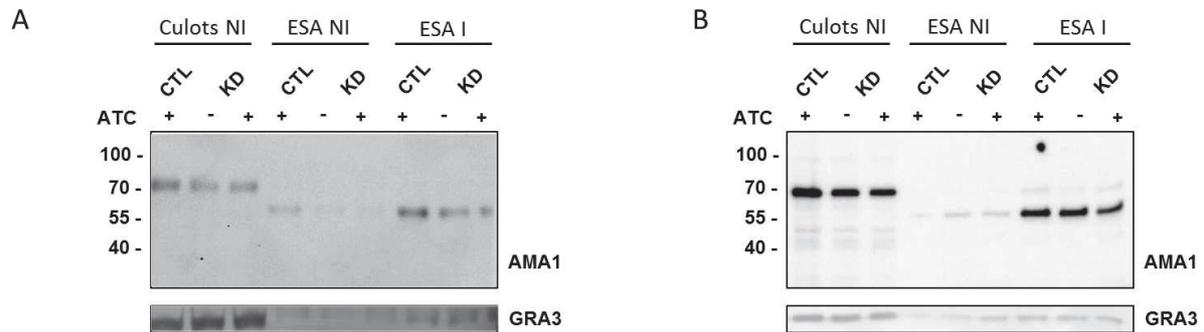


Figure 39. L'absence de Nd11 et Nd12 n'affecte pas la capacité à sécréter les micronèmes. A. Analyse de la sécrétion des protéines de micronèmes du contrôle Nd11-HA3 + ATc ou du mutant KD-Nd11 +/-ATc. B. Analyse de la sécrétion des protéines de micronèmes du contrôle Nd12-HA3 + ATc ou du mutant KD-Nd12 +/-ATc. 50 millions de tachyzoïtes extracellulaires sont utilisés pour chaque condition, les parasites sont incubés 20min à 37 degrés pour permettre la sécrétion. NI : non induit (+DMSO), I : induit (+propranolol). ESA : Excretory secretory Antigens (surnageant). Les échantillons sont resuspendus en PBS + Tampon Laemmli+ DTT. Révélation WB avec anticorps de lapin anti-AMA1 et anti IgG de lapin-HRP, anti-GRA3 de souris et anti-IgG de souris-PhosphataseAlcaline.

Pour tester la sécrétion des rhoptries, nous avons tout d'abord utilisé la technique des e-vacuoles. Nous avons donc incubé des tachyzoïtes traités ou non en ATc avec de la cytochalasine D dans le but d'inhiber la polymérisation de l'actine et ainsi bloquer l'invasion. Après avoir laissé sédimenter les parasites sur les monocouches de cellules, nous les plaçons à 37°C, ils secrètent alors le contenu des micronèmes et des rhoptries, formant la jonction mobile mais restent à l'extérieur des cellules. Nous pouvons donc visualiser ROP1 sécrétée dans les cellules sous forme de petites vésicules. Pour les deux mutants Nd11 et Nd12 nous observons que le KD+ATc est capable de sécréter le contenu de ses rhoptries 80% moins que le WT (Figure 41a et 41b). On retrouve le phénotype du KD-Nd12 en l'absence de traitement ATc, en observant une diminution de la capacité sécrétoire de l'ordre de 20% (Figure 41b).

Dans un objectif de quantification de ce défaut, nous avons opté pour une seconde méthode développée par Koshy et al. (Koshy et al., 2010). Cette technique est basée sur l'utilisation d'une lignée cellulaire reporthrice, exprimant le gène *DsRed* (nommées ci-après cellules *DsRed*). Le gène est suivi d'un codon stop, puis du gène codant pour la GFP (non exprimé) et flanqué de deux régions *LoxP*. Nous infectons cette lignée cellulaire avec des parasites exprimant le gène de la toxofiline, une protéine de rhoptrie, à laquelle nous ajoutons une séquence nuclear localisation signal (NLS), et couplée à la recombinaison CRE. Lors de l'infection des cellules, les parasites secrètent leurs rhoptries et la toxofiline est

dirigée au noyau. La Cre recombinase reconnaît alors les régions LoxP et excise donc le gène *DsRed* ainsi que le stop, et permet l'expression de la GFP (Figure 40a et 40c).

Nous avons donc transfecté les parasites mutants KD avec un ADN donneur permettant l'expression de la toxofiline couplée à la CRE recombinase, et un ARNg permettant l'intégration de cet ADN donneur dans le gène de l'*UPRT*. Après sélection nous avons obtenu des clones appelés KD-Nd12-toxofilineCre et KD-Nd11-toxofilinCre (Figure 40b). Ces clones ont été utilisés pour infecter des cellules DSred durant 24h, puis nous avons analysé la fluorescence des cellules par FACS.

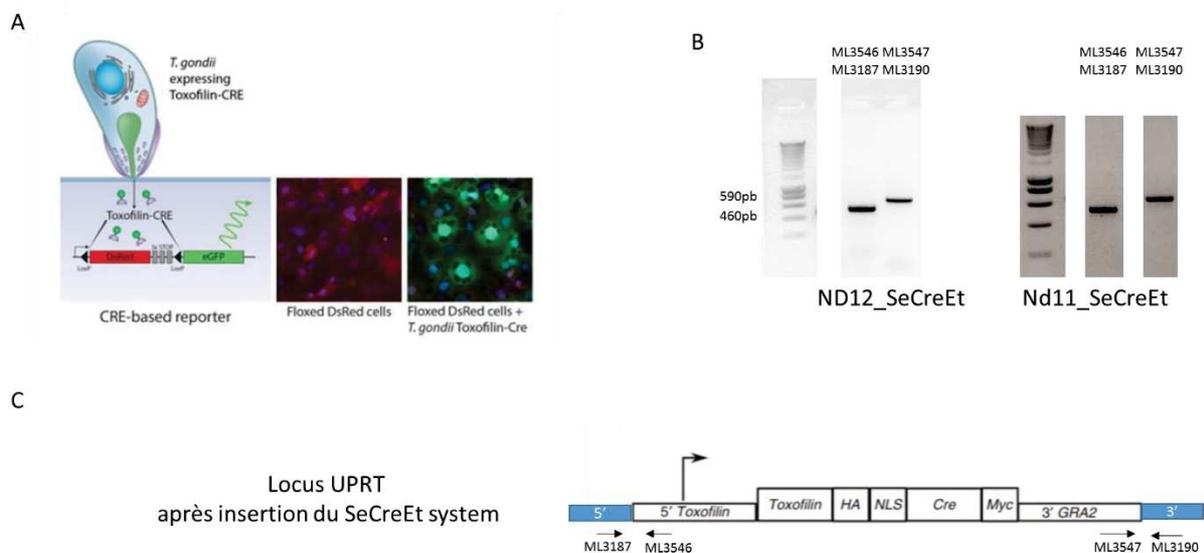


Figure 40. Validation PCR des clones Nd11_SeCreET et Nd12_SeCreEt. A. Schéma du fonctionnement de la méthode SeCreEt (*Toxoplasma gondii, methods and protocols 2019*) B. Validation PCR des clones KD-Nd11-SeCreEt et KD-Nd12-SeCreEt. C. Locus *UPRT* après insertion de la séquence Toxofilin-Cre (*Koshy et al., 2010*).

Ceci nous permet de conclure à un défaut de sécrétion des rhoptries en l'absence de Nd11 d'à peu près 80% et en l'absence de Nd12 de 60% (Figure 41c et 41d). Le défaut de sécrétion en l'absence de Nd12 est calculé ici en comparaison du KD-Nd12 non traité en ATc, qui souffre déjà d'un défaut de sécrétion observé précédemment. Il est donc possible que ce phénotype soit ici minimisé.

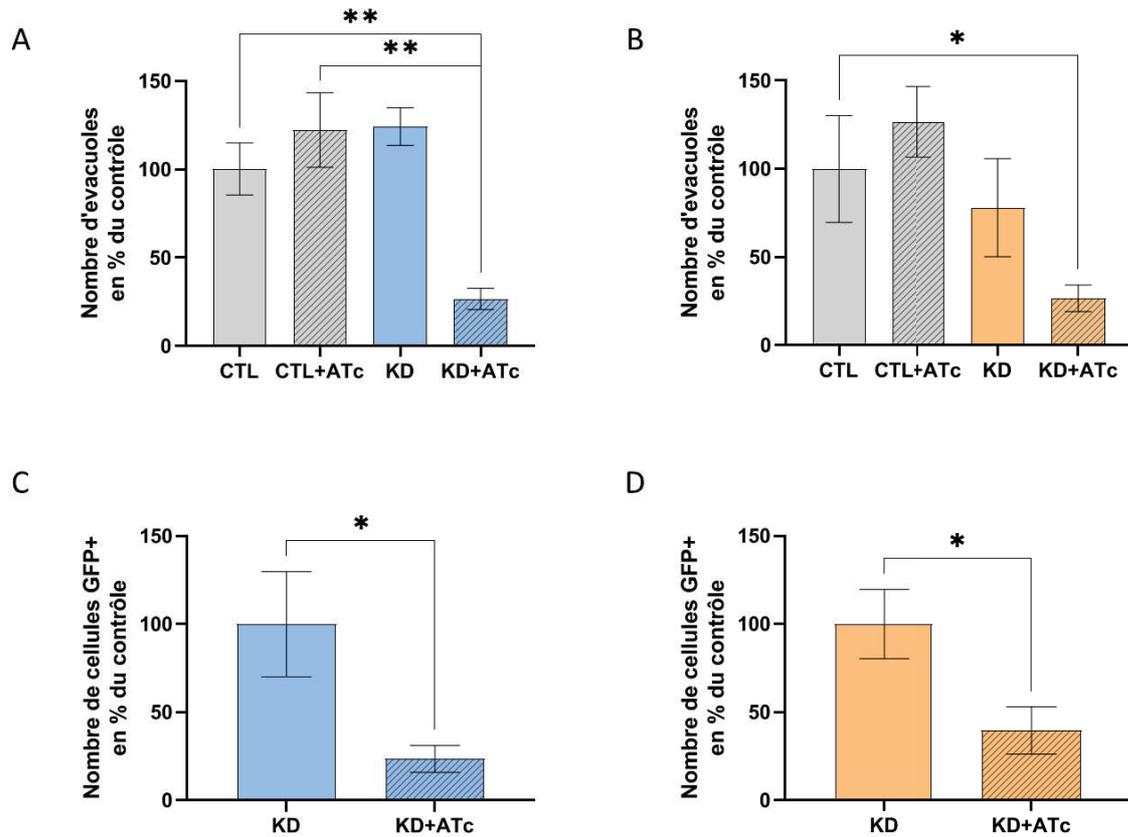


Figure 41. Nd11 et Nd12 sont indispensables à la sécrétion des rhoptries. **A.** Quantification des e-vacuoles sécrétées sur 20 champs après infection durant 20 min par la souche contrôle Nd11-HA +/- ATc et la souche Nd11 KD +/- ATc. Les parasites sont traités en cytochalasine D. **B.** Quantification des e-vacuoles sécrétées sur 20 champs après infection durant 20min par la souche contrôle Nd12-HA +/- ATc et la souche Nd12 KD +/- ATc. Les parasites sont traités en cytochalasine D. **C.** Quantification du % de cellules DsRed exprimant la GFP après infection durant 24h par la souche Nd11-KD +/- ATc. Les données sont normalisées par rapport au contrôle. N= 3 expériences indépendantes, Student T test *** P-value <0,005. **D.** Quantification du % de cellules DsRed exprimant la GFP après infection durant 24h par la souche Nd12-KD +/- ATc. Les données sont normalisées par rapport au contrôle. N=3 expériences, Student T test *** P-value <0,005.

Ce résultat coïncide avec les résultats obtenus par comptage des e-vacuoles. D'autre part, le défaut de sécrétion des rhoptries semble moindre que le défaut d'invasion. Les expériences d'invasion devront être répétées pour conclure plus précisément. Aussi, nous ignorons à ce jour si l'étape de l'attachement, qui précède la sécrétion des rhoptries et succède à celle des micronèmes, est affectée, et si elle peut être la cause initiale du défaut d'invasion et de sécrétion des rhoptries.

8. Nd11 et Nd12 interagissent entre elles et avec deux autres protéines

Pour mieux comprendre la fonction de Nd11 et Nd12, nous avons cherché des partenaires potentiels. Pour cela, nous avons utilisé les souches taguées HA3 pour réaliser des immuno-précipitations (IP) de lysats de parasites, avec des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-HA. Les éluions de ces IP ont été transmises à la plateforme de

spectrométrie de masse du Pôle Protéome de Montpellier. Les IP utilisées pour la spectrométrie de masse ont été réalisées par le Dr. Diana Marcela Penarete Vargas.

Dans les deux IPs, le plus grand nombre de peptides retrouvés correspond aux protéines Nd11 et Nd12. Ceci suggère une interaction entre ces deux protéines. Egalement dans les deux IPs, on retrouve en 3^{ème} position une protéine annotée comme protéine de micronème, MIC15, encodée par le gène *TgME49_247195*. Cette protéine possède un domaine thrombospondine-like comme MIC1 et MIC2 pouvant la lier à une fonction d'attachement. L'équipe de Furio Spano (Université de Rome, Italie) a annoté cette protéine comme une protéine de micronèmes, mais après discussion avec lui, il s'avère que sa localisation dans les micronèmes n'est pas claire. En revanche la caractérisation phénotypique du mutant KD lui a permis de montrer qu'elle était essentielle à l'invasion et également probablement la sécrétion des rhoptries. D'autres protéines sont retrouvées significativement enrichies dont celle encodée par le gène *TgME49_277910*, qui contient également un domaine thrombospondine-like.

En parallèle, nous avons reçu des données de protéomique spatiale de l'équipe de Ross Waller (Cambridge), qui indiquaient une localisation commune pour Nd11, Nd12, *TgME49_247195* et *TgME49_277910*. Ces 4 protéines possèdent un profil commun et unique, les attribuant dans un compartiment d'une densité comparable à celle des micronèmes. Ceci confortait donc l'idée d'un potentiel complexe protéique.

Pour confirmer ces données, nous avons généré une souche double taguée Nd11 et Nd12 en ajoutant un tag TY3 après le premier TM de Nd12 dans la souche KD-Nd11 (Nd11-HA3-Nd12-TY3). Diana Penarete et Jason Delabre ont également tagué la protéine *TgME49_277910* avec un tag HA3 dans la souche $\Delta ku80$ et la souche exprimant *TgME49_277910*-HA3 nous avons réalisé une seconde transfection pour obtenir le même tag TY accolé à Nd12 en N-terminal. L'équipe de Furio Spano nous a fourni deux anticorps de lapin anti-*TgME49_247195*, l'un reconnaissant l'extrémité N-terminale et l'autre l'extrémité C-terminale. Nous avons donc pu réaliser des co-immunoprécipitations grâce à des billes anti-HA3, montrant lors de la capture de Nd11 un enrichissement en Nd12 et en *TgME49_247195* (Figure 42a). Ce résultat est contrôlé grâce à un anticorps anti-*RON4*, ce qui nous permet de voir que le résultat d'enrichissement est spécifique car nous ne n'enrichissons pas la protéine *RON4* après IP (Figure 42b). D'autre part Diana Penarete a réalisé la co-IP avec la souche *TgME49_277910*-HA3/ TY3- Nd12 et a montré un

enrichissement en Nd12 lors de la capture de TgME49_277910 (non montré). Ces résultats confirment l'interaction entre ces 4 protéines et permettent de proposer l'hypothèse d'un complexe.

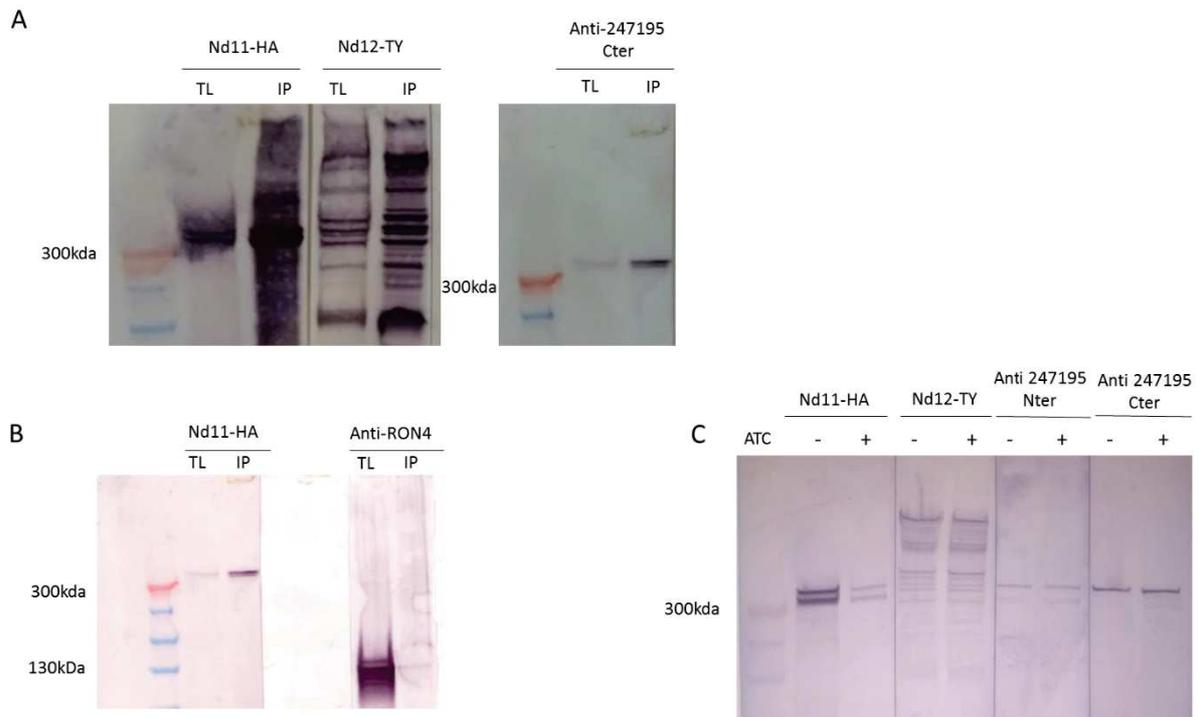


Figure 42. Co-immunoprécipitation. A. Co-immunoprécipitation anti-HA de lysat de tachyzoïte de la souche double taguée Ty3-Nd12_Nd11_HA3. Révélation du WB avec anti-HA de rat, anti-TY de souris et anti-247195 de lapin. Ac secondaires couplés à la phosphatase alcaline. TL : Lysat total IP : élution **B.** Co-immunoprécipitation anti-HA de lysat de tachyzoïte de la souche double taguée Nd11_HA3-Nd12_TY3. Révélation du WB avec anti-HA de rat et anti-RON4 de lapin. Ac secondaires couplés à la phosphatase alcaline. TL : Lysat total IP : élution **C.** WB de lysat de tachyzoïte de la souche Ty3-Nd12_Nd11_HA3 traitée ou non en ATc 48h. Anticorps primaire anti-HA de rat, anti Ty de souris et anti 247195 N-ter/C-ter de lapin. Ac secondaire couplés à la phosphatase alcaline. Marqueur de taille : spectra high range protein ladder.

Après avoir confirmé leur interaction (Figure 42a), nous avons également voulu savoir si l'absence de Nd11 pouvait affecter Nd12, et si l'impossibilité d'interagir avec Nd11 pouvait induire la dégradation de Nd12. Nous avons donc effectué en WB anti Nd11 en traitant avec ATc durant 48h les parasites avant l'expérience (déplétion de Nd11). Nous observons que Nd11 est bien sous-exprimée, mais les bandes correspondant à Nd12 et TgME49_247195 sont de même intensité dans les deux conditions avec ou sans ATc, suggérant que la diminution de Nd11 n'induit pas la dégradation de ces protéines (Figure 42c).

9. Nd11 peut-elle lier la cellule hôte ?

Les domaines protéiques prédits pour Nd11, décrit en première partie de ce chapitre de résultats, montrent une potentielle capacité à interagir avec d'autres protéines (Kringle, EGF), mais également à lier des sucres (MAR). Nous n'avons pas à ce jour réussi à déterminer

la topologie de Nd11, mais nous faisons l'hypothèse que ces protéines sont sécrétées et il est possible que ces domaines soient exposés à la surface.

Pour caractériser ce domaine, nous avons décidé de réaliser en collaboration avec le Dr Laure Yatime des protéines recombinantes des domaines MAR et Kringle. Le Dr Laure Yatime a pu obtenir une protéine contenant le domaine MAR uniquement en l'exprimant chez *E.coli* en fusion avec un tag Histidine.

Nous avons incubé des cellules HFF durant 1h à 37 degrés avec 5µg de protéine dans le milieu de culture, puis nous avons infecté ces cellules durant 5min à 37degrés avec 5×10^6 tachyzoïtes WT extracellulaires, dans le but d'observer si la protéine recombinante pouvait se fixer aux cellules hôtes et impacter l'invasion en concurrençant Nd11 du parasite. Nous observons que le pourcentage de parasite intracellulaire est inchangé par l'incubation avec la protéine recombinante (Figure 43).

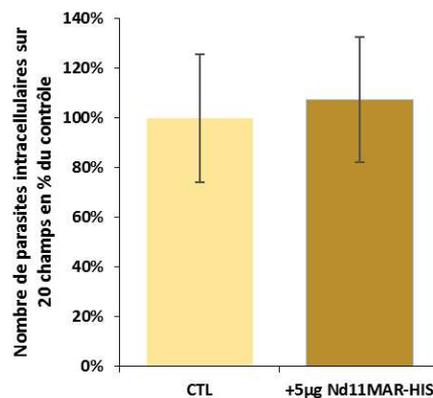


Figure 43. Nombre de parasites intracellulaires après incubation ou non avec 5µg de protéine recombinante Nd11MAR-HIS. Le nombre de parasite intracellulaire sur 20 champs est normalisé en pourcentage du contrôle. Pourcentage d'invasion d'une souche WT pré incubée ou non avec 5µg de protéine recombinante Nd11-MAR-His. Erreur : SD. Une expérience préliminaire.

D'autre part, pour des expériences préliminaires, nous avons incubé des cellules HFF avec différentes concentrations de cette protéine recombinante durant 1h à 37 degrés puis après lavage nous avons chargé sur gel d'acrylamide les cellules décollées mécaniquement de la surface du puits. Nous avons ensuite réalisé un WB avec un anticorps anti histidine. Nous n'observons pas de bande correspondant à la protéine recombinante (25kDa), ce qui signifie que la protéine ne s'est pas fixée au tapis cellulaire (données non montrées). Les investigations sont à ce jour toujours en cours.

10. Quel peut-être le rôle des phosphorylations de Nd12 ?

Les données de phosphoprotéomique disponibles sur le site ToxoDb indiquent la présence de phosphorylations au niveau C-terminal de Nd11 et Nd12. Pour Nd12, il s'agit de 19 sérines et 2 thréonines situées entre les acides aminés 7348 et 7559.

Ces phosphorylations pourraient être impliquées dans la fonction de ces protéines en permettant un changement de conformation ou bien une transduction de signal. Nous avons décidé d'étudier d'abord Nd12 dans cette partie du projet, car selon les données disponibles, elle posséderait un nombre plus important de ces phosphorylations (20 sérines et 1 thréonine phosphorylées). Nous avons souhaité muter ces sérines en alanine pour obtenir un mutant « phosphoablatif ». Pour ceci, nous avons remplacé la portion contenant les sérines phosphorylées par une portion recodonisée où tous les acides aminés sont identiques sauf la sérine. Nous avons réalisé ceci à l'aide d'une portion d'ADN synthétique contenant des régions d'homologie, la portion recodonisée et un tag HA3 et de deux ARNg (Figure 44a). Les parasites mutants ont été triés au FACS grâce à la Cas9-GFP. En parallèle, nous avons réalisé la même transfection avec un ADN synthétique contenant la portion recodonisée « WT » qui servira de contrôle.

Les mutants, nommés *Nd12recodWT* et *Nd12recodPA* ont été obtenus après de multiples transfections sans doute à cause de la difficulté d'intégrer la grosse portion d'ADN recodonisée *in situ* (Figure 44b). Mais le fait d'avoir obtenu un mutant exprimant Nd12 sans sérines viable en conditions normales de culture nous indique que celles-ci ne sont pas essentielles. Nous avons ensuite infecté des cellules HFF durant 7 jours avec les parasites mutants Nd-12WT et Nd12-phosphoablatifs obtenus dans le but de mesurer les plages de lyse (Figure 44c). Nous n'observons pas de différence dans la taille des plages de lyse, ce qui indique que la présence des sérines n'est pas essentielle et que leur absence n'impacte apparemment pas la fonction de Nd12.

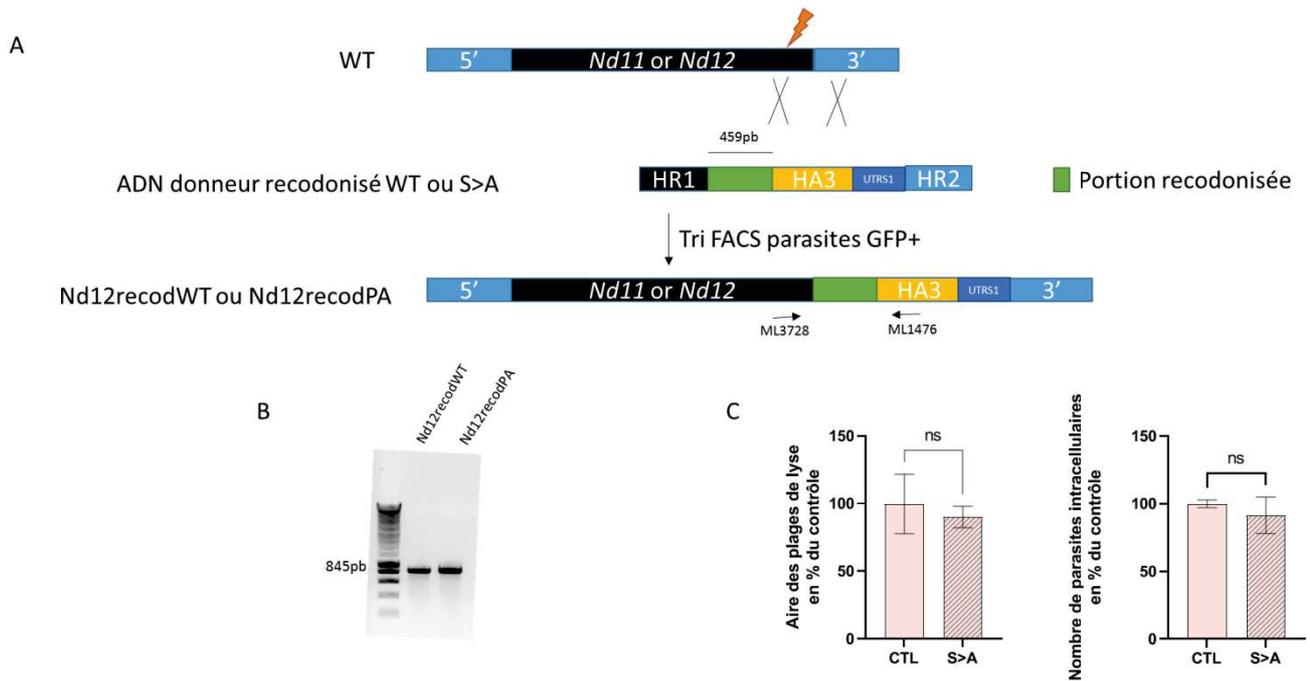


Figure 44. La présence des sérines en C-terminal de Nd12 n'est pas essentielle. **A.** Stratégie de mutation des sérines phosphorylées **B.** PCR de validation des clones **C.** Aire des plages de lyse après 7 jours d'infection par le mutant Nd12 recodifié WT ou Phosphoablatif et Nombre de parasites intracellulaires sur 20 champs après 5min d'invasion par les deux types de mutants. Erreur : SD. Une expérience préliminaire.

D'autre part, nous observons dans le cadre d'expériences préliminaires le comportement durant l'invasion de ces mutants. En effet, un faible phénotype d'invasion peut rester non visible lors de la mesure des plages de lyses, l'expérience durant 7 jours et permettant à un léger défaut d'être compensé sur la durée. Nous concluons à l'absence de défaut d'invasion ce qui semble confirmer l'absence d'impact de la modification des sérines en C-terminal de Nd12 sur le cycle lytique.

Nous n'avons donc à ce jour pas pu déterminer la fonction de Nd11 et Nd12 qui semble liée à la sécrétion des rhoptries. En ce sens, nous tentons également d'observer si l'attachement est affecté en l'absence de Nd11 et Nd12, ce qui précisera encore l'étape à laquelle Nd11 et Nd12 sont essentielles.

RÉSULTATS – DEUXIÈME PARTIE

INTRODUCTION

Dans cette seconde partie, je décrirais le second projet sur lequel j'ai pu travailler, en collaboration avec l'équipe du Dr Laura Knoll (Université du Wisconsin).

Comme décrit précédemment, la sécrétion des rhoptries et ces effecteurs est un sujet majeur de la recherche actuelle sur *T. gondii*. De nouvelles techniques de criblage, comme celle utilisée dans notre premier projet, sont nécessaires à la résolution de cette question.

Une technique d'identification de nouveaux gènes essentiels est le criblage à haut débit d'un très grand nombre de mutants par la technique de la signature-tagged-mutagenesis (STM). Cette technique consiste en l'insertion d'un transposon unique, appelé « tag », dans le génome d'un micro-organisme, pour générer un grand nombre de mutants. Ces mutants sont ensuite regroupés et sont utilisés pour infecter, par exemple une souris, et le groupe de mutant post infection est récupéré. En utilisant des sondes PCR, générées à partir des groupes de mutants pré et post infection grâce au tag, sur des colonies pures de chaque mutant utilisé pour l'infection initiale, il est possible de savoir quel mutant n'a pas survécu à l'infection, et est donc altéré par la mutation au niveau d'un gène potentiellement impliqué dans la virulence (Hensel et al., 1995; Nelson et al., 2001).

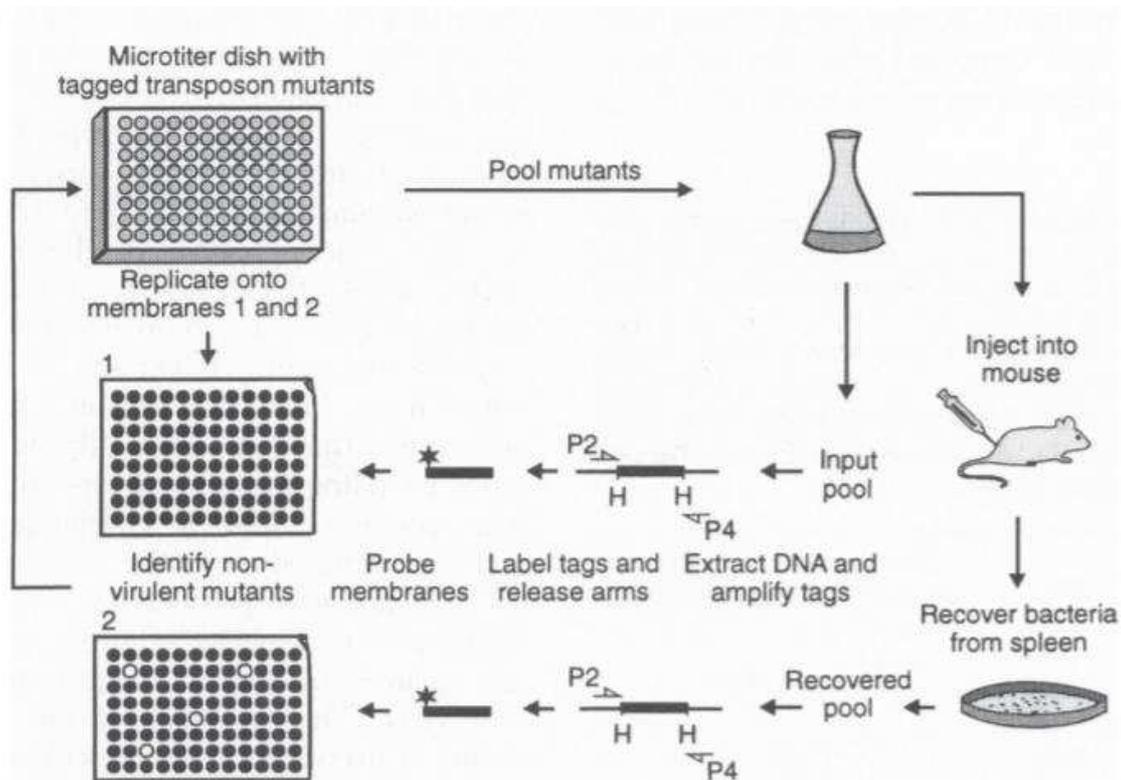


Figure 45. Schéma de la technique Signature tagged mutagenesis. (Hensel & Holden, 1996).

Cette technique a été adaptée à *T. gondii* dans un premier temps pour découvrir des mutations conférant des résistances à la drogue FUDR *in vitro* (L. J. Knoll et al., 2001), et utilisée par la suite sur une banque de données de 6300 mutants pour une infection *in vivo* (Frankel et al., 2007). Cette étude a permis l'identification de nombreux gènes potentiellement impliqués dans la virulence.

L'équipe du Dr Laura Knoll, de l'université du Wisconsin, a découvert qu'une des mutations en question était une insertion dans le gène *TgME49_305140*. Ce gène est prédit comme codant pour une enzyme de type patatine. Les patatines sont des phospholipases (PL, patatin-like phospholipases) tirant leur nom de leur découverte et de leur rôle dans le stockage de nutriments de la pomme de terre. Ces phospholipases ont été décrites dans d'autres organismes comme étant liées au métabolisme des lipides entre-autre mais également étant des facteurs de virulence chez les bactéries (Wilson & Knoll, 2018).

Chez *T. gondii*, deux PL ont été décrites et ont des rôles distincts. PL1 est essentielle à la survie intracellulaire du parasite dans les macrophages (Mordue et al., 2007) et localise à la PVM (Mordue et al., 2007; Tobin & Knoll, 2012) ainsi qu'à la paroi des kystes contenant des bradyzoïtes. PL2 localise à l'apicoplaste et est impliquée dans le maintien de l'homéostasie des lipides en empêchant l'accumulation de ceux-ci aux membranes (Lévêque et al., 2017). PL2 est également essentielle à la survie du parasite car son absence altère le métabolisme.

Ces deux PL possèdent donc deux fonctions et localisations différentes. Le gène identifié précédemment, *TgME49_305140*, étant prédit comme codant une troisième PL, l'équipe du Dr Knoll l'a nommée PL3. Au début de ce travail, il n'était pas fait de prédiction de localisation pour cette enzyme. Mais les prédictions d'un domaine de liaison aux microtubules permettaient d'émettre l'hypothèse d'une implication dans le cycle lytique. La modification des phospholipides membranaires étant une étape clef manquante à la compréhension des mécanismes d'exocytose des rhoptries (introduction, chapitre IV). L'équipe a d'abord démontré, entre-autre, l'implication de PL3 dans l'invasion, puis nous avons entrepris cette collaboration.

Ce projet a pour objectif de décrire le phénotype du mutant PL3, qui d'après les premiers résultats de STM est affecté dans sa virulence.

Au sein de cette collaboration, mon travail s'est concentré sur l'impact de PL3 sur la motilité glissante, la sécrétion des rhoptries et des micronèmes. C'est donc sur ces aspects de notre travail concernant la protéine PL3 que cette sous partie portera. Les résultats complets seront eux présentés en annexe à la fin de ce chapitre sous la forme d'un article, publié en Juillet 2020 dans la revue Plos Pathogens.

RÉSULTATS

1. L'absence de PL3 induit un défaut de capacité invasive

Nos collaborateurs, après avoir identifié et localisé la protéine PL3 au pôle apical et décrit sa liaison aux microtubules (Cf. annexe), ont pu prouver son implication dans les événements d'invasion. Pour ceci, ils ont généré une lignée KO en excisant le gène *TgPL3* et ainsi obtenus la souche $\Delta TgPL3$. Par la suite, ces parasites $\Delta TgPL3$ ont été complémentés en réinsérant une copie du gène au locus endogène. En parallèle, une lignée dite S1409A a été générée, en complétant avec une version mutée du gène *PL3* au locus endogène dans la lignée $\Delta TgPL3$. Cette version possède une mutation remplaçant la sérine 1409, au sein du site prédit comme étant le site conférant l'activité PLP à PL3, par une alanine (Cf. annexe).

Pour comprendre le rôle de PL3, nos collaborateurs ont dans un premier temps observé la capacité répllicative des parasites et n'ont pas observé de défaut entre les contrôles et les mutants (Cf. annexe). En revanche, lors des expériences d'invasion, réalisées dans un premier temps en mettant des parasites en contact avec les cellules durant 3h ont mis en évidence un défaut d'invasion des mutants $\Delta TgPL3$ ou S1409A de l'ordre de 20 à 25% par rapport au contrôle. Dans un second temps, ce protocole a été modifié et les parasites sont laissés en contact avec les cellules HFF durant 15min (Cf. annexe).

PL3 est donc impliquée dans l'invasion. Comme expliqué en première partie, les événements d'invasion sont liés à la capacité des parasites à adhérer aux cellules, via la sécrétion des micronèmes, et à la sécrétion des rhoptries qui s'ensuit. Nos collaborateurs, pour identifier le lien de PL3 avec l'une ou l'autre de ces étapes, nous ont confié ces investigations.

2. L'absence de la protéine PL3 n'a pas d'effet sur la capacité à sécréter les micronèmes, sur la motilité et sur la sortie induite

Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer que PL3 était uniquement impliquée dans l'invasion au cours du cycle lytique, et donc avons observé le phénotype des lignées mutantes lors d'expériences de sortie induite.

Nous observons que les parasites $\Delta TgPL3$ ou exprimant une version mutée inactive de la protéine ont la même capacité à sortir des cellules que les parasites contrôles après

traitement au calcium ionophore à 30 heures post-infection (Figure 46A, Annexe figure S6). PL3 ne semble donc pas impliquée dans ces événements de sortie. De plus, nous avons testé la capacité motile de ces parasites extracellulaires, en observant les traînées de protéines SAG1 déposées sur des lamelles recouvertes de poly-L-Lysine (figure 46B). En l'absence de PL3 ou de PL3 fonctionnelle, les parasites ont la même capacité à se déplacer sur le substrat que des parasites contrôles car aucun défaut n'est observé au niveau des traînées.

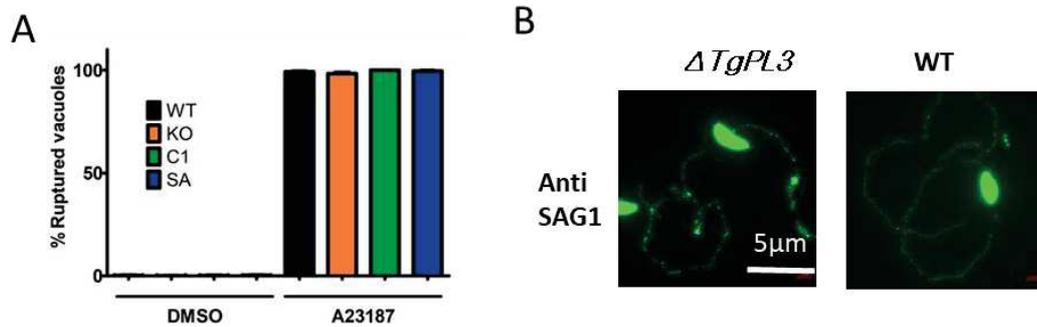


Figure 46. Sortie induite et Motilité glissante. **A.** Nombre de vacuoles lysées après induction de la sortie au Ca²⁺ ionophore ou traitement contrôle au DMSO, en pourcentage du contrôle. Induction 30h post infection de cellules HFF par des parasites de la souche sauvage, $\Delta TgPL3$, $\Delta TgPL3$, complétement ou S1409A. n=3 exp. **B.** Trainées de protéines SAG1 par des parasites $\Delta TgPL3$ ou contrôles, incubés sur lame recouverte de poly-L-Lysine durant 20min à 37°C. IFA avec Anticorps anti-Sag1 de souris.

Sachant que nous n'observons pas de défaut de sortie et de motilité, nous avons souhaité contrôler la capacité de ces mutants à sécréter les protéines de micronèmes en l'absence de PL3.

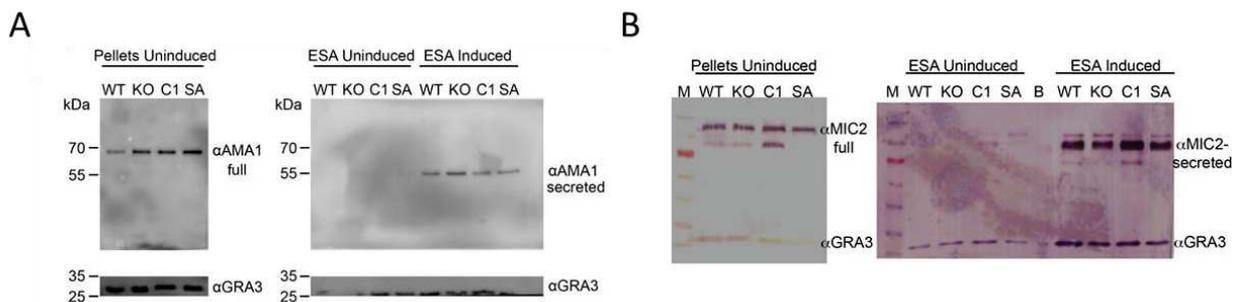


Figure 47. Analyse de la sécrétion des protéines de micronèmes du contrôle sauvage, des parasites $\Delta TgPL3$, complétés ou S1409A 50 millions de tachyzoïtes extracellulaires sont utilisés pour chaque condition, les parasites sont incubés 20min à 37 degrés pour permettre la sécrétion. NI : non induit (+DMSO), I : induit (+propranolol). ESA : Excretory secretory Antigens (surnageant). Les échantillons sont resuspendus en PBS + Tampon Laemmli+ DTT. Révélation WB avec anticorps de lapin anti-AMA1 et anti IgG de lapin-HRP, anti-GRA3 de souris et anti-IgG de souris-PhosphataseAlcaline. **B.** Révélation WB avec anticorps de lapin anti-MIC2 et anti IgG de lapin-phosphatase alcaline, anti-GRA3 de souris et anti-IgG de souris-PhosphataseAlcaline. Marqueur de taille : Page Ruler.

En incubant 50 millions de parasites extracellulaires avec du propranolol, nous avons observé que la quantité de protéine AMA1 ou MIC2 dans sa forme mature (clivée) dans le surnageant était équivalente dans le cas des parasites mutants ou WT, ceci étant visible de

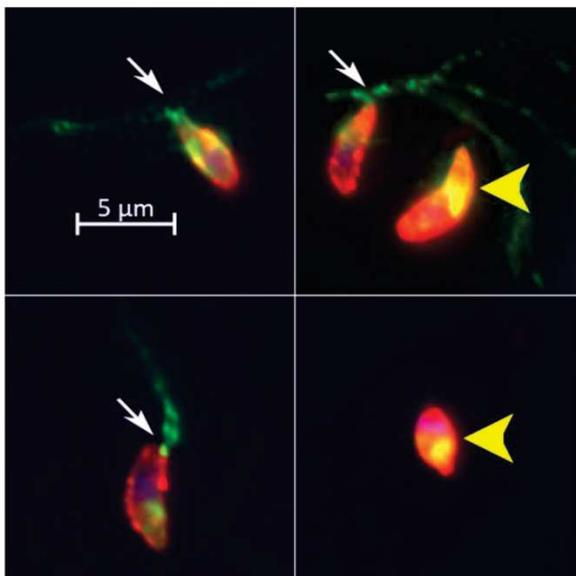
par la présence sur le westernblot d'une bande d'intensité équivalente dans les différentes pistes à une masse moléculaire correspondant à AMA1 ou MIC2 mature (Annexe figure S6). En l'absence d'induction, MIC2 ou AMA1 ne sont pas sécrétées car nous n'observons pas de bande correspondant à AMA1 ou MIC2 mature ou immature dans les pistes des surnageants, tandis que dans les culots correspondant, AMA1 et MIC2 sont visibles à une masse moléculaire correspondant à leur forme non-clivée donc immature. Nous observons également que le contrôle correspondant à la visualisation de la protéine GRA3 constitutivement sécrétée est validé, GRA3 étant visible à une bande de même intensité et de masse moléculaire attendue dans les différentes pistes correspondant aux surnageants des conditions induites ou non induites (Annexe figure S6). Nous avons donc pu conclure à l'absence d'effet de l'absence ou la mutation de la protéine PL3 dans les mécanismes de sécrétion des micronèmes. D'autre part, nos collaborateurs ont contrôlé la capacité des parasites déficients en PL3 à adhérer au tapis cellulaire, et n'ont pas observé de défaut. De plus, comme vu précédemment, l'adhésion des parasites aux cellules dépend des protéines de micronèmes, nos résultats suggèrent donc que PL3 n'a pas de rôle à cette étape.

3. L'absence de la protéine PL3 induit un défaut de sécrétion des rhoptries

Il reste donc possible que la protéine PL3 intervienne dans des mécanismes donnant lieu à la sécrétion des rhoptries, et donc postérieurs à la sécrétion des micronèmes et à l'adhésion.

Pour tester cette hypothèse, nous avons choisi d'utiliser la technique des e-vacuoles comme décrite précédemment.

A



B

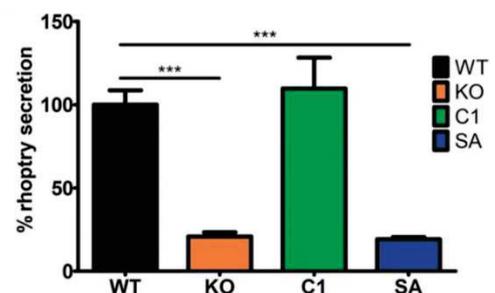


Figure 48. A. Images de Microscopie indirecte à fluorescence représentatives des évacuoles. Flèche jaune : parasite n'ayant pas sécrété ses rhoptries. Flèche blanche : parasite et évacuoles. **B.** Quantification des e-vacuoles sécrétées sur 20 champs après infection durant 20 min par la souche contrôle WT, la souche complémentée, S1409A ou la souche $\Delta TgPL3$. Les parasites sont traités en cytochalasine D. Student T Test. *** P-value <0,005

Dans le cadre de ces expériences, nous avons laissé les parasites en contact avec les cellules durant 15min. Après comptage du nombre d'e-vacuoles marquées par un anticorps dirigé contre la protéine de rhoptrie ROP1, nous observons un défaut de sécrétion des parasites S1409A ou $\Delta TgPL3$ de l'ordre de 80% du contrôle (Figure 48B, annexe figure 5C). Il semble donc que la protéine PL3 soit impliquée dans la sécrétion des rhoptries ou dans des événements donnant lieu à cette sécrétion. En revanche, le défaut de sécrétion observé semblait disproportionné par rapport au défaut d'invasion observé de 20 à 25% par rapport au contrôle.

En effet, la sécrétion des rhoptries est un événement non dissociable et indispensable à la réalisation d'une invasion efficace par le tachyzoïte. Il est donc difficile de corréler un défaut de sécrétion de 80% avec un défaut d'invasion 4 fois moins important. Ce projet étant mené en collaboration, le biais lié à l'expérimentateur existe, et d'autre part, nous avons observé une large différence de protocole entre nos laboratoires. Les tests d'invasion de nos collaborateurs étant menés sur des temps de contact de 3 à 4h, tandis que les tests de sécrétion de notre laboratoire ont été effectués sur des temps de 15min.

Nous avons donc émis l'hypothèse d'un défaut de sécrétion et d'invasion qui serait compensé par la durée. Pour tester cette hypothèse, nous avons implanté le système SeCreEt dans les souches complémentées avec la version mutée et avec la version sauvage. Ce système nous permet en effet de tester la capacité à sécréter les rhoptries sans traiter les parasites en cytochalasine D et donc de les laisser au contact des cellules plus longtemps sans craindre de mort cellulaire. Nous avons fait le choix de tester deux temps d'incubation des parasites avec les cellules *DsRed* de 1h ou 6h avant lavages. Les cellules ne pouvant être centrifugées étant donné la fragilité de la monocouche, il est difficile de diminuer le temps d'incubation sous 1h, nécessaire à la sédimentation des parasites et donc leur contact avec les cellules *DsRed*.

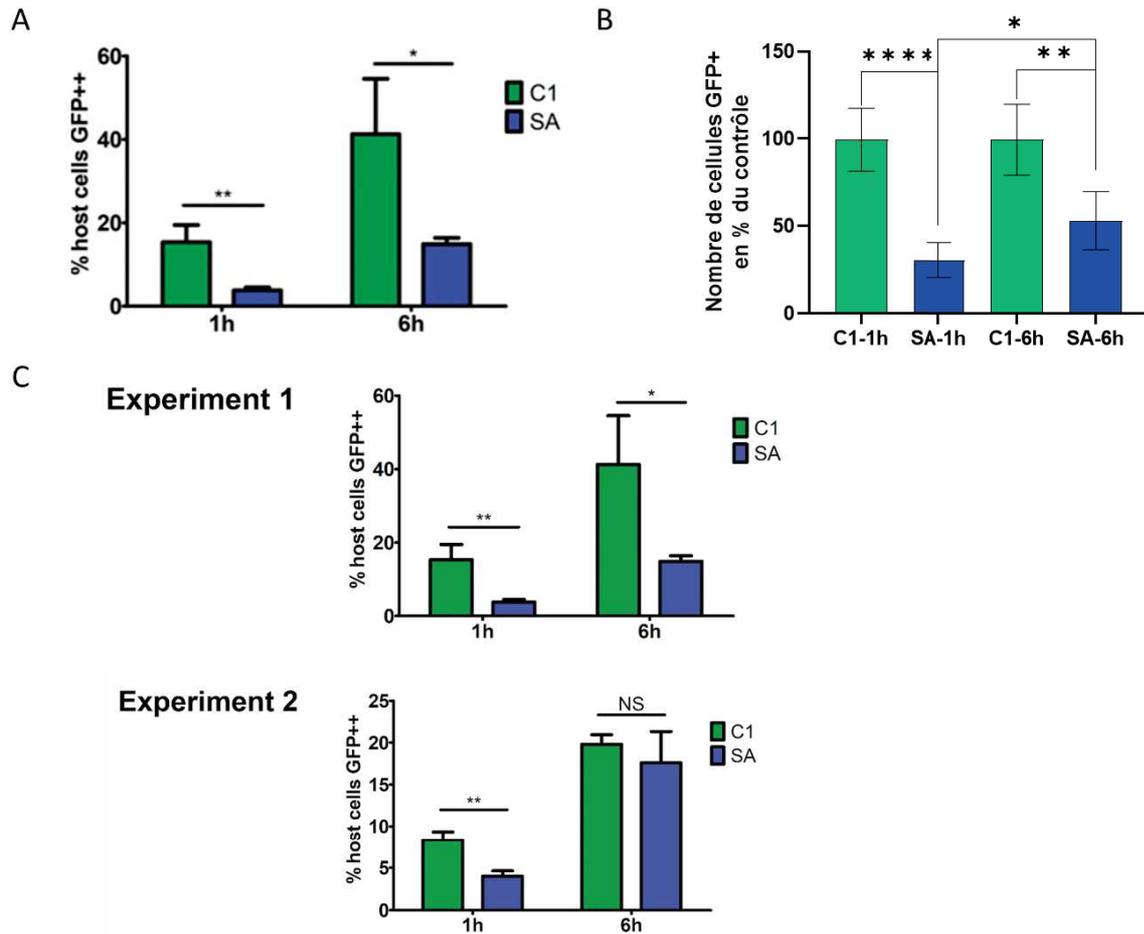


Figure 49. Pourcentage de cellules GFP+ après 1h ou 6h d'incubation avec les parasites S1409A-SeCreEt ou Compl-SeCreEt. **A.** Quantification du pourcentage de cellules DsRed exprimant la GFP après infection durant 1h ou 6h par la souche contrôle Compl-SeCreEt et la souche S1409A-SeCreEt. N= 3 expériences indépendantes, Student T test *** P-value <0,005. **B.** Quantification du pourcentage de cellules DsRed exprimant la GFP après infection durant 1h ou 6h par la souche contrôle Compl-SeCreEt et la souche S1409A-SeCreEt, valeurs exprimées en pourcentage du contrôle. N= 3 expériences indépendantes, Student T test *** P-value <0,005. **C.** Détail des données de deux expériences de quantification du pourcentage de cellules DsRed exprimant la GFP après infection durant 1h ou 6h par la souche contrôle Compl-SeCreEt et la souche S1409A-SeCreEt. (Supplément S10 S11 annexe)

Nous observons qu'après 1h d'incubation, environ 20% des cellules DsRed sont GFP positives dans le cas des parasites complémentés « contrôles » tandis que seulement 5% le sont dans le cas de parasites exprimant une PL3 inactive (S1409A) (figure 49A). En pourcentage du contrôle, le défaut est de l'ordre de 55 % (figure 49B). Dans le cas d'une incubation des parasites avec les cellules durant 6h, on observe que 40% des cellules sont GFP positive dans le cas des parasites contrôles et 20% dans le cas des parasites S1409A (figure 49A). En pourcentage du contrôle, le défaut est donc de l'ordre de 40% (figure 49B) et la différence entre le contrôle et le mutant est moins significative. Nous pouvons donc conclure que l'absence de la protéine PL3 fonctionnelle induit un défaut de sécrétion des rhoptries qui pourrait être compensé dans le temps et que nous pouvons qualifier de retard.

CONCLUSION ET DISCUSSION

En conclusion, nous avons donc identifié de nouvelles protéines impliquées dans l'invasion et dont l'absence ou la diminution d'expression affecte la sécrétion des rhoptries.

Première partie

Nd11 et Nd12, deux nouvelles protéines de très grandes tailles, ont pu être localisées dans le cytoplasme du parasite et nous avons montré leurs interactions entre elles mais aussi avec deux autres protéines (TgME49_277910 et TgME49_247195) également liées à l'invasion. TgME49_247195 a été caractérisée dans le laboratoire de Furio Spano à Rome, et l'équipe a pu observer que son absence impactait l'invasion et sans doute la sécrétion des rhoptries (Communication personnelle du Dr Furio Spano). Par ailleurs, Diana Penarete et Jason Delabre au laboratoire ont démontré que la protéine TgME49_277919 était impliquée dans l'invasion. Le mutant KD pour cette protéine ne présente pas de défaut de motilité, dans la sortie des cellules et dans l'attachement aux cellules hôtes suggérant donc un rôle dans la sécrétion des rhoptries en elle-même. Nous avons obtenu des mutants pour l'expression conditionnelle de Nd11 et Nd12 et avons pu démontrer que la diminution d'expression de l'une et l'autre individuellement empêchait les tachyzoïtes d'envahir mais n'affectait pas les autres étapes du cycle lytique analysées séparément. Nous avons pu montrer que la sécrétion des micronèmes demeurait intacte en l'absence de Nd11 et Nd12 mais que les parasites étaient dans l'incapacité à sécréter le contenu de leurs rhoptries. Pour comprendre si ce défaut est lié à l'étape de sécrétion, ou en amont lors de l'attachement des parasites à la cellule hôte, il est nécessaire d'effectuer de nouvelles analyses notamment identifier le pourcentage de parasites qui adhèrent à un tapis de cellules HFF fixées. Nous n'avons pas observé de liaison aux cellules du domaine MAR de Nd11 prédit comme domaine d'interaction avec les sucres. De ce fait, nous n'avons pas d'argument nous permettant de dire que Nd11 lie les cellules hôtes. De plus, nous n'avons pas pu identifier le rôle des sérines phosphorylées en C-terminal de Nd12. Enfin, nos tentatives pour identifier la typologie de ces protéines, la façon dont elles sont insérées dans les membranes, n'ont à ce jour pas données de réponses claires. En conclusion, nous ne sommes malheureusement pas capables à ce jour de préciser la fonction de Nd11 et Nd12 au sein du mécanisme d'invasion et de sécrétion des rhoptries. Ce sont les différentes hypothèses et questions à ce sujet qui seront détaillées dans cette partie.

La localisation de Nd11 et Nd12 est difficile à préciser

La localisation de Nd11 et Nd12 est à la fois cytosolique mais sous forme de puncta. De plus, nous observons parfois un gradient d'accumulation en direction du pôle apical. Cette localisation étonnante nous a amené à comparer avec celle des protéines de micronèmes qui montrent, elles, un gradient apical clair. Nd11 et Nd12 ne colocalisent pas particulièrement, avec les protéines de micronème, suggérant qu'elles ne sont pas assimilées à ces organelles. Nous avons tenté par microscopie à super résolution SIM/STED de préciser cette localisation et d'identifier si ce gradient apical était réel. Cette technique ne nous a pas permis de définir une localisation précise de Nd11 et Nd12. D'autre part, de nouvelles analyses en microscopie réalisées par Daniela Sparvoli montrent que l'accumulation apicale n'est pas observable sur la majorité des parasites intracellulaires. A ce jour, nous considérons donc que Nd11 et Nd12 sont des protéines localisées dans le cytoplasme, et leur signal punctiforme et les nombreux domaines transmembranaires indiquent qu'elles puissent potentiellement être associées à des vésicules réparties dans le parasite.

Le mutant Nd12 possède un phénotype important avant traitement ATc

Lors du changement de promoteur de Nd12 pour un promoteur inducible, nous observons que même sans traitement ATc, donc normalement dans une condition où l'expression de la protéine est maintenue, les parasites présentent un phénotype important observé lors de la mesure des plages de lyse, de l'invasion, et de la sécrétion des rhoptries. La protéine étant à peine détectable en IFA, sa localisation n'a pas été possible.

Il existe plusieurs explications possibles à ceci. Il est courant d'observer que le changement de promoteur pour un promoteur Sag1/4 puisse avoir un effet sur l'expression de gènes, notamment lorsque ceux-ci sont exprimés différemment au cours des différentes étapes du cycle (Guérin, Corrales, et al., 2017; M. H. Lamarque et al., 2014). Mais ici, les données disponibles indiquent que Nd12 est exprimée de façon constante au cours du cycle. Il est également possible qu'une erreur d'annotation du codon START en soit à l'origine, surtout quand on considère la grande taille du gène *Nd12*. Nous avons donc peut-être placé le promoteur trop en amont, ou trop en aval, ce qui ne permettrait pas l'expression correcte du gène.

Pourquoi le phénotype d'invasion est-il plus drastique que le phénotype de sécrétion des rhoptries ?

Le défaut d'invasion en l'absence de Nd11 et Nd12 est d'environ 90 à 98% du contrôle, ce qui est quasi-total. En revanche, la capacité à sécréter les rhoptries est de l'ordre de 20% de celle des souches contrôles. Comment expliquer cette différence ?

On pourrait en effet s'attendre à une diminution du même ordre. Cette différence pourrait être due à la présence de sécrétions qui ne donnent pas lieu à des événements d'invasion productifs. Il est connu que les tachyzoïtes peuvent sécréter le contenu de leur rhoptries dans plusieurs cellules avant d'envahir (Koshy et al., 2012). De plus, il est possible que certaines sécrétions soient incomplètes, et ainsi ne pas permettre aux parasites d'envahir ou de former correctement la jonction mobile.

Peut-on vraiment faire une analogie entre Nd11 Nd12 et les aGPCR ?

Les protéines Nd11 et Nd12 et leurs homologues chez *Tetrahymena* possèdent plusieurs domaines et caractéristiques qui rappellent les protéines de type GPCR. Parmi celles-ci, on retrouve la présence des zones riches en cystéines, des domaines EGF et Kringle, les nombreux domaines transmembranaires mais aussi le domaine lectine, ici domaine MAR, qui fait partie des domaines dits « d'adhésion ». On peut en revanche se demander si une analogie est réellement possible entre la structure de Nd11 et Nd12 et les GPCR pour les raisons suivantes :

1. D'une part, l'analyse des séquences de Nd11 et Nd12 contrairement à celles des protéines de *Tetrahymena* ne permet pas de définir le domaine GPS. Hors le domaine GPS des GPCR fait partie d'un domaine de plus de 300 résidus appelé le GPCR-Autoproteolysis INducing (GAIN) domain qui permet à lui seul l'autoprotéolyse du GPCR et qui est impliqué dans la fonction même du GPCR (Araç et al., 2012). Sans ce domaine, il est possible que même si Nd11 et Nd12 ont divergé des GPCR, elles aient perdu la capacité à transmettre un signal.

2. Les GPCR possèdent 7 domaines transmembranaires caractéristiques. Cette structure de 7 hélices transmembranaires est extrêmement conservée au sein de la famille des GPCR même pour les récepteurs ayant le moins de similarité de séquence (Cvick et al., 2016). Les différents programmes utilisés pour prédire les hélices transmembranaires, dont TMHMM2 dont le modèle a été présenté en figure 25, prédisent en revanche pour Nd11 et Nd12 8 à 10 hélices transmembranaires sur la partie C-terminale, et environ 5 pour les

homologues chez *Tetrahymena* ce qui ne correspondrait pas à la structure attendue d'un GPCR.

3. Les GPCR sont fréquemment phosphorylés sur la partie C-terminale par des sérines/thréonine kinases de type PKA/PKC ou des GRK (second messenger-independant GPCR kinase). Cette phosphorylation induit dans un cas la séparation de la protéine G du GPCR et dans l'autre le recrutement d'arrestines qui empêchent le couplage avec la protéine G (Yang et al., 2017), et dans les deux cas cela donne lieu à la désensibilisation qui est l'arrêt de signalisation par le récepteur, en général après des stimulations répétées. Les phosphorylations font donc partie de la fonctionnalité des GPCR en régulant leur activité de transmission de signaux. Lorsque nous avons muté les sérines potentiellement phosphorylées de Nd12, nous n'avons pas observé de phénotype, ce qui n'est pas en accord avec l'importance des phosphorylations pour les GPCR classiques. Si à contrario des GPCR classiques, elles étaient impliquées dans l'activation de Nd12, nous aurions observé un phénotype semblable au KD+ATc. Il aurait été possible également, si elles sont impliquées dans le recyclage de Nd12, d'avoir une augmentation de la taille des plages de lyse exprimant une flambée du pouvoir invasif des parasites, dû à une sécrétion des rhoptries plus aisée et efficace.

Comment expliquer l'absence de phénotype lorsque l'on enlève les phosphorylations ?

Nd12 comporte dans sa partie C-terminale 21 phosphorylations (Treeck et al., 2011). Le clone a été difficile à obtenir, et nous avons dû répéter plusieurs fois la transfection. En effet, nous avons dans un premier temps tenté d'utiliser le même ARNg que pour la création de la souche Nd12_HA3, et les transfections ne permettaient pas d'obtenir de mutants. Nous avons modifié pour l'ARNg ML3811/ML3812 qui se situe dans la portion recodonisée et plus proche de la première région d'homologie, ce qui nous a permis d'obtenir un clone WT et un clone phosphoablatif. Il était surprenant de ne pas obtenir de phénotype lors de l'insertion de la séquence mutée Nd12. En mesurant les plages de lyse, nous n'observons pas de différence après mutation des sérines, et nos données préliminaires ne suggèrent pas d'effet sur l'invasion.

Nous émettons plusieurs hypothèses quant à cette absence de phénotype.

- Si Nd12 agit en tant que récepteur pour transmettre un signal en vue de la sécrétion des rhoptries, elle n'exprime sa fonction que lors de l'invasion et n'est plus indispensable une fois le parasite internalisé dans la cellule hôte. Si les

phosphorylations sont associées à une perte de fonction de Nd12, alors leur absence lui permet de rester fonctionnelle de façon permanente. Il est possible que malgré un gain de fonction de Nd12 par cette mutation, les évènements de sécrétion et d'invasion ne soient pas affectés de par la complexité de la machinerie d'exocytose et les nombreux acteurs entrant en jeu, d'autant plus si elle n'agit que tôt dans les cascades de signalisation, induisant la formation d'autres complexes qui soient eux des réels effecteurs de la fusion membranaire.

- Nd11 et Nd12 peuvent, comme expliqué précédemment, conserver des motifs des GPCR sans toutefois être effectives pour la transduction du signal. En revanche, nous savons qu'elles forment ensemble un complexe avec les deux protéines TgME49_277910 et TgME49_247195 qui possèdent des motifs thrombospondine qui sont associés à l'attachement, et non la transduction d'un signal. Il est possible que ce complexe soit acheminé en surface à un moment précis du cycle, avant ou durant l'invasion. Toutefois, la diminution de l'expression de TgME49_277910 n'induit pas une diminution de la capacité des parasites à adhérer aux cellules hôtes. On peut alors faire l'hypothèse que Nd12 (et Nd11), comme TgME49_277910, ne soient pas impliquées dans l'attachement mais la sécrétion des rhoptries. Pour évaluer cette hypothèse nous envisageons de tester la capacité d'attachement des parasites KD-Nd12 et KD-Nd11.

- Les protéines GPCR sont le plus souvent associés en hétérodimères. Nous avons montré que la perte de Nd11 n'entraîne pas la dégradation de Nd12 mais nous ignorons si l'inverse est également vrai, de plus il s'agit d'un résultat préliminaire nécessitant une confirmation. Nd11 possède également des sérines phosphorylées en C-terminal. Si ces phosphorylations sont liées à la dégradation de ces protéines, alors dans le mutant phosphoablatif, qui stabiliserait Nd12 dans un état actif, Nd11 pourrait alors être tout de même dégradée, donnant lieu à un arrêt du fonctionnement du récepteur Nd11/Nd12 semblable à ce qui se passe dans le WT. Pour tester cette hypothèse, nous pouvons effectuer dans le mutant Nd12recodPA les mêmes mutations sur le gène *Nd11* en transformant les sérines en alanine.
- A contrario des GPCR classique, les phosphorylations peuvent stabiliser Nd12 et sa fonction et non induire sa dégradation. Si tel est le cas, dans le mutant phosphoablatif la protéine Nd12 serait inactive. L'hypothèse est donc que Nd11 peut compenser cette perte de fonction. Générer un double mutant Nd11-Nd12 pour les sites de phosphorylation, ou un mutant exprimant Nd12 dans une version phosphomimétique, pourrait permettre de tester cette hypothèse.
- Nous observons lors des WB avec des anticorps anti-TY sur la souche exprimant Nd12 étiquetée en N-terminal avec un épitope TY et en C-terminal un épitope HA, des multiples bandes qui ne sont pas présentes lorsqu'on révèle le WB avec un anticorps anti-HA. Il est possible alors que Nd12 subisse en modification post-transcriptionnelle plusieurs clivages en C-terminal, et que sa fonction dans la sécrétion des rhoptries ou dans l'attachement ne soit pas liée à cette partie de la protéine. La fonction de Nd12 ne serait donc pas affectée par des modifications dans une zone clivée et dégradée avant son adressage.

La fonction de Nd11 et Nd12 peut-elle être liée à celle des autres Nd découvertes récemment chez *Toxoplasma* ?

Les travaux d'Aquilini et Cova ont permis de démontrer l'existence d'un complexe formé par les protéines Nd6, Nd9, NdP1, NdP2 et Ferlin2 via des expériences de co-IP. Nous n'avons pas pu observer lors de l'analyse des IP anti-Nd11 et anti-Nd12 d'enrichissement en l'une de ces protéines, et l'inverse est également vrai, suggérant que la fonction des deux complexes est indépendante. Si le complexe Nd6-Nd9-NdP1-NdP2 est impliqué dans la formation, l'assemblage de la rosette et de la machinerie de sécrétion, il est possible qu'il agisse en amont de Nd11 et Nd12, qui seraient plutôt des détecteurs pour le déclenchement des événements de fusion membranaire. Si Nd6-Nd9 sont plutôt des acteurs des événements de fusion, alors le complexe formé par Nd11 et Nd12 peut agir en amont, pour déclencher un signal permettant l'assemblage du deuxième complexe et la fusion des rhoptries avec la vésicule apicale. Pour répondre à cette question, il va être déterminant de pouvoir observer si la rosette est présente et correctement formée en l'absence de Nd11 et de Nd12, pour ainsi savoir si elles sont liées à l'assemblage du complexe Nd9, Nd6, NdP1 et NdP2.

Proposition de modèles pour situer Nd11 et Nd12 au sein des mécanismes de sécrétion des rhoptries

A l'issue de ce travail, nous suggérons donc que Nd11 et Nd12 ainsi que leurs partenaires soient localisées dans des vésicules cytoplasmiques. Pour les relier à la sécrétion des rhoptries, il faut donc se demander comment elles interagissent avec la machinerie connue, dont le complexe Nd6-Nd9, mais également d'autres protéines. Pour définir ce modèle, nous pouvons diviser la sécrétion des rhoptries en plusieurs étapes.

Ce processus d'exocytose nécessite pour débuter une étape de signalling, mettant en jeu vraisemblablement des protéines parasitaires et des protéines de la cellule hôte, dans une interaction de type ligand récepteur. Cette interaction permettant de transduire un signal nécessaire à l'assemblage de toute la machinerie de sécrétion et au démarrage des événements d'exocytose.

Discussion

La première étape de la sécrétion des rhoptries en elle-même est la fusion à la vésicule apicale. Le complexe Nd11 et Nd12 pourrait avoir un lien avec la protéine RASP2 (Figure 50A), liant les lipides, et potentiellement impliquée dans la fusion de ces membranes.

La seconde étape est la fusion à la membrane du parasite, dont nous ignorons à l'heure actuelle les acteurs. Il est possible que des protéines de type SNARE soient mises en jeu. Nd6 est par ailleurs potentiellement impliquée dans ces événements, postérieurs à la formation de la rosette, étant localisée à l'apex des parasites et n'étant pas nécessaire à la formation de la rosette, contrairement, par exemple, à Nd9, un de ses partenaires. De plus, il est connu que ces mécanismes sont liés à des protéines senseurs de calcium comme Ferlin2, ce qui pourrait rapprocher d'un mécanisme d'exocytose régulée

Ferlin 2 est d'ailleurs située dans le complexe Nd6-Nd9. Nd11 et Nd12 interagissent-elles directement avec ce complexe ? Sont-elles impliquées dans la formation de la rosette également ? Pour déterminer la relation de Nd11 et Nd12 avec le premier complexe (Figure 50A), il est important de savoir si la rosette est correctement formée. Si cela est le cas alors leur fonction est peut-être liée à la fusion membranaire, et si la rosette est absente, elles peuvent agir en amont dans la formation ou être elles-mêmes des composants de la rosette.

Nous suggérons que Nd11 et Nd12 soient exportées à la membrane (Figure 50B), exposant les domaines d'interaction du côté de la cellule hôte, en pouvant lier des protéines ou des sucres via les domaines MAR, lectines, et TSP1, ce qui leur permettrait de transduire un signal donnant lieu à l'exocytose. Ce signal pourrait être lié aux phosphorylations en C-terminal, ou à la déphosphorylation des queues C-terminales de Nd11 et Nd12, bien que pour l'instant nous n'ayons pas démontré leur rôle. Elles auraient donc un rôle dans l'étape précédant l'exocytose, l'étape de signaling nécessaire à l'assemblage de la machinerie.

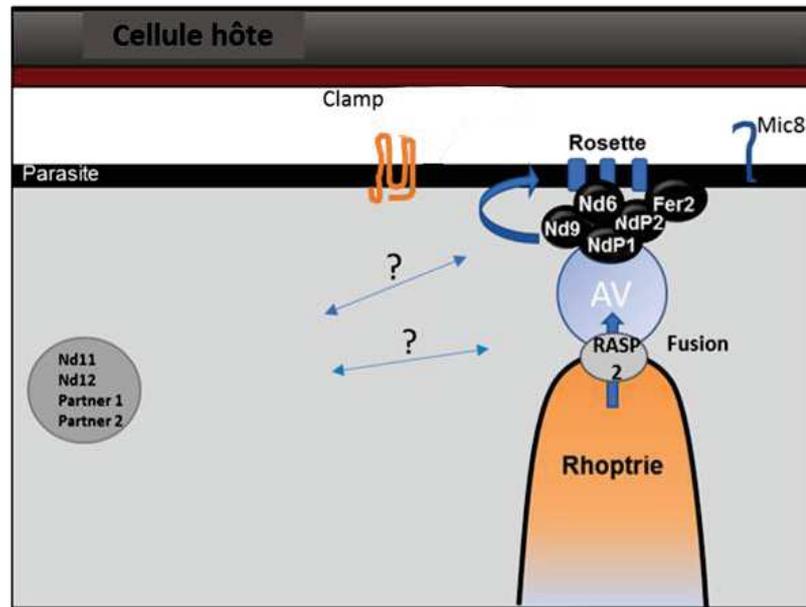
Des protéines de micronèmes MIC8 et CLAMP, ont été décrites comme étant des effecteurs de la sécrétion des rhoptries, exportées à la membrane et transduisant potentiellement un signal donnant lieu à l'exocytose. Nd11 et Nd12 pourraient interagir avec ces protéines, MIC8 possédant également des domaines de type EGF, bien qu'on ne les retrouve pas dans les expériences de spectrométrie de masse comme étant associées à Nd11 et Nd12 (Figure 50B). Identifier les signaux transduits par une de ces protéines, leurs cibles ou ce qu'elles détectent, pourrait donner des indications sur la fonction des autres.

La dernière étape de l'exocytose est l'export des protéines dans le cytoplasme de l'hôte, nous ne pouvons pas exclure l'implication de Nd11 et Nd12 dans ce processus (Figure

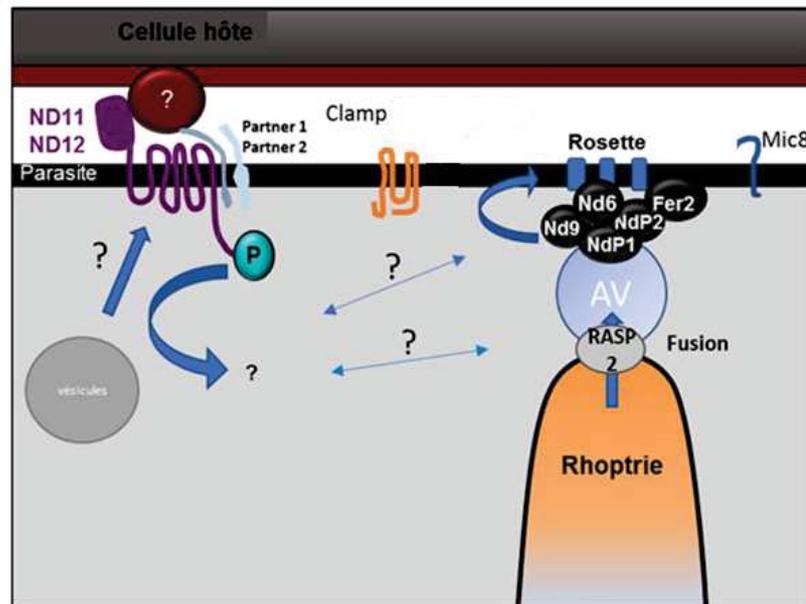
Discussion

50C), qui pourrait mettre en jeu la formation d'un pore dans la cellule hôte, formation de complexes des protéines sécrétées, des changements de conformation, ce qui n'est pas décrit à ce jour.

A



B



C

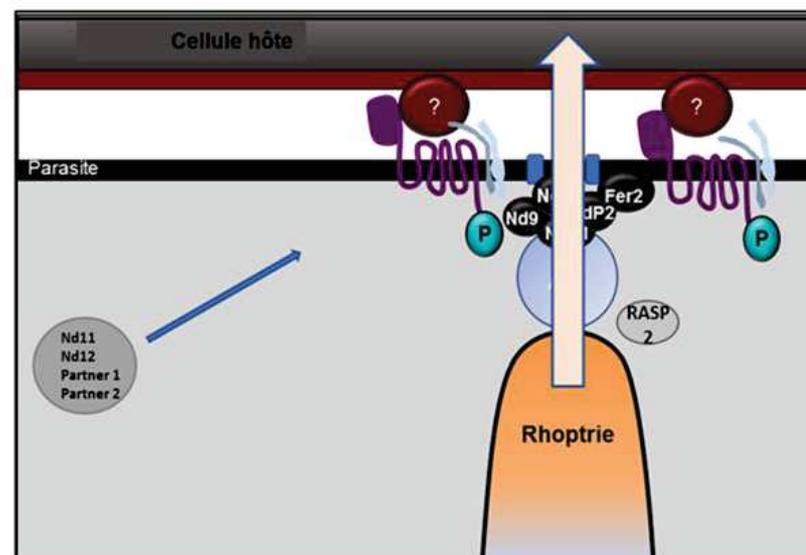


Figure 50. Modèles proposés pour la fonction de Nd11, Nd12 et leurs partenaires. A. Nd11 et Nd12 sont présentes dans le cytoplasme dans des vésicules ainsi que les partenaires. La relation entre Nd11 Nd12 et le premier complexe identifié Nd6-9 dépend doit être élucidée, notamment en déterminant l'implication de Nd11 et Nd12 dans la formation de la rosette. **B. Nd11 Nd12 et leurs partenaires sont exportées à la membrane.** Nous suggérons que Nd11 et Nd12 soient exportées à la membrane des parasites (peut-être au moment de l'invasion), exposant les domaines MAR/lectines/EGF à l'extérieur du parasite, permettant la détection d'un ligand et la transduction d'un signal via la queue C-terminale. Si la rosette n'est pas formée en l'absence de Nd11 et Nd12, ce signal peut servir à l'assemblage du complexe Nd6-9. Si elle l'est, ce signal peut servir à la fusion des membranes via RASP2. **C. Nd11 et Nd12 peuvent avoir un rôle dans l'export des protéines dans la cellule hôte.** La dernière étape de la sécrétion des rhoptries est l'export des protéines à l'intérieur de la cellule hôte après fusion des membranes et ouverture d'un « pore ». Cette étape n'est pas encore décrite mais il est important de ne pas exclure une potentielle fonction de Nd11-12 et leurs partenaires dans ce processus, en facilitant par exemple des formations de complexes ou changements de conformations.

Seconde partie

Mon travail sur la protéine TgPL3 a permis de démontrer que son absence n'affectait pas la sécrétion des micronèmes, la sortie de la cellule et la motilité glissante mais qu'il en résultait une perte de la capacité à sécréter les rhoptries. Ce travail, qui a été discuté dans le papier publié dans la revue Plos Pathogens, sera brièvement discuté dans cette partie.

Le défaut de sécrétion des rhoptries en l'absence de TgPL3 est moins important après plusieurs heures

Dans un premier temps, l'équipe collaboratrice a observé une diminution de la taille et du nombre des plages de lyse dans le mutant Δ TgPL3, et la restauration du phénotype WT après complémentation. Ils ont ensuite testé la capacité des parasites mutants à envahir, durant 15min, une monocouche de cellules HFF. Le défaut d'invasion identifié lors de ces expériences était de l'ordre de 20 à 25% par rapport au contrôle. Lors de nos premières expériences visant à identifier la capacité des parasites WT et mutants à sécréter les rhoptries, nous avons utilisé la technique des e-vacuoles, laissant apparaître une diminution de sécrétion des rhoptries de l'ordre de 80% du mutant par rapport au contrôle. Cette grande différence dans nos données nous a surpris.

En comparant nos protocoles, nous avons identifié que lors de l'expérience de sécrétion des rhoptries, nous laissions les parasites en contact avec les cellules seulement 15min à contrario du test d'invasion de nos collaborateurs qui incubaient initialement les parasites 3 heures minimum avec les cellules. Nous avons donc pensé qu'il pouvait y avoir un phénotype de « retard » du mutant Δ TgPL3, c'est-à-dire que les parasites sans TgPL3 mettraient plus de temps à sécréter leurs rhoptries et à envahir mais y parviendraient, même si cela dans une moindre mesure que pour des parasites WT. Nous avons décidé de confirmer les données de sécrétion des rhoptries avec le système SeCreEt, et avons utilisé ce

système pour identifier un éventuel retard du mutant. En effet, nous laissons, dans notre protocole habituel, les parasites en contact avec les cellules DsRed durant 6h avant lavage. Nous avons ici comparé les résultats obtenus avec ce protocole habituel et avec un second protocole dans lequel les cellules DsRed ont été lavées 1h après l'incubation des parasites, réduisant le temps de sécrétion potentiel des rhoptries. Nous avons observé que la différence de capacité à sécréter les rhoptries entre le WT et le mutant Δ TgPL3 quand ils sont laissés 1h en contact avec les cellules DsRed est réduite, elle est même non significative dans deux expériences sur trois, quand les parasites sont en contact durant 6h avec les cellules.

Cette expérience pourrait expliquer les grandes différences observées entre le phénotype d'invasion et de sécrétion des rhoptries, mais également de montrer que l'absence de TgPL3 « ralentissait » les événements de sécrétion des rhoptries, un phénotype que nous n'avions jamais observé jusqu'alors.

Plusieurs raisons biologiques peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène. PL3 n'étant pas essentielle, sa fonction est sans doute « support », ce qui signifierait qu'elle facilite les événements de sécrétion mais non qu'elle les gouverne. Nous proposons que PL3 ait une action mécanique sur la bicouche lipidique et donc qu'en fluidifiant les membranes des rhoptries, la fusion de celles-ci avec la membrane des parasites ou de la vésicule apicale soit facilitée. En l'absence de PL3, ces événements pourraient avoir lieu mais de façon moins efficace. Il est également possible que PL3 ait une fonction redondante avec d'autres phospholipases, et qu'en son absence la production d'effecteurs soit ralentie mais soit tout de même effectuée et qu'ainsi les événements de transduction du signal aient lieu. Par exemple, sa fonction peut être liée à l'augmentation de la concentration d'un messenger jusqu'à l'atteinte d'un seuil plateau et détection par un effecteur, cette augmentation étant donc seulement ralentie en l'absence de PL3.

Comment situer PL3 et sécrétion quel modèle proposer pour sa fonction au sein de l'exocytose des rhoptries ?

Pour resituer PL3 dans le contexte de la sécrétion des rhoptries, nous devons nous demander à quel moment de l'exocytose PL3 intervient. Il est possible qu'elle ait un lien avec la rosette, ou avec le complexe Nd6-Nd9. Sa fonction pourrait être liée à l'assemblage de ce

complexe et de la machinerie, ou alors à la fonction même de cette machinerie de fusion des membranes.

Son activité phospholipase nous tend à proposer de la relier à la membrane de la rhoptrie, où elle pourrait agir sur la fluidité de la bicouche lipidique, via la production de lysophospholipides et des acides gras polyinsaturés, et, par une action mécanique, déstabiliser la membrane des rhoptries et faciliter la fusion des membranes par RASP2, entre autres (Lee et al., 2011, Rocha et al., 2014, Schaeffer et al., 2005). D'autre part, les produits de PL3 par son activité phospholipase peuvent être impliqués dans du signaling (Anliker, 2004, Yung et al., 2015) pour la fusion des membranes, comme cela a été montré dans les synapses.

Il est malgré tout important ici de ne pas exclure une fonction liée aux protéines de micronèmes exportées à la membrane comme SPATR ou CLAMP. Le KO de la protéine SPATR induit un délai dans l'invasion, comme celui de PL3 pour la sécrétion des rhoptries. Cette similarité peut constituer un indice pour une implication dans les mêmes étapes de ces protéines.

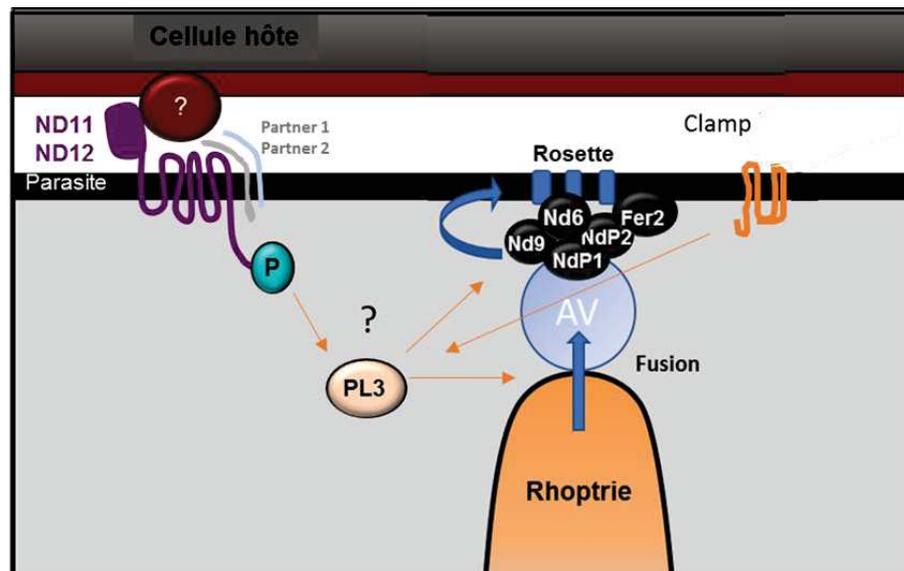


Figure 51. Modèle proposé pour la fonction de PL3. Nous proposons une action de PL3 via les lipides de la membrane des rhoptries, pour favoriser la fusion des membranes par RASP2. Les produits de l'activité phospholipase peuvent être impliqués dans la transduction de signaux aux complexes connus ou identifiés dans ce travail, ou permettre leur assemblage ou fonctionnement.

En conclusion, ce travail aura permis la caractérisation de plusieurs protéines dont un complexe, ayant un rôle dans l'invasion et plus précisément dans la capacité de *T. gondii* à

Discussion

sécréter les rhoptries dans la cellule hôte, sans affecter la sécrétion des protéines de micronèmes.

De nombreux travaux restent nécessaires à ce jour pour identifier la fonction moléculaire de ces nouvelles protéines, les signaux qu'elles reconnaissent et transmettent ainsi que les autres protéines parasitaires avec lesquelles elles interagissent.

RÉFÉRENCES

Références

- Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M. A., Camus, D., & Dubremetz, J. F. (1991). Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, *103*(3), 321-329.
<https://doi.org/10.1017/S0031182000059837>
- Ajzenberg, D., Collinet, F., Mercier, A., Vignoles, P., & Dardé, M.-L. (2010). Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(12), 4641-4645. <https://doi.org/10.1128/JCM.01152-10>
- Ammar, M. R., Kassas, N., Chasserot-Golaz, S., Bader, M.-F., & Vitale, N. (2013). Lipids in Regulated Exocytosis : What are They Doing? *Frontiers in Endocrinology*, *4*.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00125>
- Andenmatten, N., Egarter, S., Jackson, A. J., Jullien, N., Herman, J.-P., & Meissner, M. (2013). Conditional genome engineering in *Toxoplasma gondii* uncovers alternative invasion mechanisms. *Nature Methods*, *10*(2), 125-127. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2301>
- Anliker, B., & Chun, J. (2004). Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Seminars in cell & developmental biology*, *15*(5), 457-465. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2004.05.005>
- Aquilini, E., Cova, M. M., Mageswaran, S. K., Dos Santos Pacheco, N., Sparvoli, D., Penarete-Vargas, D., Najm, R., Graindorge, A., Suarez, C., Maynadier, M., Berry-Sterkers, L., Urbach, S., Ruga Fahy, P., Guérin, A., Striepen, B., Dubremetz, J. F., Chang, Y.-W., Turkewitz, A. P., & Lebrun, M. (2020). An Alveolata secretory machinery adapted to parasite-host cell invasion. *Nature Microbiology*.
- Araç, D., Boucard, A. A., Bolliger, M. F., Nguyen, J., Soltis, S. M., Südhof, T. C., & Brunger, A. T. (2012). A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis. *The EMBO Journal*, *31*(6), 1364-1378. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.26>
- Arnaiz, O., Goût, J.-F., Bétermier, M., Bouhouche, K., Cohen, J., Duret, L., Kapusta, A., Meyer, E., & Sperling, L. (2010). Gene expression in a paleopolyploid : A transcriptome resource for the

Références

- ciliate *Paramecium tetraurelia*. *BMC Genomics*, *11*(1), 547. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-547>
- Arrizabalaga, G., Ruiz, F., Moreno, S., & Boothroyd, J. C. (2004). Ionophore-resistant mutant of *Toxoplasma gondii* reveals involvement of a sodium/hydrogen exchanger in calcium regulation. *Journal of Cell Biology*, *165*(5), 653-662. <https://doi.org/10.1083/jcb.200309097>
- Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., & De Souza, W. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites & Vectors*, *13*(1), 588. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>
- Bader, M.-F., & Vitale, N. (2009). Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis : Lessons from chromaffin cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1791*(9), 936-941. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.016>
- Barragan, A., Brossier, F., & Sibley, L. D. (2005). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cellular Microbiology*, *7*(4), 561-568. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x>
- Becherer, U., & Rettig, J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell and Tissue Research*, *326*(2), 393-407. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0243-z>
- Beck, J. R., Fung, C., Straub, K. W., Coppens, I., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Bradley, P. J. (2013). A *Toxoplasma* Palmitoyl Acyl Transferase and the Palmitoylated Armadillo Repeat Protein TgARO Govern Apical Rhoptry Tethering and Reveal a Critical Role for the Rhoptries in Host Cell Invasion but Not Egress. *PLoS Pathogens*, *9*(2), e1003162. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003162>
- Beck, J. R., Rodriguez-Fernandez, I. A., Cruz de Leon, J., Huynh, M.-H., Carruthers, V. B., Morrisette, N. S., & Bradley, P. J. (2010). A Novel Family of *Toxoplasma* IMC Proteins Displays a Hierarchical Organization and Functions in Coordinating Parasite Division. *PLoS Pathogens*, *6*(9), e1001094-e1001094. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001094>

Références

- Beisson, J., Betermier, M., Bre, M.-H., Cohen, J., Duharcourt, S., Duret, L., Kung, C., Malinsky, S., Meyer, E., Preer, J. R., & Sperling, L. (2010). *Paramecium tetraurelia* : The Renaissance of an Early Unicellular Model. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(1), pdb.emo140-pdb.emo140. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo140>
- Beisson, J., Cohen, J., Lefort-Tran, M., Pouphe, M., & Rossignol, M. (1980). CONTROL OF MEMBRANE FUSION IN EXOCYTOSIS Physiological studies on a *Paramecium* mutant blocked in the final step of the trichocyst extrusion process. *Journal of Cell Biology*, 85, 213-227.
- Beisson, J., Lefort-Tran, M., Pouphe, M., Rossignol, M., & Satir, B. (1976). Genetic analysis of membrane differentiation in *Paramecium*. Freeze-fracture study of the trichocyst cycle in wild-type and mutant strains. *Journal of Cell Biology*, 69(1), 126-143. <https://doi.org/10.1083/jcb.69.1.126>
- Besteiro, S., Michelin, A., Poncet, J., Dubremetz, J.-F., & Lebrun, M. (2009). Export of a *Toxoplasma gondii* Rhoptry Neck Protein Complex at the Host Cell Membrane to Form the Moving Junction during Invasion. *PLoS Pathogens*, 5(2), e1000309-e1000309. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000309>
- Bigna, J. J., Tochie, J. N., Tounouga, D. N., Bekolo, A. O., Ymele, N. S., Youda, E. L., Sime, P. S., & Nansseu, J. R. (2020). Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women : A systematic review, modelling and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 12102-12102. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69078-9>
- Bisio, H., Chaabene, R. B., Sabitzki, R., Maco, B., Marq, J. B., Gilberger, T.-W., Spielmann, T., & Soldati-Favre, D. (2020). The ZIP Code of Vesicle Trafficking in Apicomplexa : SEC1/Munc18 and SNARE Proteins. *MBio*, 11(5), e02092-20, /mbio/11/5/mBio.02092-20.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.02092-20>
- Bisio, H., Lunghi, M., Brochet, M., & Soldati-Favre, D. (2019). Phosphatidic acid governs natural egress in *Toxoplasma gondii* via a guanylate cyclase receptor platform. *Nature Microbiology*, 4(3), 420-428. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0339-8>

Références

- Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C.-T., & Gubbels, M.-J. (2015). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii* : 15 Years Later. *Annual Review of Microbiology*, *69*(1), 463-485.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>
- Bonnemain, H., Gulik-Krzywicki, T., Grandchamp, C., & Cohen, J. (1992). Interactions between genes involved in exocytotic membrane fusion in paramecium. *Genetics*, *130*(3), 461-470.
- Bougdour, A., Durandau, E., Brenier-Pinchart, M.-P., Ortet, P., Barakat, M., Kieffer, S., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R.-L., Bastien, O., Coute, Y., Pelloux, H., & Hakimi, M.-A. (2013). Host Cell Subversion by *Toxoplasma* GRA16, an Exported Dense Granule Protein that Targets the Host Cell Nucleus and Alters Gene Expression. *Cell Host & Microbe*, *13*(4), 489-500.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.002>
- Braun, L., Brenier-Pinchart, M.-P., Yogavel, M., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R.-L., Hussain, T., Kieffer-Jaquinod, S., Coute, Y., Pelloux, H., Tardieux, I., Sharma, A., Belrhali, H., Bougdour, A., & Hakimi, M.-A. (2013). A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(10), 2071-2086.
<https://doi.org/10.1084/jem.20130103>
- Brecht, S., Erdhart, H., Soete, M., & Soldati, D. (1999). *Genome engineering of Toxoplasma gondii using the site-specific recombinase Cre* (Gene, p. 239-247). www.elsevier.com/locate/gene
- Breinich, M. S., Ferguson, D. J. P., Foth, B. J., van Dooren, G. G., Lebrun, M., Quon, D. V., Striepen, B., Bradley, P. J., Frischknecht, F., Carruthers, V. B., & Meissner, M. (2009). A Dynamin Is Required for the Biogenesis of Secretory Organelles in *Toxoplasma gondii*. *Current Biology*, *19*(4), 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.039>
- Briguglio, J. S., Kumar, S., & Turkewitz, A. P. (2013). Lysosomal sorting receptors are essential for secretory granule biogenesis in *Tetrahymena*. *The Journal of Cell Biology*, *203*(3), 537-550.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201305086>

Références

- Brochet, M., Collins, M. O., Smith, T. K., Thompson, E., Sebastian, S., Volkmann, K., Schwach, F., Chappell, L., Gomes, A. R., Berriman, M., Rayner, J. C., Baker, D. A., Choudhary, J., & Billker, O. (2014). Phosphoinositide Metabolism Links cGMP-Dependent Protein Kinase G to Essential Ca²⁺ Signals at Key Decision Points in the Life Cycle of Malaria Parasites. *PLoS Biology*, *12*(3), e1001806. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001806>
- Brooks, C. F., Johnsen, H., van Dooren, G. G., Muthalagi, M., Lin, S. S., Bohne, W., Fischer, K., & Striepen, B. (2010). The Toxoplasma Apicoplast Phosphate Translocator Links Cytosolic and Apicoplast Metabolism and Is Essential for Parasite Survival. *Cell Host & Microbe*, *7*(1), 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.12.002>
- Brown, K. M., Long, S., & Sibley, L. D. (2017). Plasma membrane association by N-acylation governs PKG function in *Toxoplasma gondii*. *mBio*, *8*(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00375-17>
- Buguliskis, J. S., Brossier, F., Shuman, J., & Sibley, L. D. (2010). Rhomboid 4 (ROM4) Affects the Processing of Surface Adhesins and Facilitates Host Cell Invasion by *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, *6*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000858>
- Bullen, H. E., Jia, Y., Yamaro-Botté, Y., Bisio, H., Zhang, O., Jemelin, N. K., Marq, J.-B., Carruthers, V., Botté, C. Y., & Soldati-Favre, D. (2016). Phosphatidic Acid-Mediated Signaling Regulates Microneme Secretion in *Toxoplasma*. *Cell Host & Microbe*, *19*(3), 349-360. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.006>
- Bullen, H. E., Tonkin, C. J., O'Donnell, R. A., Tham, W.-H., Papenfuss, A. T., Gould, S., Cowman, A. F., Crabb, B. S., & Gilson, P. R. (2009). A Novel Family of Apicomplexan Glideosome-associated Proteins with an Inner Membrane-anchoring Role. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(37). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.036772>
- Burg, J. L., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L., & Boothroyd, J. C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *141*(10), 3584-3591.

Références

- Butcher, B. A., Fox, B. A., Rommereim, L. M., Kim, S. G., Maurer, K. J., Yarovinsky, F., Herbert, D. R., Bzik, D. J., & Denkers, E. Y. (2011). Toxoplasma gondii Rhoptry Kinase ROP16 Activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. *PLoS Pathogens*, 7(9), e1002236. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002236>
- Buxton, D., Thomson, K., Maley, S., Wright, S., & Bos, H. (1991). Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of Toxoplasma gondii and their immunity to challenge when pregnant. *Veterinary Record*, 129(5), 89-93. <https://doi.org/10.1136/vr.129.5.89>
- Carruthers, V. B., Håkansson, S., Giddings, O. K., & Sibley, L. D. (2000). Toxoplasma gondii Uses Sulfated Proteoglycans for Substrate and Host Cell Attachment. *Infection and Immunity*, 68(7), 4005-4011. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4005-4011.2000>
- Carruthers, V. B., Sherman, G. D., & Sibley, L. D. (2000). The Toxoplasma Adhesive Protein MIC2 Is Proteolytically Processed at Multiple Sites by Two Parasite-derived Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19). <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14346>
- Carruthers, V. B., & Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in Toxoplasma gondii. *Molecular Microbiology*, 31(2), 421-428. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01174.x>
- Carruthers, V., & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology*, 73(2), 114-123.
- Castellani, A. (1914). Note on a certain protozoa-like bodies in a case of protracted fever with splenomegaly. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 17, 113-114.
- Cerede, O. (2002). The Toxoplasma gondii protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *The EMBO Journal*, 21(11), 2526-2536. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2526>
- Chalmers, A., & Kamar, A. (1920). Toxoplasma pyrogenes castellani. *Journal of Tropical Medicine*, 23(45).

Références

- Chasen, N. M., Stasic, A. J., Asady, B., Coppens, I., & Moreno, S. N. J. (2019). The Vacuolar Zinc Transporter TgZnT Protects *Toxoplasma gondii* from Zinc Toxicity. *mSphere*, 4(3).
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00086-19>
- Chasserot-Golaz, S., Coorsen, J. R., Meunier, F. A., & Vitale, N. (2010). Lipid Dynamics in Exocytosis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(8), 1335-1342. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9577-x>
- Coleman, B. I., Saha, S., Sato, S., Engelberg, K., Ferguson, D. J. P., Coppens, I., Lodoen, M. B., & Gubbels, M. J. (2018). A member of the ferlin calcium sensor family is essential for *Toxoplasma gondii* rhoptry secretion. *mBio*, 9(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01510-18>
- Cvacek, V., Goddard, W. A., & Abrol, R. (2016). Structure-Based Sequence Alignment of the Transmembrane Domains of All Human GPCRs : Phylogenetic, Structural and Functional Implications. *PLoS Computational Biology*, 12(3), e1004805.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004805>
- Darchen, F., Senyshyn, J., Brondyk, W. H., Taatjes, D. J., Holz, R. W., Henry, J. P., Denizot, J. P., & Macara, I. G. (1995). The GTPase Rab3a is associated with large dense core vesicles in bovine chromaffin cells and rat PC12 cells. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 4), 1639-1649.
- Derouin, F., Dorchies, P., Darde, M.-L., Goulet, V., Peyron, F., Thulliez, P., Villena, I., Tenailleau, S., Bultel, C., Eliasiewicz, M., & Roze, S. (2015). *Toxoplasmose : État des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation Rapport du groupe de travail « Toxoplasma gondii » de l'Afssa*.
- Di Cristina, M., Dou, Z., Lunghi, M., Kannan, G., Huynh, M.-H., McGovern, O. L., Schultz, T. L., Schultz, A. J., Miller, A. J., Hayes, B. M., van der Linden, W., Emiliani, C., Bogyo, M., Besteiro, S., Coppens, I., & Carruthers, V. B. (2017). *Toxoplasma* depends on lysosomal consumption of autophagosomes for persistent infection. *Nature Microbiology*, 2(8), 17096.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.96>

Références

- Djurković-Djaković, O., Dupouy-Camet, J., Van der Giessen, J., & Dubey, J. P. (2019). Toxoplasmosis : Overview from a One Health perspective. *Food and Waterborne Parasitology*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00054>
- Dobrowolski, J. M., Niesman, I. R., & Sibley, L. D. (1997). Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 37(3), 253-262. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1997\)37:3<253::AID-CM7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1997)37:3<253::AID-CM7>3.0.CO;2-7)
- Dobrowolski, J. M., & Sibley, L. D. (1996). *Toxoplasma* Invasion of Mammalian Cells Is Powered by the Actin Cytoskeleton of the Parasite. *Cell*, 84(6), 933-939. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81071-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81071-5)
- Dogga, S. K., Mukherjee, B., Jacot, D., Kockmann, T., Molino, L., Hammoudi, P.-M., Hartkoorn, R. C., Hehl, A. B., & Soldati-Favre, D. (2017). A druggable secretory protein maturase of *Toxoplasma* essential for invasion and egress. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.27480>
- Donald, R. G. K., Carter, D., Ullman, B., & Roos, D. S. (1996). Insertional Tagging, Cloning, and Expression of the *Toxoplasma gondii* Hypoxanthine-Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), 14010-14019. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14010>
- Donald, R. G., & Roos, D. S. (1993). Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii* : A selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11703-11707. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11703>
- Dos Santos Pacheco, N., Tosetti, N., Koreny, L., Waller, R. F., & Soldati-Favre, D. (2020). Evolution, Composition, Assembly, and Function of the Conoid in Apicomplexa. *Trends in Parasitology*, 36(8), 688-704. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.05.001>
- Douradina, B., Augustijn, K. D., Moore, S. G., Ramesar, J., Mota, M. M., Waters, A. P., Janse, C. J., & Thompson, J. (2011). Plasmodium Cysteine Repeat Modular Proteins 3 and 4 are essential for

Références

- malaria parasite transmission from the mosquito to the host. *Malaria Journal*, 10.
<https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-71>
- Dubey, J. P., Miller, N. L., & Frenkel, J. K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *Journal of experimental Medicine*, 132(4), 636-662.
- Dubois, D. J., & Soldati-Favre, D. (2019). Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*, 21(5), e13018-e13018. <https://doi.org/10.1111/cmi.13018>
- Dubremetz, Jean François. (2007). Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cellular Microbiology*, 9(4), 841-848. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00909.x>
- Dubremetz, Jean Francois, & Entzeroth, R. (1993). Exocytic events during cell invasion by Apicomplexa. In *Adv. Cell Mol. Biol. Membr. Membr. Traffic Protozoa Ed AM Tartakoff H Plattner* (Vol. 2A, p. 83-98).
- Dubremetz, J.F., & Torpier, G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an Eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). *Journal of Ultrastructure Research*, 62(2), 94-109.
[https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(78\)90012-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(78)90012-6)
- Dzierszynski, F., Mortuaire, M., Cesbron-Delauw, M. F., & Tomavo, S. (2002). Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Molecular Microbiology*, 37(3), 574-582. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02014.x>
- El Hajj, H., Papoin, J., Cérède, O., Garcia-Réguet, N., Soète, M., Dubremetz, J.-F., & Lebrun, M. (2008). Molecular Signals in the Trafficking of *Toxoplasma gondii* Protein MIC3 to the Micronemes. *Eukaryotic Cell*, 7(6), 1019-1028. <https://doi.org/10.1128/EC.00413-07>
- Etheridge, R. D., Alaganan, A., Tang, K., Lou, H. J., Turk, B. E., & Sibley, L. D. (2014). The *Toxoplasma* Pseudokinase ROP5 Forms Complexes with ROP18 and ROP17 Kinases that Synergize to Control Acute Virulence in Mice. *Cell Host & Microbe*, 15(5), 537-550.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.002>

Références

- Fang, J., Marchesini, N., & Moreno, S. N. J. (2006). A *Toxoplasma gondii* phosphoinositide phospholipase C (TgPI-PLC) with high affinity for phosphatidylinositol. *Biochemical Journal*, *394*(2), 417-425. <https://doi.org/10.1042/BJ20051393>
- Farrell, A., Thirugnanam, S., Lorestani, A., Dvorin, J. D., Eidell, K. P., Ferguson, D. J. P., Anderson-White, B. R., Duraisingh, M. T., Marth, G. T., & Gubbels, M.-J. (2012). A DOC2 Protein Identified by Mutational Profiling Is Essential for Apicomplexan Parasite Exocytosis. *Science*, *335*(6065), 218-221. <https://doi.org/10.1126/science.1210829>
- Fedorovitch, A. (1916). Hemoparasites trouves dans un cas de fièvre chronique. *Annuel Institut Pasteur*, *30*, 249-250.
- Fentress, S. J., Behnke, M. S., Dunay, I. R., Mashayekhi, M., Rommereim, L. M., Fox, B. A., Bzik, D. J., Taylor, G. A., Turk, B. E., Lichti, C. F., Townsend, R. R., Qiu, W., Hui, R., Beatty, W. L., & Sibley, L. D. (2010). Phosphorylation of Immunity-Related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-Secreted Kinase Promotes Macrophage Survival and Virulence. *Cell Host & Microbe*, *8*(6), 484-495. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.11.005>
- Fox, B. A., Ristuccia, J. G., Gigley, J. P., & Bzik, D. J. (2009). Efficient Gene Replacements in *Toxoplasma gondii* Strains Deficient for Nonhomologous End Joining. *Eukaryotic Cell*, *8*(4), 520-529. <https://doi.org/10.1128/EC.00357-08>
- Franco, M., Panas, M. W., Marino, N. D., Lee, M.-C. W., Buchholz, K. R., Kelly, F. D., Bednarski, J. J., Sleckman, B. P., Pourmand, N., & Boothroyd, J. C. (2016). A Novel Secreted Protein, MYR1, Is Central to *Toxoplasma*'s Manipulation of Host Cells. *mBio*, *7*(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02231-15>
- Frankel, M. B., Mordue, D. G., & Knoll, L. J. (2007). Discovery of parasite virulence genes reveals a unique regulator of chromosome condensation 1 ortholog critical for efficient nuclear trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(24), 10181-10186. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701893104>

Références

- Frénal, K., Dubremetz, J. F., Lebrun, M., & Soldati-Favre, D. (2017). Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(11), 645-660.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.86>
- Frénal, K., Marq, J.-B., Jacot, D., Polonais, V., & Soldati-Favre, D. (2014). Plasticity between MyoC- and MyoA-Glideosomes : An Example of Functional Compensation in *Toxoplasma gondii* Invasion. *PLoS Pathogens*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004504>
- Frénal, K., Polonais, V., Marq, J. B., Stratmann, R., Limenitakis, J., & Soldati-Favre, D. (2010). Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. *Cell Host and Microbe*, *8*(4), 343-357. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.002>
- Friedrich, N., Santos, J. M., Liu, Y., Palma, A. S., Leon, E., Saouros, S., Kiso, M., Blackman, M. J., Matthews, S., Feizi, T., & Soldati-Favre, D. (2010). Members of a novel protein family containing microneme adhesive repeat domains act as sialic acid-binding lectins during host cell invasion by apicomplexan parasites. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(3), 2064-2076.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060988>
- Fritz, H. M., Buchholz, K. R., Chen, X., Durbin-Johnson, B., Rocke, D. M., Conrad, P. A., & Boothroyd, J. C. (2012). Transcriptomic Analysis of *Toxoplasma* Development Reveals Many Novel Functions and Structures Specific to Sporozoites and Oocysts. *PLoS ONE*, *7*(2), e29998-e29998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029998>
- Froissard, M., Keller, A. M., & Cohen, J. (2001). ND9P, a novel protein with armadillo-like repeats involved in exocytosis : Physiological studies using allelic mutants in paramecium. *Genetics*, *157*(2), 611-620.
- Froissard, Marine, Kissmehl, R., Dedieu, J.-C., Gulik-Krzywicki, T., Plattner, H., & Cohen, J. (2002). N-ethylmaleimide-sensitive factor is required to organize functional exocytotic microdomains in paramecium. *Genetics*, *161*(2), 643-650.

Références

- Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G., & Beckers, C. (2004). Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Biology*, *165*(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.200311137>
- Giraud, C. G. (2006). A Clamping Mechanism Involved in SNARE-Dependent Exocytosis. *Science*, *313*(5787), 676-680. <https://doi.org/10.1126/science.1129450>
- Gogendeau, D., Keller, A.-M., Yanagi, A., Cohen, J., & Koll, F. (2005). Nd6p, a Novel Protein with RCC1-Like Domains Involved in Exocytosis in *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryotic Cell*, *4*(12), 2129-2139. <https://doi.org/10.1128/EC.4.12.2129-2139.2005>
- Gold, D. A., Kaplan, A. D., Lis, A., Bett, G. C. L., Rosowski, E. E., Cirelli, K. M., Bougdour, A., Sidik, S. M., Beck, J. R., Lourido, S., Egea, P. F., Bradley, P. J., Hakimi, M.-A., Rasmusson, R. L., & Saeij, J. P. J. (2015). The *Toxoplasma* Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole. *Cell Host & Microbe*, *17*(5), 642-652. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.003>
- Gordon, J. L., & Sibley, L. D. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics*, *6*(1), 179-179. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-179>
- Graindorge, A., Fréchal, K., Jacot, D., Salamun, J., Marq, J. B., & Soldati-Favre, D. (2016). The Conoid Associated Motor MyoH Is Indispensable for *Toxoplasma gondii* Entry and Exit from Host Cells. *PLOS Pathogens*, *12*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005388>
- Grimwood, J., & Smith, J. E. (1992). *Toxoplasma gondii* : The role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Experimental Parasitology*, *74*(1), 106-111. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90144-Y](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90144-Y)
- Gubbels, M. J., White, M., & Szatanek, T. (2008). The cell cycle and *Toxoplasma gondii* cell division : Tightly knit or loosely stitched? *International Journal for Parasitology*, *38*(12), 1343-1358. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.004>

Références

- Guérardel, Y., Leleu, D., Coppin, A., Liénard, L., Slomianny, C., Strecker, G., Ball, S., & Tomavo, S. (2005). Amylopectin biogenesis and characterization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, the intracellular development of which is restricted in the HepG2 cell line. *Microbes and Infection*, 7(1), 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.09.007>
- Guérin, A., Corrales, R. M., Parker, M. L., Lamarque, M. H., Jacot, D., El Hajj, H., Soldati-Favre, D., Boulanger, M. J., & Lebrun, M. (2017). Efficient invasion by *Toxoplasma* depends on the subversion of host protein networks. *Nature Microbiology*, 2(10), 1358-1366. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0018-1>
- Guérin, A., El Hajj, H., Penarete-Vargas, D., Besteiro, S., & Lebrun, M. (2017). RON4L1 is a new member of the moving junction complex in *Toxoplasma gondii*. *Scientific Reports*, 7(1), 17907-17907. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18010-9>
- Haddad, A., & Turkewitz, A. P. (1997). Analysis of exocytosis mutants indicates close coupling between regulated secretion and transcription activation in *Tetrahymena*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20), 10675-10680. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10675>
- Hakansson, S., Charron, A. J., & Sibley, L. D. (2001). *Toxoplasma* evacuoles : A two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The EMBO Journal*, 20(12), 3132-3144. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3132>
- Hamann, J., Aust, G., Araç, D., Engel, F. B., Formstone, C., Fredriksson, R., Hall, R. A., Harty, B. L., Kirchhoff, C., Knapp, B., Krishnan, A., Liebscher, I., Lin, H.-H., Martinelli, D. C., Monk, K. R., Peeters, M. C., Piao, X., Prömel, S., Schöneberg, T., ... Schiöth, H. B. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G Protein–Coupled Receptors. *Pharmacological Reviews*, 67(2), 338-367. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009647>
- Hammoudi, P.-M., Maco, B., Dogga, S. K., Fréna, K., & Soldati-Favre, D. (2018). *Toxoplasma gondii* TFP1 is an essential transporter family protein critical for microneme maturation and exocytosis. *Molecular Microbiology*, 109(2), 225-244. <https://doi.org/10.1111/mmi.13981>

Références

- Harata, N. C., Aravanis, A. M., & Tsien, R. W. (2006). Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *Journal of Neurochemistry*, *97*(6), 1546-1570.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03987.x>
- Harding, C. R., Gow, M., Kang, J. H., Shortt, E., Manalis, S. R., Meissner, M., & Lourido, S. (2019). Alveolar proteins stabilize cortical microtubules in *Toxoplasma gondii*. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08318-7>
- Harding, C. R., & Meissner, M. (2014). The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium*. *Cellular Microbiology*, *16*(5), 632-641.
<https://doi.org/10.1111/cmi.12285>
- Harper, J. M., Hoff, E. F., & Carruthers, V. B. (2004). Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *134*(2), 201-212.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.12.001>
- Hartley, W. J., & Marshall, S. C. (1957). Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. *New Zealand Veterinary Journal*, *5*(4), 119-124. <https://doi.org/10.1080/00480169.1957.33275>
- He, X., Grigg, M. E., Boothroyd, J. C., & Garcia, K. C. (2002). Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nature Structural Biology*.
<https://doi.org/10.1038/nsb819>
- Hensel, M., & Holden, D. W. (1996). Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi. *Microbiology*, *142*(5), 1049-1058.
<https://doi.org/10.1099/13500872-142-5-1049>
- Hensel, M., Shea, J. E., Gleeson, C., Jones, M. D., Dalton, E., & Holden, D. W. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science (New York, N.Y.)*, *269*(5222), 400-403. <https://doi.org/10.1126/science.7618105>

Références

- Herm-Gotz, A. (2002). Toxoplasma gondii myosin A and its light chain : A fast, single-headed, plus-end-directed motor. *The EMBO Journal*, 21(9), 2149-2158.
<https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2149>
- Herm-Götz, A., Agop-Nersesian, C., Münter, S., Grimley, J. S., Wandless, T. J., Frischknecht, F., & Meissner, M. (2007). Rapid control of protein level in the apicomplexan Toxoplasma gondii. *Nature Methods*, 4(12), 1003-1005. <https://doi.org/10.1038/nmeth1134>
- Hoppe, H. C., Ngô, H. M., Yang, M., & Joiner, K. A. (2000). Targeting to rhoptry organelles of Toxoplasma gondii involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nature Cell Biology*, 2(7), 449-456. <https://doi.org/10.1038/35017090>
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D. S., & Murray, J. M. (2006). Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of Toxoplasma gondii. *PLoS Pathogens*, 2(2), e13-e13.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020013>
- Humeau, Y., Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Dupont, J.-L., Du, G., Frohman, M. A., Bader, M.-F., & Poulain, B. (2001). A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15300-15305.
<https://doi.org/10.1073/pnas.261358698>
- Huynh, M.-H. (2003). Rapid invasion of host cells by Toxoplasma requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *The EMBO Journal*, 22(9), 2082-2090.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg217>
- Huynh, My-Hang, Boulanger, M. J., & Carruthers, V. B. (2014). A Conserved Apicomplexan Microneme Protein Contributes to Toxoplasma gondii Invasion and Virulence. *Infection and Immunity*, 82(10), 4358-4368. <https://doi.org/10.1128/IAI.01877-14>
- Huynh, My-Hang, & Carruthers, V. B. (2009). Tagging of Endogenous Genes in a Toxoplasma gondii Strain Lacking Ku80. *Eukaryotic Cell*, 8(4), 530-539. <https://doi.org/10.1128/EC.00358-08>

Références

- Huynh, My-Hang, & Carruthers, V. B. (2016). A *Toxoplasma gondii* Ortholog of Plasmodium GAMA Contributes to Parasite Attachment and Cell Invasion. *mSphere*, 1(1).
<https://doi.org/10.1128/mSphere.00012-16>
- Jackson, M. B., & Chapman, E. R. (2006). FUSION PORES AND FUSION MACHINES IN Ca^{2+} -TRIGGERED EXOCYTOSIS. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35(1), 135-160.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101958>
- Jackson, M. B., & Chapman, E. R. (2008). The fusion pores of Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7), 684-689. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1449>
- Jacot, D., Daher, W., & Soldati-Favre, D. (2013). *Toxoplasma gondii* myosin F, an essential motor for centrosomes positioning and apicoplast inheritance. *The EMBO Journal*, 32(12), 1702-1716.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2013.113>
- Jacot, D., Tosetti, N., Pires, I., Stock, J., Graindorge, A., Hung, Y.-F., Han, H., Tewari, R., Kursula, I., & Soldati-Favre, D. (2016). An Apicomplexan Actin-Binding Protein Serves as a Connector and Lipid Sensor to Coordinate Motility and Invasion. *Cell Host & Microbe*, 20(6).
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.020>
- Janku. (1923). J. Janku. *Cas. Lék. cesk.*, 62, 1021-1027.
- Janouskovec, J., Horak, A., Obornik, M., Lukes, J., & Keeling, P. J. (2010). A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24), 10949-10954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003335107>
- Jewett, T. J., & Sibley, L. D. (2003). Aldolase Forms a Bridge between Cell Surface Adhesins and the Actin Cytoskeleton in Apicomplexan Parasites. *Molecular Cell*, 11(4), 885-894.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00113-8)
- Jewett, T. J., & Sibley, L. D. (2004). The *Toxoplasma* Proteins MIC2 and M2AP Form a Hexameric Complex Necessary for Intracellular Survival. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9362-9369. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312590200>

Références

- Johannes, L., Doussau, F., Clabecq, A., Henry, J. P., Darchen, F., & Poulain, B. (1996). Evidence for a functional link between Rab3 and the SNARE complex. *Journal of Cell Science*, *109* (Pt 12), 2875-2884.
- Joiner, K. A., & Roos, D. S. (2002). Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Biology*, *157*(4), 557-563. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112144>
- Kafsack, B. F. C., Pena, J. D. O., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J. C., & Carruthers, V. B. (2009). Rapid Membrane Disruption by a Perforin-Like Protein Facilitates Parasite Exit from Host Cells. *Science*, *323*(5913), 530-533. <https://doi.org/10.1126/science.1165740>
- Karsten, V., Qi, H., Beckers, C. J. M., Reddy, A., Dubremetz, J.-F., Webster, P., & Joiner, K. A. (1998). The Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii* Targets Proteins to Dense Granules and the Vacuolar Space Using Both Conserved and Unusual Mechanisms. *Journal of Cell Biology*, *141*(6), 1323-1333. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.6.1323>
- Katris, N. J., van Dooren, G. G., McMillan, P. J., Hanssen, E., Tilley, L., & Waller, R. F. (2014). The Apical Complex Provides a Regulated Gateway for Secretion of Invasion Factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathogens*, *10*(4), e1004074-e1004074. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004074>
- Keeley, A., & Soldati, D. (2004). The glideosome : A molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends in Cell Biology*, *14*(10), 528-532. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.08.002>
- Kerboeuf, D., & Cohen, J. (1990). A Ca²⁺ influx associated with exocytosis is specifically abolished in a *Paramecium* exocytotic mutant. *The Journal of Cell Biology*, *111*(6 Pt 1), 2527-2535. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.6.2527>
- Kerboeuf, D., Le Berre, A., Dedieu, J. C., & Cohen, J. (1993). Calmodulin is essential for assembling links necessary for exocytotic membrane fusion in *Paramecium*. *The EMBO Journal*, *12*(9), 3385-3390.

Références

- Kessler, H., Herm-Gotz, A., Hegge, S., Rauch, M., Soldati-Favre, D., Frischknecht, F., & Meissner, M. (2008). Microneme protein 8—A new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*, *121*(7), 947-956. <https://doi.org/10.1242/jcs.022350>
- Khan, A., & Grigg, M. E. (2017). *Toxoplasma gondii* : Laboratory maintenance and growth. *Current Protocols in Microbiology*, *2017*, 20C.1.1-20C.1.17. <https://doi.org/10.1002/cpmc.26>
- Kim, K., Soldati, D., & Boothroyd, J. (1993). Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science*, *262*(5135), 911-914. <https://doi.org/10.1126/science.8235614>
- Kissmehl, R., Schilde, C., Wassmer, T., Danzer, C., Nuehse, K., Lutter, K., & Plattner, H. (2007). Molecular Identification of 26 Syntaxin Genes and their Assignment to the Different Trafficking Pathways in *Paramecium*. *Traffic*, *8*(5), 523-542. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00544.x>
- Klauke, N., Blanchard, M.-P., & Plattner, H. (2000). Polyamine Triggering of Exocytosis in *Paramecium* Involves an Extracellular Ca²⁺/(Polyvalent Cation)-Sensing Receptor, Subplasmalemmal Ca-Store Mobilization and Store-Operated Ca²⁺-Influx via Unspecific Cation Channels. *Journal of Membrane Biology*, *174*(2), 141-156. <https://doi.org/10.1007/s002320001039>
- Knoll, G., Braun, C., & Plattner, H. (1991). Quenched flow analysis of exocytosis in *Paramecium* cells : Time course, changes in membrane structure, and calcium requirements revealed after rapid mixing and rapid freezing of intact cells. *Journal of Cell Biology*, *113*(6), 1295-1304. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.6.1295>
- Knoll, G., Grässle, A., Braun, C., Probst, W., Höhne-Zell, B., & Plattner, H. (1993). A calcium influx is neither strictly associated with nor necessary for exocytotic membrane fusion in *Paramecium* cells. *Cell Calcium*, *14*(3), 173-183. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(93\)90065-e](https://doi.org/10.1016/0143-4160(93)90065-e)
- Knoll, L. J., Furie, G. L., & Boothroyd, J. C. (2001). Adaptation of signature-tagged mutagenesis for *Toxoplasma gondii* : A negative screening strategy to isolate genes that are essential in

Références

- restrictive growth conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 116(1), 11-16.
[https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00295-x](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00295-x)
- Kooijman, E. E., Chupin, V., Fuller, N. L., Kozlov, M. M., de Kruijff, B., Burger, K. N. J., & Rand, P. R. (2005). Spontaneous Curvature of Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid †. *Biochemistry*, 44(6), 2097-2102. <https://doi.org/10.1021/bi0478502>
- Koshy, A. A., Dietrich, H. K., Christian, D. A., Melehani, J. H., Shastri, A. J., Hunter, C. A., & Boothroyd, J. C. (2012). Toxoplasma Co-opts Host Cells It Does Not Invade. *PLoS Pathogens*, 8(7), e1002825. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002825>
- Koshy, A. A., Fouts, A. E., Lodoen, M. B., Alkan, O., Blau, H. M., & Boothroyd, J. C. (2010). Toxoplasma secreting Cre recombinase for analysis of host-parasite interactions. *Nature Methods*, 7(4), 307-309. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1438>
- Kremer, K., Kamin, D., Rittweger, E., Wilkes, J., Flammer, H., Mahler, S., Heng, J., Tonkin, C. J., Langsley, G., Hell, S. W., Carruthers, V. B., Ferguson, D. J. P., & Meissner, M. (2013). An Overexpression Screen of Toxoplasma gondii Rab-GTPases Reveals Distinct Transport Routes to the Micronemes. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003213.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003213>
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.-F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., & Lebrun, M. (2011). The RON2-AMA1 Interaction is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites. *PLoS Pathogens*, 7(2), e1001276-e1001276. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>
- Lamarque, M. H., Papoin, J., Finizio, A.-L., Lentini, G., Pfaff, A. W., Candolfi, E., Dubremetz, J.-F., & Lebrun, M. (2012). Identification of a New Rhoptry Neck Complex RON9/RON10 in the Apicomplexa Parasite Toxoplasma gondii. *PLoS ONE*, 7(3), e32457-e32457.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032457>

Références

- Lamarque, M. H., Roques, M., Kong-Hap, M., Tonkin, M. L., Rugarabamu, G., Marq, J. B., Penarete-Vargas, D. M., Boulanger, M. J., Soldati-Favre, D., & Lebrun, M. (2014). Plasticity and redundancy among AMA-RON pairs ensure host cell entry of *Toxoplasma* parasites. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5098>
- Lang, T., Margittai, M., Hölzler, H., & Jahn, R. (2002). SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. *Journal of Cell Biology*, 158(4), 751-760. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203088>
- Lee, J. C., Simonyi, A., Sun, A. Y., & Sun, G. Y. (2011). Phospholipases A2 and neural membrane dynamics: implications for Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 116(5), 813–819. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07033.x>
- Lefort-Tran, M., Aufderheide, K., Pouphe, M., Rossignol, M., & Beisson, J. (1981). Control of exocytotic processes : Cytological and physiological studies of trichocyst mutants in *Paramecium tetraurelia*. *The Journal of Cell Biology*, 88(2), 301-311. <https://doi.org/10.1083/jcb.88.2.301>
- Lentini, G., Dubois, D. J., Maco, B., Soldati-Favre, D., & Frénel, K. (2019). The roles of Centrin 2 and Dynein Light Chain 8a in apical secretory organelles discharge of *Toxoplasma gondii*. *Traffic*, 20(8), 583-600. <https://doi.org/10.1111/tra.12673>
- Leung, J. M., He, Y., Zhang, F., Hwang, Y.-C., Nagayasu, E., Liu, J., Murray, J. M., & Hu, K. (2017). Stability and function of a putative microtubule-organizing center in the human parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular Biology of the Cell*, 28(10), 1361-1378. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-01-0045>
- Leung, J. M., Liu, J., Wetzel, L. A., & Hu, K. (2019). Centrin2 from the human parasite *Toxoplasma gondii* is required for its invasion and intracellular replication. *Journal of Cell Science*, 132(13), jcs228791-jcs228791. <https://doi.org/10.1242/jcs.228791>
- Leung, J. M., Rould, M. A., Konradt, C., Hunter, C. A., & Ward, G. E. (2014). Disruption of TgPHIL1 Alters Specific Parameters of *Toxoplasma gondii* Motility Measured in a Quantitative, Three-

Références

- Dimensional Live Motility Assay. *PLoS ONE*, 9(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085763>
- Lévêque, M. F., Berry, L., Yamaryo-Botté, Y., Nguyen, H. M., Galera, M., Botté, C. Y., & Besteiro, S. (2017). TgPL2, a patatin-like phospholipase domain-containing protein, is involved in the maintenance of apicoplast lipids homeostasis in *Toxoplasma*. *Molecular Microbiology*, 105(1), 158-174. <https://doi.org/10.1111/mmi.13694>
- Li, F., Pincet, F., Perez, E., Eng, W. S., Melia, T. J., Rothman, J. E., & Tareste, D. (2007). Energetics and dynamics of SNAREpin folding across lipid bilayers. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(10), 890-896. <https://doi.org/10.1038/nsmb1310>
- Long, S., Brown, K. M., Drewry, L. L., Anthony, B., Phan, I. Q. H., & Sibley, L. D. (2017). Calmodulin-like proteins localized to the conoid regulate motility and cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *PLOS Pathogens*, 13(5), e1006379. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006379>
- Lorenzi, H., Khan, A., Behnke, M. S., Namasivayam, S., Swapna, L. S., Hadjithomas, M., Karamycheva, S., Pinney, D., Brunk, B. P., Ajioka, J. W., Ajzenberg, D., Boothroyd, J. C., Boyle, J. P., Dardé, M. L., Diaz-Miranda, M. A., Dubey, J. P., Fritz, H. M., Gennari, S. M., Gregory, B. D., ... Sibley, L. D. (2016). Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nature Communications*, 7(1), 10147-10147. <https://doi.org/10.1038/ncomms10147>
- Luo, S., Ruiz, F. A., & Moreno, S. N. J. (2005). The acidocalcisome Ca²⁺-ATPase (TgA1) of *Toxoplasma gondii* is required for polyphosphate storage, intracellular calcium homeostasis and virulence. *Molecular Microbiology*, 55(4), 1034-1045. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04464.x>
- Ma, C., Li, W., Xu, Y., & Rizo, J. (2011). Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin–Munc18 complex to the SNARE complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(5), 542-549. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2047>

Références

- Mann, T. (2001). Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *115*(2), 257-268. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00289-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00289-4)
- Marchant, J., Cowper, B., Liu, Y., Lai, L., Pinzan, C., Marq, J. B., Friedrich, N., Sawmynaden, K., Liew, L., Chai, W., Childs, R. A., Saouros, S., Simpson, P., Roque Barreira, M. C., Feizi, T., Soldati-Favre, D., & Matthews, S. (2012). Galactose Recognition by the Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(20), 16720-16733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325928>
- Marino, N. D., Panas, M. W., Franco, M., Theisen, T. C., Naor, A., Rastogi, S., Buchholz, K. R., Lorenzi, H. A., & Boothroyd, J. C. (2018). Identification of a novel protein complex essential for effector translocation across the parasitophorous vacuole membrane of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, *14*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006828>
- Matt, H., Plattner, H., Reichel, K., Lefort-Tran, M., & Beisson, J. (1980). Genetic dissection of the final exocytosis steps in *Paramecium tetraurelia* cells : Trigger analyses. *Journal of Cell Science*, *46*, 41-60.
- McAuley, J. B. (2014). Congenital toxoplasmosis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, *3*(SUPPL1). <https://doi.org/10.1093/jpids/piu077>
- McFadden, G. I., & Yeh, E. (2017). The apicoplast : Now you see it, now you don't. *International Journal for Parasitology*, *47*(2-3), 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.08.005>
- McGovern, O. L., Rivera-Cuevas, Y., Kannan, G., Narwold, A. J., & Carruthers, V. B. (2018). Intersection of endocytic and exocytic systems in *Toxoplasma gondii*. *Traffic*, *19*(5), 336-353. <https://doi.org/10.1111/tra.12556>
- Mehta, S., & Sibley, L. D. (2011). Actin depolymerizing factor controls actin turnover and gliding motility in *Toxoplasma gondii*. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(8), 1290-1299. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-12-0939>

Références

- Meissner, M., Reiss, M., Viebig, N., Carruthers, V. B., Tourse, C., Tomavo, S., Ajioka, J. W., & Soldati, D. (2002). A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters. *Journal of Cell Science*, *115*(3), 563-563.
- Meissner, M., Schlüter, D., & Soldati, D. (2002). Role of *Toxoplasma gondii* Myosin A in Powering Parasite Gliding and Host Cell Invasion. *Science*, *298*, 837-840.
- Mercier, C., & Cesbron-Delauw, M. F. (2015). *Toxoplasma* secretory granules : One population or more? *Trends in Parasitology*, *31*(2), 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.002>
- Mercier, C., Dubremetz, J.-F., Rauscher, B., Lecordier, L., Sibley, L. D., & Cesbron-Delauw, M.-F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(7), 2397-2409. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-01-0021>
- Miller, S. A., Thathy, V., Ajioka, J. W., Blackman, M. J., & Kim, K. (2003). TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase : Rhoptry processing proteinase. *Molecular Microbiology*, *49*(4), 883-894. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03604.x>
- Mineo, J. R., & Kasper, L. H. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to Host Cells Involves Major Surface Protein, SAG-1 (P-30). *Experimental Parasitology*, *79*(1), 11-20. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1054>
- Mineo, J. R., McLeod, R., Smith, J., Khan, I. A., Ely, K. H., & Kasper, L. H. (1993). Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *The Journal of Immunology*, *150*(9), 3951-3964.
- Miranda, K., Pace, D. A., Cintron, R., Rodrigues, J. C. F., Fang, J., Smith, A., Rohloff, P., Coelho, E., De Haas, F., De Souza, W., Coppens, I., Sibley, L. D., & Moreno, S. N. J. (2010). Characterization of a novel organelle in *Toxoplasma gondii* with similar composition and function to the plant vacuole. *Molecular Microbiology*, *76*(6), 1358-1375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07165.x>

Références

- Momayezi, M., Kersken, H., Gras, U., Vilmart-Seuwen, J., & Plattner, H. (1986). Calmodulin in *Paramecium tetraurelia* : Localization from the in vivo to the ultrastructural level. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *34*(12), 1621-1638. <https://doi.org/10.1177/34.12.3097118>
- Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, *363*, 1965-1976.
- Mordue, D. G., Håkansson, S., Niesman, I., & David Sibley, L. (1999). Toxoplasma gondii Resides in a Vacuole That Avoids Fusion with Host Cell Endocytic and Exocytic Vesicular Trafficking Pathways. *Experimental Parasitology*, *92*(2). <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4412>
- Mordue, D. G., Scott-Weathers, C. F., Tobin, C. M., & Knoll, L. J. (2007). A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in activated macrophages. *Molecular Microbiology*, *63*(2), 482-496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05538.x>
- Morisaki, J. H., Heuser, J. E., & Sibley, L. D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of Cell Science*, *108* (Pt 6), 2457-2464.
- Morlon-Guyot, J., Pastore, S., Berry, L., Lebrun, M., & Daher, W. (2015). *Toxoplasma gondii* Vps11, a subunit of HOPS and CORVET tethering complexes, is essential for the biogenesis of secretory organelles : Functional dissection of *T. gondii* Vps11 protein. *Cellular Microbiology*, *17*(8), 1157-1178. <https://doi.org/10.1111/cmi.12426>
- Morrisette, N. (2015). Targeting *Toxoplasma* Tubules : Tubulin, Microtubules, and Associated Proteins in a Human Pathogen. *Eukaryotic Cell*, *14*(1), 2-12. <https://doi.org/10.1128/EC.00225-14>
- Moudy, R., Manning, T. J., & Beckers, C. J. (2001). The Loss of Cytoplasmic Potassium upon Host Cell Breakdown Triggers Egress of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(44), 41492-41501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106154200>
- Mueller, C., Klages, N., Jacot, D., Santos, J. M., Cabrera, A., Gilberger, T. W., Dubremetz, J.-F., & Soldati-Favre, D. (2013). The *Toxoplasma* Protein ARO Mediates the Apical Positioning of Rhoptry Organelles, a Prerequisite for Host Cell Invasion. *Cell Host & Microbe*, *13*(3), 289-301. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.001>

Références

- Mueller, C., Samoo, A., Hammoudi, P.-M., Klages, N., Kallio, J. P., Kursula, I., & Soldati-Favre, D. (2016). Structural and functional dissection of *Toxoplasma gondii* armadillo repeats only protein. *Journal of Cell Science*, *129*(5), 1031-1045. <https://doi.org/10.1242/jcs.177386>
- Nagamune, K., Beatty, W. L., & Sibley, L. D. (2007). Artemisinin Induces Calcium-Dependent Protein Secretion in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell*, *6*(11), 2147-2156. <https://doi.org/10.1128/EC.00262-07>
- Nelson, R. T., Hua, J., Pryor, B., & Lodge, J. K. (2001). Identification of virulence mutants of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* using signature-tagged mutagenesis. *Genetics*, *157*(3), 935-947.
- Ngô, H. M., Yang, M., Paprotka, K., Pypaert, M., Hoppe, H., & Joiner, K. A. (2003). AP-1 in *Toxoplasma gondii* Mediates Biogenesis of the Rhoptry Secretory Organelle from a Post-Golgi Compartment. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(7), 5343-5352. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208291200>
- Nichols, B. A., Chiappino, M. L., & O'Connor, G. R. (1983). Secretion from the Rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *Journal of Ultrastructure Research*, *83*(1), 85-98. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(83\)90067-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(83)90067-9)
- Nicolle, C., & Manceaux, L. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci*, *147*(736).
- Nicolle, C., & Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Acad Sci*, *148*(369).
- Nishi, M., Hu, K., Murray, J. M., & Roos, D. S. (2008). Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*, *121*(9), 1559-1568. <https://doi.org/10.1242/jcs.021089>
- Nyberg, D. (1978). Genetic Analysis of Trichocyst Discharge of the Wild Stocks of *Paramecium tetraurelia* *. *The Journal of Protozoology*, *25*(1), 107-112. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1978.tb03878.x>

Références

- Olbricht, K., Plattner, H., & Matt, H. (1984). Synchronous exocytosis in Paramecium cells. *Experimental Cell Research*, *151*(1), 14-20. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(84\)90351-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(84)90351-3)
- Ong, Y.-C., Reese, M. L., & Boothroyd, J. C. (2010). Toxoplasma Rhopty Protein 16 (ROP16) Subverts Host Function by Direct Tyrosine Phosphorylation of STAT6. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(37), 28731-28740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112359>
- Opitz, C. (2002). Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *The EMBO Journal*, *21*(7), 1577-1585. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1577>
- Opitz, Corinna, & Soldati, D. (2002). 'The glideosome' : A dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*: Mechanism of host cell invasion by the Apicomplexa. *Molecular Microbiology*, *45*(3), 597-604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03056.x>
- Orias, E., Flacks, M., & Satir, B. H. (1983). Isolation and ultrastructural characterization of secretory mutants of *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Cell Science*, *64*, 49-67.
- Ovcariikova, J., Lemgruber, L., Stilger, K. L., Sullivan, W. J., & Sheiner, L. (2017). Mitochondrial behaviour throughout the lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/srep42746>
- Panas, M. W., Ferrel, A., Naor, A., Tenborg, E., Lorenzi, H. A., & Boothroyd, J. C. (2019). Translocation of Dense Granule Effectors across the Parasitophorous Vacuole Membrane in *Toxoplasma*-Infected Cells Requires the Activity of ROP17, a Rhopty Protein Kinase. *mSphere*, *4*(4). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00276-19>
- Paredes-Santos, T. C., de Souza, W., & Attias, M. (2012). Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Structural Biology*, *177*(2), 420-430. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.028>
- Parussini, F., Coppens, I., Shah, P. P., Diamond, S. L., & Carruthers, V. B. (2010). Cathepsin L occupies a vacuolar compartment and is a protein maturase within the endo/exocytic system of

Références

- Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*, 76(6), 1340-1357.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07181.x>
- Peixoto, L., Chen, F., Harb, O. S., Davis, P. H., Beiting, D. P., Brownback, C. S., Ouloguem, D., & Roos, D. S. (2010). Integrative Genomic Approaches Highlight a Family of Parasite-Specific Kinases that Regulate Host Responses. *Cell Host & Microbe*, 8(2), 208-218.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.07.004>
- Pelletier, L., Stern, C. A., Pypaert, M., Sheff, D., Ngô, H. M., Roper, N., He, C. Y., Hu, K., Toomre, D., Coppens, I., Roos, D. S., Joiner, K. A., & Warren, G. (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 418(6897), 548-552. <https://doi.org/10.1038/nature00946>
- Periz, J., Whitelaw, J., Harding, C., Gras, S., Del Rosario Minina, M. I., Latorre-Barragan, F., Lemgruber, L., Reimer, M. A., Insall, R., Heaslip, A., & Meissner, M. (2017). *Toxoplasma gondii* F-actin forms an extensive filamentous network required for material exchange and parasite maturation. *ELife*, 6, e24119. <https://doi.org/10.7554/eLife.24119>
- Persson, E. K., Agnarson, A. M., Lambert, H., Hitziger, N., Yagita, H., Chambers, B. J., Barragan, A., & Grandien, A. (2007). Death Receptor Ligation or Exposure to Perforin Trigger Rapid Egress of the Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 179(12), 8357-8365. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8357>
- Pieperhoff, M. S., Pall, G. S., Jiménez-Ruiz, E., Das, S., Melatti, C., Gow, M., Wong, E. H., Heng, J., Müller, S., Blackman, M. J., & Meissner, M. (2015). Conditional U1 Gene Silencing in *Toxoplasma gondii*. *PLOS ONE*, 10(6), e0130356.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130356>
- Plattner, H., Reichel, K., Matt, H., Beisson, J., Lefort-Tran, M., & Pouphe, M. (1980). Genetic dissection of the final exocytosis steps in *Paramecium tetraurelia* cells : Cytochemical determination of Ca²⁺-ATPase activity over performed exocytosis sites. *Journal of Cell Science*, 46, 17-40.
- Plattner, Helmut (Éd.). (1993). *Membrane traffic in protozoa*. Jai Press.

Références

- Plattner, Helmut. (2014). Calcium Regulation in the Protozoan Model, *Paramecium tetraurelia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61(1), 95-114. <https://doi.org/10.1111/jeu.12070>
- Plattner, Helmut. (2017). Trichocysts- *Paramecium's* Projectile-like Secretory Organelles : Reappraisal of their Biogenesis, Composition, Intracellular Transport, and Possible Functions. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(1), 106-133. <https://doi.org/10.1111/jeu.12332>
- Plattner, Helmut, & Hentschel, J. (2006). Sub-Second Cellular Dynamics : Time-Resolved Electron Microscopy and Functional Correlation. In *International Review of Cytology* (Vol. 255, p. 133-176). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)55003-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)55003-X)
- Plattner, Helmut, & Kissmehl, R. (2003). Dense-core secretory vesicle docking and exocytotic membrane fusion in *Paramecium* cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1641(2-3), 183-193. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(03\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(03)00092-2)
- Plattner, Helmut, & Klauke, N. (2001). Calcium in ciliated protozoa : Sources, regulation, and calcium-regulated cell functions. In *International Review of Cytology* (Vol. 201, p. 115-208). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)01003-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)01003-8)
- Porchet, E., & Torpier, G. (1977). Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodiamantage. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 54(2), 101-124. <https://doi.org/10.1007/BF00380795>
- Poukchanski, A., Fritz, H. M., Tonkin, M. L., Trecek, M., Boulanger, M. J., & Boothroyd, J. C. (2013). *Toxoplasma gondii* Sporozoites Invade Host Cells Using Two Novel Paralogues of RON2 and AMA1. *PLoS ONE*, 8(8), e70637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070637>
- Que, X., Ngô, H., Lawton, J., Gray, M., Liu, Q., Engel, J., Brinen, L., Ghosh, P., Joiner, K. A., & Reed, S. L. (2002). The Cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, Toxopain-1, Is Critical for Parasite Invasion and Rhoptry Protein Processing. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25791-25797. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202659200>
- Radke, J. (2001). Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(2), 165-175. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00284-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00284-5)

Références

- Reiss, M., Viebig, N., Brecht, S., Fourmaux, M.-N., Soete, M., Di Cristina, M., Dubremetz, J. F., & Soldati, D. (2001). Identification and Characterization of an Escorter for Two Secretary Adhesins in *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Biology*, *152*(3), 563-578.
<https://doi.org/10.1083/jcb.152.3.563>
- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(2), 264-296.
<https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Rocha, S., De Keersmaecker, H., Hutchison, J. A., Vanhoorelbeke, K., Martens, J. A., Hofkens, J., & Uji-i, H. (2014). Membrane remodeling processes induced by phospholipase action. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, *30*(16), 4743-4751.
<https://doi.org/10.1021/la500121f>
- Rodrigues, C. O., Ruiz, F. A., Rohloff, P., Scott, D. A., & Moreno, S. N. J. (2002). Characterization of Isolated Acidocalcisomes from *Toxoplasma gondii* Tachyzoites Reveals a Novel Pool of Hydrolyzable Polyphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(50), 48650-48656.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M208990200>
- Rohloff, P., Miranda, K., Rodrigues, J. C. F., Fang, J., Galizzi, M., Plattner, H., Hentschel, J., & Moreno, S. N. J. (2011). Calcium Uptake and Proton Transport by Acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE*, *6*(4), e18390-e18390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018390>
- Roiko, M. S., & Carruthers, V. B. (2009). New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cellular Microbiology*, *11*(10), 1444-1452. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01357.x>
- Roiko, M. S., Svezhova, N., & Carruthers, V. B. (2014). Acidification Activates *Toxoplasma gondii* Motility and Egress by Enhancing Protein Secretion and Cytolytic Activity. *PLoS Pathogens*, *10*(11), e1004488. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004488>
- Rosowski, E. E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R. A., Jensen, K. D. C., & Saeij, J. P. J. (2011). Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule

Références

- protein. *Journal of Experimental Medicine*, 208(1), 195-212.
<https://doi.org/10.1084/jem.20100717>
- Rugarabamu, G., Marq, J.-B., Guérin, A., Lebrun, M., & Soldati-Favre, D. (2015). Distinct contribution of *Toxoplasma gondii* rhomboid proteases 4 and 5 to micronemal protein protease 1 activity during invasion : ROM4 and ROM5 contribute to MPP1 activity. *Molecular Microbiology*, 97(2), 244-262. <https://doi.org/10.1111/mmi.13021>
- Sabin, A. B., & Feldman, H. A. (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108(2815), 660-663.
<https://doi.org/10.1126/science.108.2815.660>
- Sassa, T., Harada, S., Ogawa, H., Rand, J. B., Maruyama, I. N., & Hosono, R. (1999). Regulation of the UNC-18–*Caenorhabditis elegans* Syntaxin Complex by UNC-13. *The Journal of Neuroscience*, 19(12), 4772-4777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-12-04772.1999>
- Satir, B., & Oberg, S. (1978). Paramecium fusion rosettes : Possible function as Ca²⁺ gates. *Science*, 199(4328), 536-538. <https://doi.org/10.1126/science.341312>
- Schaeffer, E. L., Bassi, F., Jr, & Gattaz, W. F. (2005). Inhibition of phospholipase A2 activity reduces membrane fluidity in rat hippocampus. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996), 112(5), 641-647. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0301-9>
- Schüler, H., & Matuschewski, K. (2006). Regulation of Apicomplexan Microfilament Dynamics by a Minimal Set of Actin-Binding Proteins. *Traffic*, 7(11), 1433-1439.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00484.x>
- Sheiner, L., Demerly, J. L., Poulsen, N., Beatty, W. L., Lucas, O., Behnke, M. S., White, M. W., & Striepen, B. (2011). A Systematic Screen to Discover and Analyze Apicoplast Proteins Identifies a Conserved and Essential Protein Import Factor. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002392.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002392>
- Shen, B., Buguliskis, J. S., Lee, T. D., & Sibley, L. D. (2014). Functional Analysis of Rhomboid Proteases during *Toxoplasma* Invasion. *mBio*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01795-14>

Références

- Sibley, L. D., Niesman, I. R., Parmley, S. F., & Cesbron-Delauw, M.-F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*, *108*, 1669-1667.
- Sidik, S. M., Hackett, C. G., Tran, F., Westwood, N. J., & Lourido, S. (2014). Efficient Genome Engineering of *Toxoplasma gondii* Using CRISPR/Cas9. *PLoS ONE*, *9*(6), e100450.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100450>
- Sidik, S. M., Huet, D., Ganesan, S. M., Huynh, M. H., Wang, T., Nasamu, A. S., Thiru, P., Saeij, J. P. J., Carruthers, V. B., Niles, J. C., & Lourido, S. (2016). A Genome-wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies Essential Apicomplexan Genes. *Cell*, *166*(6), 1423-1435.e12.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.019>
- Skillman, K. M., Daher, W., Ma, C. I., Soldati-Favre, D., & Sibley, L. D. (2012). *Toxoplasma gondii* Profilin Acts Primarily To Sequester G-Actin While Formins Efficiently Nucleate Actin Filament Formation *in Vitro*. *Biochemistry*, *51*(12), 2486-2495. <https://doi.org/10.1021/bi201704y>
- Skillman, K. M., Diraviyam, K., Khan, A., Tang, K., Sept, D., & Sibley, L. D. (2011). Evolutionarily Divergent, Unstable Filamentous Actin Is Essential for Gliding Motility in Apicomplexan Parasites. *PLoS Pathogens*, *7*(10), e1002280. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002280>
- Sloves, P.-J., Delhaye, S., Mouveaux, T., Werkmeister, E., Slomianny, C., Hovasse, A., Dilezitoko Alayi, T., Callebaut, I., Gaji, R. Y., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselear, A., Carruthers, V. B., & Tomavo, S. (2012). *Toxoplasma* Sortilin-like Receptor Regulates Protein Transport and Is Essential for Apical Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection. *Cell Host & Microbe*, *11*(5), 515-527. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.03.006>
- Soldati, D., & Boothroyd, J. (1993). Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science*, *260*(5106), 349-352.
<https://doi.org/10.1126/science.8469986>

Références

- Soldati, Dominique, Francois Dubremetz, J., & Lebrun, M. (2001). Microneme proteins : Structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, *31*, 1293-1302.
- Sonneborn, T. M. (1974). [Ciliate morphogenesis and its bearing on general cellular morphogenesis]. *Tsitologiia*, *16*(9), 1063-1088.
- Splendore A. (1908). Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. *Rev Soc Sci Sao Paulo*, *3*, 109-112.
- Steinfeldt, T., Könen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L. D., Hunn, J. P., & Howard, J. C. (2010). Phosphorylation of Mouse Immunity-Related GTPase (IRG) Resistance Proteins Is an Evasion Strategy for Virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biology*, *8*(12), e1000576. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000576>
- Stelzer, S., Basso, W., Benavides Silván, J., Ortega-Mora, L. M., Maksimov, P., Gethmann, J., Conraths, F. J., & Schares, G. (2019). *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals : Risk factors and economic impact. *Food and Waterborne Parasitology*, *15*. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037>
- Stojilkovic, S. S. (2005). Ca²⁺-regulated exocytosis and SNARE function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *16*(3), 81-83. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.02.002>
- Striepen, B., Yingxin He, C., Matrajt, M., Soldati, D., & Roos, D. S. (1998). Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *92*(2), 325-338. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00011-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00011-5)
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Darde, M.-L., Zhu, X.-Q., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., Dubey, J. P., & Sibley, L. D. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(15), 5844-5849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

Références

- Su, C., Zhang, X., & Dubey, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers : A high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, *36*(7), 841-848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>
- Suarez, C., Lentini, G., Ramaswamy, R., Maynadier, M., Aquilini, E., Berry-Sterkers, L., Cipriano, M., Chen, A. L., Bradley, P., Striepen, B., Boulanger, M. J., & Lebrun, M. (2019). A lipid-binding protein mediates rhoptry discharge and invasion in *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* parasites. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11979-z>
- Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., & Wardt, G. E. (1996). *Toxoplasma invasion : The parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore (cell capacitance/intracellular parasite/endocytosis)* (National Institutes of Health, p. 8413-8418).
- Tagaya, M., Genma, T., Yamamoto, A., Kozaki, S., & Mizushima, S. (1996). SNAP-25 is present on chromaffin granules and acts as a SNAP receptor. *FEBS Letters*, *394*(1), 83-86. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00932-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00932-5)
- Tagaya, M., Toyonaga, S., Takahashi, M., Yamamoto, A., Fujiwara, T., Akagawa, K., Moriyama, Y., & Mizushima, S. (1995). Syntaxin 1 (HPC-1) Is Associated with Chromaffin Granules. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(27), 15930-15933. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.27.15930>
- Tardieux, I., & Baum, J. (2016). Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. *Journal of Cell Biology*, *214*(5), 507-515. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605100>
- Thompson, J., Fernandez-Reyes, D., Sharling, L., Moore, S. G., Eling, W. M., Kyes, S. A., Newbold, C. I., Kafatos, F. C., Janse, C. J., & Waters, A. P. (2007). Plasmodium cysteine repeat modular proteins 1-4 : Complex proteins with roles throughout the malaria parasite life cycle. *Cellular Microbiology*, *9*(6), 1466-1480. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00885.x>
- Tobin, C. M., & Knoll, L. J. (2012). A Patatin-Like Protein Protects *Toxoplasma gondii* from Degradation in a Nitric Oxide-Dependent Manner. *Infection and Immunity*, *80*(1), 55-61. <https://doi.org/10.1128/IAI.05543-11>

Références

- Tonkin, M. L., Roques, M., Lamarque, M. H., Pugniere, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., & Boulanger, M. J. (2011). Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites : Insights from the Co-Structure of AMA1 with a RON2 Peptide. *Science*, *333*(6041), 463-467.
<https://doi.org/10.1126/science.1204988>
- Toonen, R. F., Kochubey, O., de Wit, H., Gulyas-Kovacs, A., Konijnenburg, B., Sørensen, J. B., Klingauf, J., & Verhage, M. (2006). Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *The EMBO Journal*, *25*(16), 3725-3737.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601256>
- Tosetti, N., Dos Santos Pacheco, N., Soldati-Favre, D., & Jacot, D. (2019). Three F-actin assembly centers regulate organelle inheritance, cell-cell communication and motility in *Toxoplasma gondii*. *ELife*, *8*, e42669. <https://doi.org/10.7554/eLife.42669>
- Trecek, M., Sanders, J. L., Elias, J. E., & Boothroyd, J. C. (2011). The Phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* Reveal Unusual Adaptations Within and Beyond the Parasites' Boundaries. *Cell Host & Microbe*, *10*(4), 410-419.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.004>
- Tsybin, L. M., & Turkewitz, A. P. (2017). The Co-regulation Data Harvester : Automating gene annotation starting from a transcriptome database. *SoftwareX*, *6*, 165-171.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2017.06.006>
- Turetzky, J. M., Chu, D. K., Hajagos, B. E., & Bradley, P. J. (2010). Processing and secretion of ROP13 : A unique *Toxoplasma* effector protein. *International Journal for Parasitology*, *40*(9), 1037-1044. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.02.014>
- Tyler, J. S., & Boothroyd, J. C. (2011). The C-Terminus of *Toxoplasma* RON2 Provides the Crucial Link between AMA1 and the Host-Associated Invasion Complex. *PLoS Pathogens*, *7*(2), e1001282-e1001282. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001282>

Références

- Van Houten, J. (2019). Paramecium Biology. In W. Tworzydło & S. M. Bilinski (Éds.), *Evo-Devo : Non-model Species in Cell and Developmental Biology* (Vol. 68, p. 291-318). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23459-1_13
- Venugopal, K., Chehade, S., Werkmeister, E., Barois, N., Periz, J., Lafont, F., Tardieux, I., Khalife, J., Langsley, G., Meissner, M., & Marion, S. (2020). Rab11A regulates dense granule transport and secretion during *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and parasite replication. *PLOS Pathogens*, *16*(5), e1008106-e1008106. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008106>
- Venugopal, K., & Marion, S. (2018). Secretory organelle trafficking in *Toxoplasma gondii* : A long story for a short travel. *International Journal of Medical Microbiology*, *308*(7), 751-760. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.07.007>
- Venugopal, K., Werkmeister, E., Barois, N., Saliou, J.-M., Poncet, A., Huot, L., Sindikubwabo, F., Hakimi, M. A., Langsley, G., Lafont, F., & Marion, S. (2017). Dual role of the *Toxoplasma gondii* clathrin adaptor AP1 in the sorting of rhoptry and microneme proteins and in parasite division. *PLOS Pathogens*, *13*(4), e1006331. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006331>
- Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Südhof, T. C., Neher, E., & Verhage, M. (2001). Munc18-1 Promotes Large Dense-Core Vesicle Docking. *Neuron*, *31*(4), 581-592. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00391-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00391-9)
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., & Südhof, T. C. (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, *388*(6642), 593-598. <https://doi.org/10.1038/41580>
- Weiss, L. M., & Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis : A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, *39*(8), 895-901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>
- Wilkins, M. F., & O'Connell, E. (1983). Effect on lambing percentage of vaccinating ewes with *Toxoplasma gondii*. *New Zealand Veterinary Journal*, *31*(10), 181-181. <https://doi.org/10.1080/00480169.1983.35017>

Références

- Wilson, S. K., & Knoll, L. J. (2018). Patatin-like phospholipases in microbial infections with emerging roles in fatty acid metabolism and immune regulation by Apicomplexa : Apicomplexa patatin-like phospholipases. *Molecular Microbiology*, *107*(1), 34-46.
<https://doi.org/10.1111/mmi.13871>
- Wolf, Cowen, D., Paige, B. H., & Abner. (1939). Toxoplasmic encephalomyelitis III: A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. *The American Journal of Pathology*, *15*, 657-705.
- Wu, L., Wang, X., Li, Y., Liu, Y., Su, D., Fu, T., Guo, F., Gu, L., Jiang, X., Chen, S., & Cao, J. (2016). Toxoplasma gondii ROP18 : Potential to manipulate host cell mitochondrial apoptosis. *Parasitology Research*, *115*(6), 2415-2422. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4993-6>
- Xiong, J., Lu, X., Lu, Y., Zeng, H., Yuan, D., Feng, L., Chang, Y., Josephine, B., Gorovsky, M., Fu, C., & Miao, W. (2011). Tetrahymena Gene Expression Database (TGED) : A resource of microarray data and co-expression analyses for Tetrahymena. *Science China Life Sciences*, *54*(1), 65-67.
<https://doi.org/10.1007/s11427-010-4114-1>
- Yang, Z., Yang, F., Zhang, D., Liu, Z., Lin, A., Liu, C., Xiao, P., Yu, X., & Sun, J.-P. (2017). Phosphorylation of G Protein-Coupled Receptors : From the Barcode Hypothesis to the Flute Model. *Molecular Pharmacology*, *92*(3), 201-210. <https://doi.org/10.1124/mol.116.107839>
- Yoon, T.-Y., & Munson, M. (2018). SNARE complex assembly and disassembly. *Current Biology*, *28*(8), R397-R401. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.005>
- Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Mirendil, H., & Chun, J. (2015). Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system. *Neuron*, *85*(4), 669-682. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.009>
- Zhang, M., Joyce, B. R., Sullivan, W. J., & Nussenzweig, V. (2013). Translational Control in Plasmodium and Toxoplasma Parasites. *Eukaryotic Cell*, *12*(2), 161-167.
<https://doi.org/10.1128/EC.00296-12>
- Zhou, X. W., Blackman, M. J., Howell, S. A., & Carruthers, V. B. (2004). Proteomic Analysis of Cleavage Events Reveals a Dynamic Two-step Mechanism for Proteolysis of a Key Parasite Adhesive

Références

Complex. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(6). <https://doi.org/10.1074/mcp.M300123-MCP200>

Zucker, R. S., Kullmann, D. M., & Kaeser, P. S. (2014). Release of Neurotransmitters. In *From Molecules to Networks* (p. 443-488). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397179-1.00015-4>

ANNEXE

RESEARCH ARTICLE

A *Toxoplasma gondii* patatin-like phospholipase contributes to host cell invasion

Sarah K. Wilson^{1‡}, Justine Heckendorn^{2‡}, Bruno Martorelli Di Genova^{1‡}, Lindsey L. Koch¹, Peggy J. Rooney³, Naomi Morrisette⁴, Maryse Lebrun², Laura J. Knoll^{1*}

1 Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Wisconsin—Madison, Linden Drive, Madison, Wisconsin, United States of America, **2** INSERM, Université Montpellier, Montpellier, France, **3** Stratatech Corporation, Charmany Drive, Madison, Wisconsin, United States of America, **4** Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California Irvine, Irvine, California, United States of America

‡ These authors share first authorship on this work.

* ljkroll@wisc.edu



OPEN ACCESS

Citation: Wilson SK, Heckendorn J, Martorelli Di Genova B, Koch LL, Rooney PJ, Morrisette N, et al. (2020) A *Toxoplasma gondii* patatin-like phospholipase contributes to host cell invasion. PLoS Pathog 16(7): e1008650. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008650>

Editor: Michael J. Blackman, Francis Crick Institute, UNITED KINGDOM

Received: August 20, 2019

Accepted: May 22, 2020

Published: July 6, 2020

Copyright: © 2020 Wilson et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by the National Institutes of Health (NIH) National Research Service Award T32 AI007414 (SKW), 1F32AI065023-01A2 (PJR), and R01AI144016-01 (LJK), Department of Defense, Air Force office of Scientific Research, National Defense Science and Engineering Graduate Fellowship (32 CFR 168a, SKW), Laboratoires d'Excellence ARCANE,

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that can invade any nucleated cell of any warm-blooded animal. In a previous screen to identify virulence determinants, disruption of gene TgME49_305140 generated a *T. gondii* mutant that could not establish a chronic infection in mice. The protein product of TgME49_305140, here named TgPL3, is a 277 kDa protein with a patatin-like phospholipase (PLP) domain and a microtubule binding domain. Antibodies generated against TgPL3 show that it is localized to the apical cap. Using a rapid selection FACS-based CRISPR/Cas-9 method, a TgPL3 deletion strain (Δ TgPL3) was generated. Δ TgPL3 parasites have defects in host cell invasion, which may be caused by reduced rhoptry secretion. We generated complementation clones with either wild type TgPL3 or an active site mutation in the PLP domain by converting the catalytic serine to an alanine, Δ TgPL3::TgPL3^{S1409A} (S1409A). Complementation of Δ TgPL3 with wild type TgPL3 restored all phenotypes, while S1409A did not, suggesting that phospholipase activity is necessary for these phenotypes. Δ TgPL3 and S1409A parasites are also virtually avirulent *in vivo* but induce a robust antibody response. Vaccination with Δ TgPL3 and S1409A parasites protected mice against subsequent challenge with a lethal dose of Type I *T. gondii* parasites, making Δ TgPL3 a compelling vaccine candidate. These results demonstrate that TgPL3 has a role in rhoptry secretion, host cell invasion and survival of *T. gondii* during acute mouse infection.

Author summary

Toxoplasma gondii is a eukaryotic parasite commonly found in warm-blooded animals worldwide. Successful replication of *T. gondii* within the host relies on its sophisticated cell invasion mechanism. Previous studies found that disruption of the *T. gondii* gene TgME49_305140 generated a mutant that could not establish a chronic infection in mice.

ParaFrap ANR-11-LABX-0024 (ML), and the Morgridge Metabolism Interdisciplinary Fellowship from the Morgridge Institute for Research (BMDG). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: PJR is currently employed by the Stratatech Corporation. Her affiliation with this company did not affect this study in any way. This affiliation does not alter our adherence to all PLOS Pathogens policies on sharing data and materials. The other authors have declared that no competing interests exist.

The protein product of this gene, named TgPL3, is large with both patatin-like phospholipase and microtubule binding domains. Here we show that TgPL3 is localized to the apical end of *T. gondii*, which is used for invasion. A mutant *T. gondii* strain with a deletion of TgPL3 (Δ TgPL3) was generated. Δ TgPL3 parasites are defective for host cell invasion and do not cause disease in mice, even at high doses. Complementation of the TgPL3 gene back into Δ TgPL3 parasites repairs the invasion and mice infection defects. Moreover, complementation of Δ TgPL3 with a point mutation in the active site of the phospholipase domain (S1409A) did not rescue the invasion and mouse infection defects, suggesting the PLP domain is responsible for these phenotypes. Vaccination of mice with Δ TgPL3 and S1409A parasites protected them against lethal challenge with *T. gondii*, highlighting the potential of Δ TgPL3 as a vaccine strain.

Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that can infect all warm-blooded animals and any nucleated cell within the host. *T. gondii* is a member of the Apicomplexa phylum, which includes *Plasmodium spp.*, the causative agent of malaria, and *Cryptosporidium*, one of the leading causes of waterborne disease outbreaks. Worldwide, *T. gondii* infects an estimated 30–50% of humans [1], which are dead-end intermediate hosts. The sexual cycle of *T. gondii* is restricted to the feline intestinal epithelium, from which *T. gondii* is excreted as oocysts in feces. The asexual cycle of *T. gondii* can occur in any warm-blooded animal and has two developmental stages: a rapidly replicating form called the tachyzoite and a slow growing stage called the bradyzoite. *T. gondii* is acquired orally either by ingestion of oocyst-contaminated vegetables or other foods, or by eating bradyzoite cyst-harboring meat products. Upon infection of an intermediate host, cyst and oocyst stages differentiate into the tachyzoite form and disseminate throughout the host before transitioning to the bradyzoite form. Bradyzoite-containing cysts reside in the brain and muscle tissue, and represent the long-term chronic phase of infection. Most infections are asymptomatic, but immunocompromised persons are at risk for severe primary infections or reactivation of a chronic infection that can lead to encephalitis or death. To date, no medications are available that can clear the chronic stage of *T. gondii*.

The *T. gondii* lytic cycle begins with a complex invasion mechanism. Gliding motility propels the parasite to find permissive host membranes [2]. Upon initial attachment, a tighter interaction is enabled by the formation of the moving junction (MJ). The MJ is a complex of the microneme protein apical membrane antigen 1 (AMA1) and rhoptry neck (RON) proteins, which are secreted from apical parasite organelles called micronemes and rhoptries, respectively [3]. While the RON proteins are typically part of the invasion machinery, the rhoptry bulb (ROP) proteins secreted during this process can modulate the host immune and metabolic pathways to be more favorable for parasite survival [4]. The parasite moves through the MJ, invaginating the host cell membrane to create a parasitophorous vacuole in which the parasite will replicate.

Previously, a signature tagged mutagenesis (STM) screen identified insertional *T. gondii* mutants that showed a decrease in chronic cyst burden compared to wild type parasites *in vivo* [5]. One of the identified mutants corresponded to TgME49_305140, annotated as a patatin-like phospholipase (PLP) domain containing protein, and reported here as TgPL3. PLP enzymes were first discovered in potato tubers and played a role in storage [6, 7], but these enzymes have since been implicated in both lipid metabolism and inflammation in plants, animals, and more recently microorganisms. Bacterial PLPs have phospholipase activity and are

virulence factors [8, 9]. There are many PLP domain containing proteins across the Apicomplexa phylum and six putative PLP enzymes in *T. gondii*, two of which have been investigated [8]. The first described *T. gondii* PLP, named TgPL1, is critical for survival of parasites in activated macrophages [10]. During macrophage activation and bradyzoite cyst development, TgPL1 changes location from within punctate vesicles in the cytoplasm to the parasitophorous vacuole membrane [11, 12]. In late chronic infection, mice infected with Δ TgPL1 parasites had increased expression of inflammatory cytokines and fewer brain lesions from reactivated cysts compared to wildtype-infected mice [13]. Another *T. gondii* PLP, TgPL2, was shown to localize to the apicoplast and play a critical role in lipid homeostasis within that organelle [14]. Knock-down of TgPL2 led to excessive accumulation of membranes around the apicoplast, altered the lipid profile of the parasite, and resulted in parasite death over time.

Here we present the functional characterization of TgPL3. Along with the PLP domain, TgPL3 contains a microtubule binding domain and is localized in the apical end of the parasite. Δ TgPL3 parasites have reduced host cell invasion, which may be caused by a defect in rhoptry secretion. Δ TgPL3 parasites are also virtually avirulent *in vivo*, with reduced cytokine stimulation and parasitemia. Mutation of the active site serine recapitulated the *in vivo* and *in vitro* defects, suggesting that phospholipase activity is responsible for rhoptry secretion and invasion. These results show that TgPL3 plays a role in invasion of host cells, unique from the first two characterized PLPs.

Results

TgPL3 has predicted microtubule binding and patatin-like phospholipase domains

Sequence and structural alignment of the 277kDa TgPL3 protein revealed a PLP domain predicted to have phospholipase A₂ (PLA₂) activity and a MIP-T3 microtubule-binding domain (MtBD) surrounded by polyserine stretches (Fig 1A), which may act as flexible linkers allowing the binding domain to be accessible to its target [15]. PLP domains include a glycine-rich oxyanion hole, a catalytic serine-aspartate dyad where the serine falls within the lipase motif G-X-S-X-G and a conserved proline between the serine and aspartate (Fig 1B). Humans have nine predicted PLPs and all of these PLPs contain the catalytic serine-aspartate dyad [16]. To further analyze the PLP potential of TgPL3, we threaded the protein sequence of its PLP domain onto the crystal structure for the plant PLP [17]. The TgPL3 PLP domain aligns with the plant model to form an active site (Fig 1C).

TgPL3 localizes to the apical end of *T. gondii*

The previous two PLP genes characterized in *T. gondii* had unique localizations and functions. To localize TgPL3, we generated antibodies against TgPL3 by immunizing mice with either a wheatgerm-purified PLP domain (Fig 2) or three different synthesized peptides (S1A Fig). All antibodies generated showed TgPL3 localizing to the apical end of intracellular RH Δ Ku80 Δ HPT parasites. Counter staining with MIC2 antibodies revealed TgPL3 localizes above the micronemes (Fig 2A, S1B). We next examined the apical ring and conoid regions further using RNG1-YFP and CAP1-YFP fusion RH *T. gondii* strains [18,19]. In intracellular parasites, TgPL3 localizes below both TgRNG1 and TgCAP1 (Fig 2B & 2C). However, in extracellular parasites where conoid extrusion is induced, TgPL3 partially extends out past the apical ring along with the conoid (Fig 2D).

As described above, TgPL3 has a predicted microtubule-binding domain (Fig 1A). To examine cytoskeleton association, we extracted the cytoskeleton of extracellular parasites in

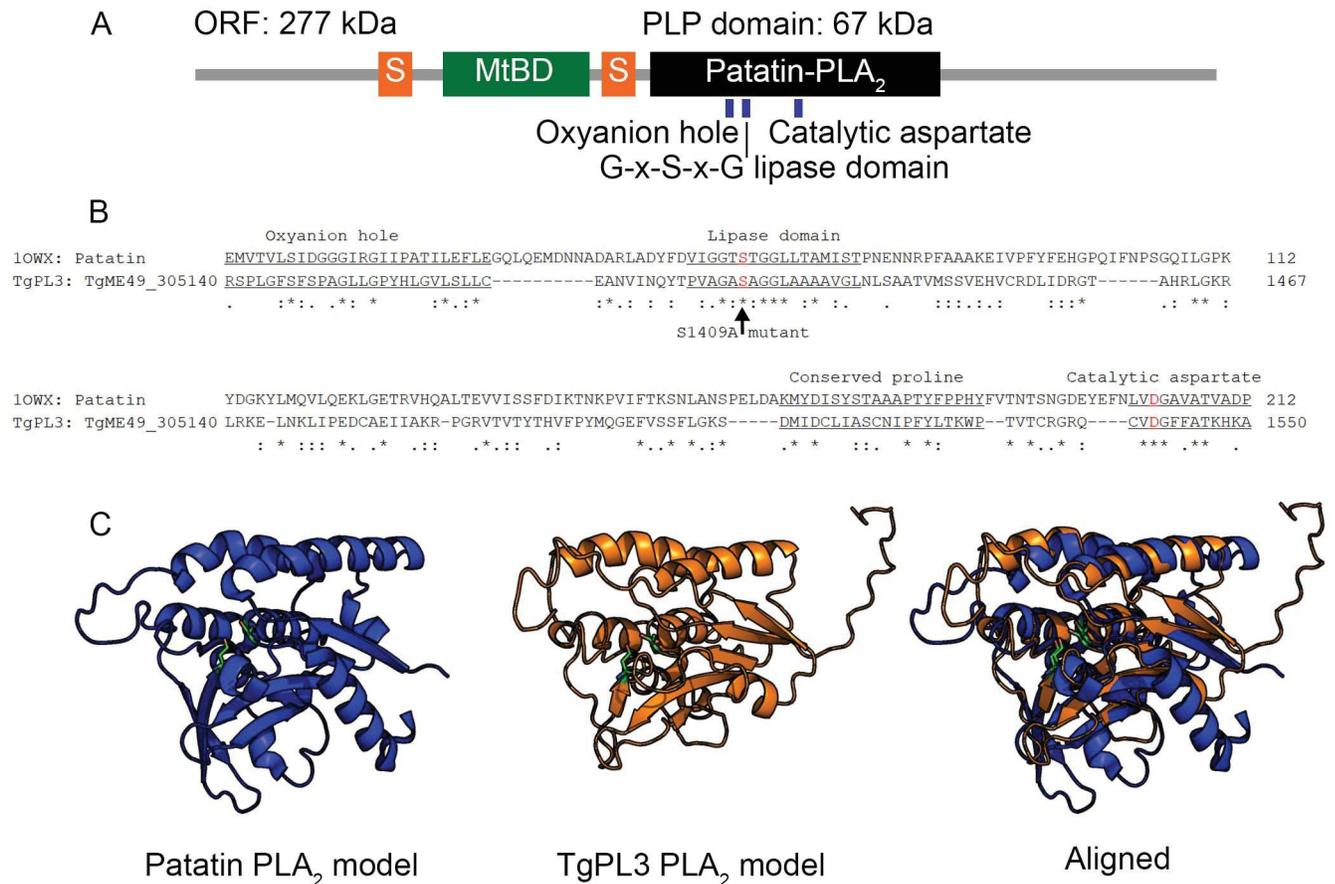


Fig 1. Predicted domains of TgPL3 based on sequence and structural alignments. (A) In orange, two serine-rich domains (S) flank the microtubule binding domain (MtBD) in green. The first serine-rich domain contains 34 consecutive serines and the second contains 37 serines interrupted by 2 prolines and 2 alanines. The putative PLP domain is shown in black. (B) The PLP domain contains all the necessary conserved amino acids for activity based on sequence alignment. The known conserved patatin motifs are underlined and catalytic S/A dyad are colored red. The serine to alanine mutation (S1409A) is indicated by an arrow. (C) Structural alignment of the TgPL3 PLP domain (orange) to the patatin PLA₂ crystal structure (blue) predicts correct folding to form the active site. The secondary and tertiary structures of the TgPL3 PLP domain were predicted using I-TASSER and the resulting model was aligned to the PDB model of patatin (1OWX) in PyMOL. The catalytic serine and aspartate dyad are shown in green in each model.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008650.g001>

deoxycholate (DOC) detergent. When *T. gondii* are lysed with DOC, only the cytoskeleton and its tightly bound proteins remain [18]. After DOC extraction, TgPL3 colocalized to the apical end, identified using counterstaining for β-tubulin (Fig 2E and S2 Fig). Thus, TgPL3 is localized to the apical cap region of the parasite (schematized in Fig 2F).

Purification of the TgPL3 patatin-like domain and testing for PLA₂ activity

To test if TgPL3 had PLA₂ activity we first purified the 67 kDa PLP domain. Attempts to express the PLP domain in *E. coli* were unsuccessful, likely due to the toxicity of the protein in live cells. We then switched to an in vitro transcription and translation system to express the TgPL3 PLP domain. The domain was successfully expressed in wheat germ extract; however, multiple attempts to show PLA₂ activity using a thin layer chromatography assay were unsuccessful. It is likely that expressing the 67 kDa PLP domain apart from the rest of the 277kDa TgPL3 protein creates a misfolded protein or otherwise inactive protein. For example, the

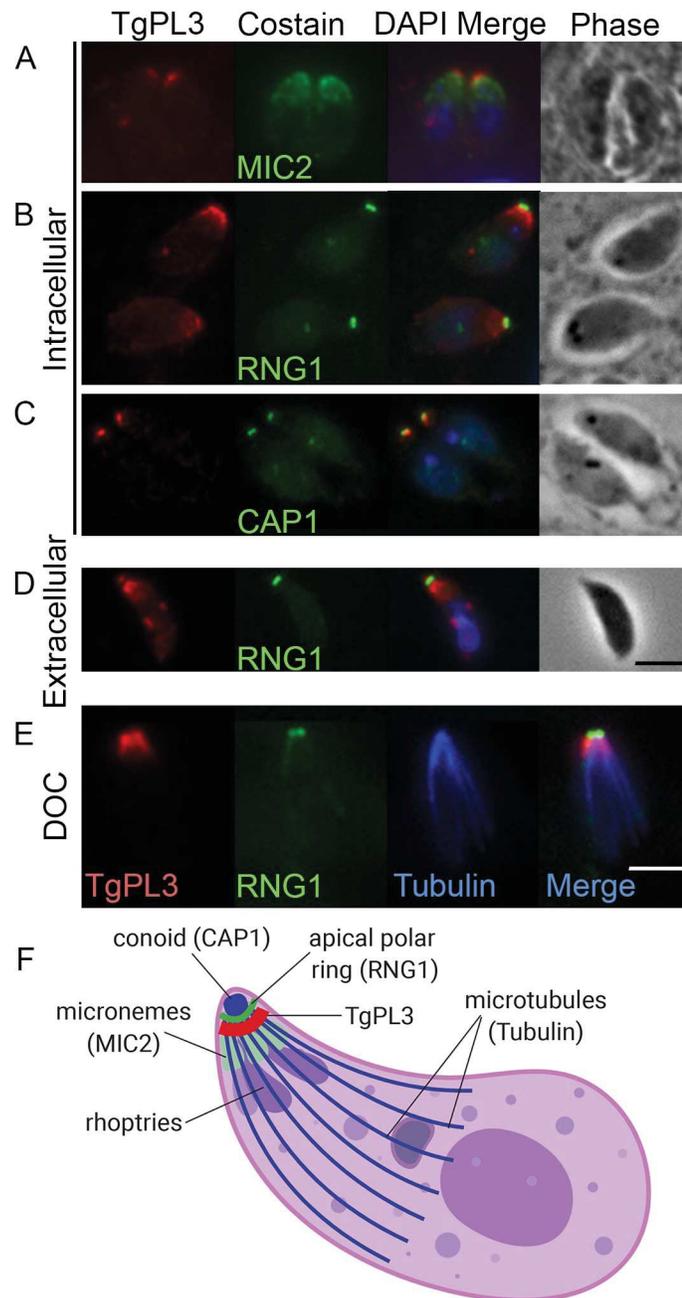


Fig 2. TgPL3 localizes to the apical end of tachyzoites. Top three panels show immunofluorescence of TgPL3 (red) in intracellular tachyzoites co labeled with (A) MIC2, (B) RNG1 or (C) CAP1 (green). Bottom two panels show TgPL3 localization in extracellular tachyzoites after (D) induced conoid extrusion or (E) deoxycholate extraction (DOC). (F) Schematic showing costain localization in intracellular parasites (created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)). Images for panels A, B, C and D were taken under the same magnification and the scale bars in the lower right corners equal 5 μm.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008650.g002>

Pseudomonas aeruginosa PLP requires ubiquitin or ubiquitinated proteins as cofactor for in vitro activity [20]. To address potential PLA₂ activity for this manuscript, we engineered a TgPL3 complementation construct with TgPL3 containing a single point mutation that changes the predicted catalytic serine in the lipase domain to an alanine (Fig 1B).

Rapid fluorescence activated cells sorting (FACS) needed to obtain TgPL3 deletion

The TgPL3 mutant discovered in the STM screen [5] contained an insertion in the TgME49_305140 promoter that created a fusion transcript of the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) and TgPL3 coding regions controlled by the constitutively active α -tubulin promoter (S3 Fig). To assess the role of TgPL3 in pathogenesis, we deleted the entire open reading frame (ORF) in RH Δ Ku80 Δ HPT parasites by CRISPR. Initial attempts to delete the TgPL3 ORF from *T. gondii* strain ME49 Δ HPT using hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPT) as the positive selectable marker and uracil phosphoribosyl transferase (UPT) as the negative selectable marker were unsuccessful. While PCR indicated a population of successful TgPL3 deletion mutants in newly transfected parasites, these deletion mutants were rapidly outcompeted by drug-resistant random insertion mutants during drug selection. The recent genome-wide CRISPR screening database revealed this gene has a phenotype score of -3.48, which predicts that this gene is fitness conferring during infection of human fibroblasts [21].

Therefore, we created a rapid screening process using fluorescent markers in place of drug-selectable markers. This method uses mCherry as a positive marker and GFP as a negative marker (Fig 3A). After transfection, the parasites were allowed to invade and replicate for 2–3 days without serial passage, whereupon they were sorted by flow cytometry. Parasites that were mCherry positive and GFP negative were sorted directly into 96-well plates for clone isolation. In addition, the RH Δ Ku80 Δ HPT *T. gondii* strain, which lack the non-homologous end-joining protein Ku80, was used for knockout generation to virtually eliminate random insertion of the DNA construct [22]. After transfection into the RH Δ Ku80 Δ HPT strain, we saw mCherry positive and GFP negative populations during FACS (S4 Fig), whereas transfection into ME49 Δ HPT parasites yielded primarily random insertion mutants rather than knockout clones. We isolated several TgPL3 deletion (Δ TgPL3) clones from the RH Δ Ku80 Δ HPT transfection. These clones were confirmed to be TgPL3 deletions by Southern blot using a probe specific to the 5' flanking region of TgME49_305140, which was present in both the endogenous and knockout loci (Fig 3B). We also confirmed the deletion by immunofluorescence assay using the anti-TgPL3 antibody and found that TgPL3 was present in the apical end in parental parasites but not the Δ TgPL3 mutants (Fig 3C).

Complementation of Δ TgPL3 parasites

To ensure the *in vitro* phenotypes associated with loss of TgPL3 were not due to CRISPR off-target effects, we complemented the Δ TgPL3 parasites. We generated Δ TgPL3::TgPL3 clones (complement) by targeting *TgPL3* cDNA back into the endogenous locus using a CRISPR/Cas9 plasmid with a mCherry specific guide RNA and screened for loss of mCherry expression. We also created a Δ TgPL3::TgPL3^{S1409A} complement strain (S1409A) with an active site mutation in the PLP domain by converting the catalytic serine to an alanine (Fig 1C). Complement clones were sorted by flow cytometry and screened by southern blot (Fig 3B). Restoration of TgPL3 protein was confirmed by immunofluorescence assay (Fig 3C).

Δ TgPL3 parasites have an invasion but not an attachment defect

The difficulty obtaining Δ TgPL3 parasites and a -3.48 CRISPR score [21] suggested there would be a severe growth defect with the loss of TgPL3. Indeed, we regularly passaged more Δ TgPL3 parasites than parental strain to maintain synchronized cultures. We first analyzed the internal replication rate of each strain by counting the number of parasites per vacuole at

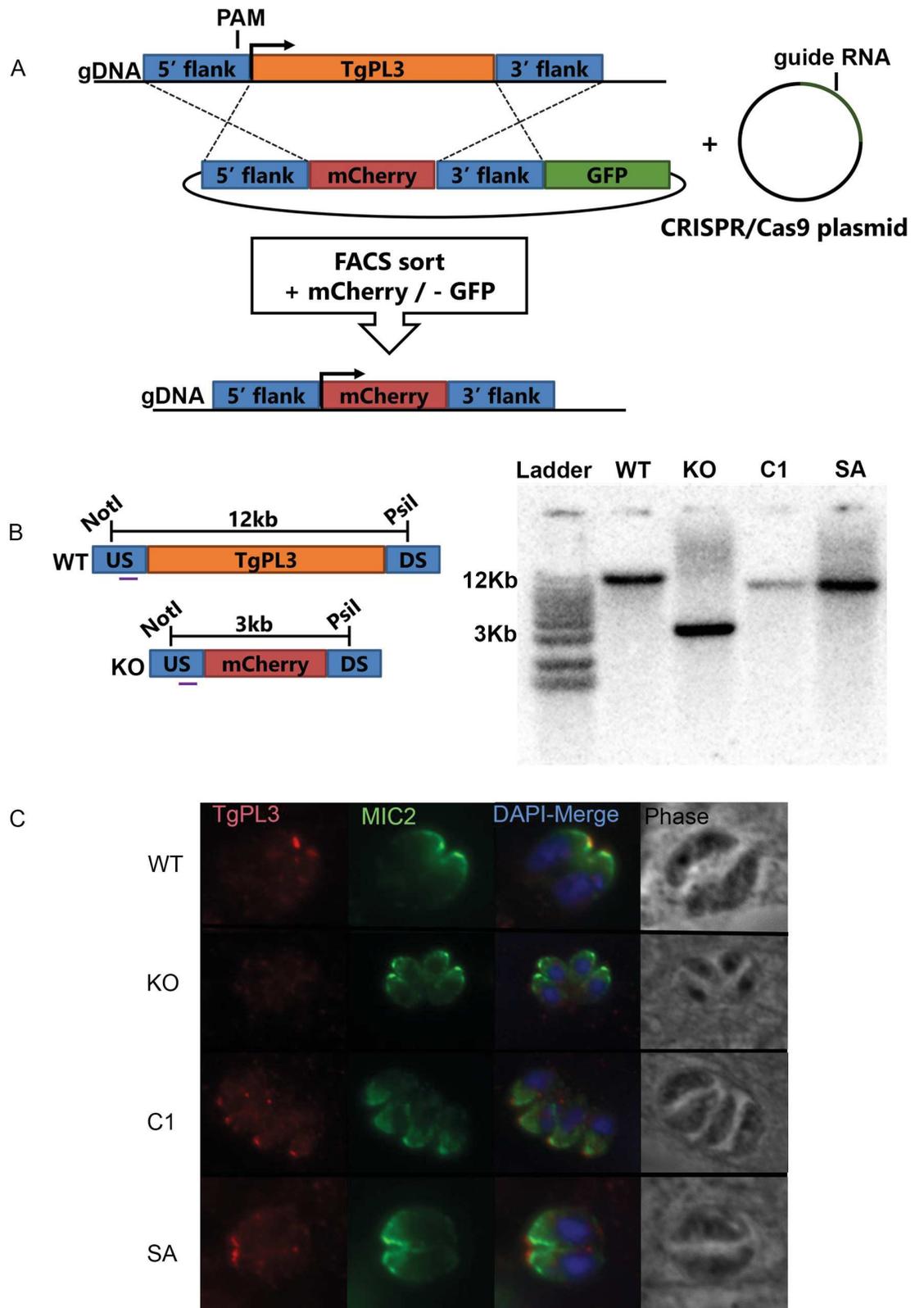


Fig 3. Deletion of TgPL3 from RHΔKu80 parasites using FACS sorting. (A) Schematic for the targeted knockout of the TgPL3 gene in *T. gondii* by double homologous crossover. Parental strain RHΔKu80ΔHXGPRT parasites were electroporated with the

CRISPR/Cas9 plasmid containing gRNA targeting the 5' end of TgPL3 and the knockout plasmid containing TgPL3 5' and 3' flanking regions surrounding mCherry which allows for sorting mCherry positive parasites using FACS. Sorting GFP negative clones in tandem ensures a double crossover event. (B) Genomic DNA of clones were screened by southern blot using a probe targeting the 5' upstream (US) flanking region of TgPL3. Parental RH Δ ku80 Δ HXGPRT (WT), complement (C1) and S1409A (SA) parasites show a 12kb band, Δ TgPL3 (KO) strains show a 3kb band. (C) Parasite strains were further analyzed by immunofluorescence of TgPL3 (red) co-labeled with MIC2 (green). Images were taken under the same magnification and the scale bar in the lower right corner equals 5 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008650.g003>

18 and 26 hours post-invasion. We did not observe significant differences in the replication rates of invaded parasites between the parental, knockout and complement strains (Fig 4A and S5 Fig). However, plaque assay, which measures parasite growth over multiple lytic cycles, showed fewer and smaller plaques in Δ TgPL3 and S1409A compared to WT and complement strains (Fig 4B and S6A Fig). The localization of TgPL3 to the apical end of the parasite suggested involvement in invasion, so we then evaluated the ability of the mutants to invade using the red/green invasion assay [23]. The parasites were allowed to infect fibroblasts for 5 minutes prior to fixation and extracellular and intracellular parasite were quantified by differential staining. A significantly lower percent of Δ TgPL3 parasites invaded the host cell compared to the parental strain (Fig 4C and S7 Fig). This invasion defect was restored by complementation with TgPL3 but not S1409A, highlighting that phospholipase activity is likely involved in the invasion phenotype. Because the invasion assay is biased based on the ability of the parasite to successfully attach prior to invasion, we analyzed the ability of the parasites to attach using the

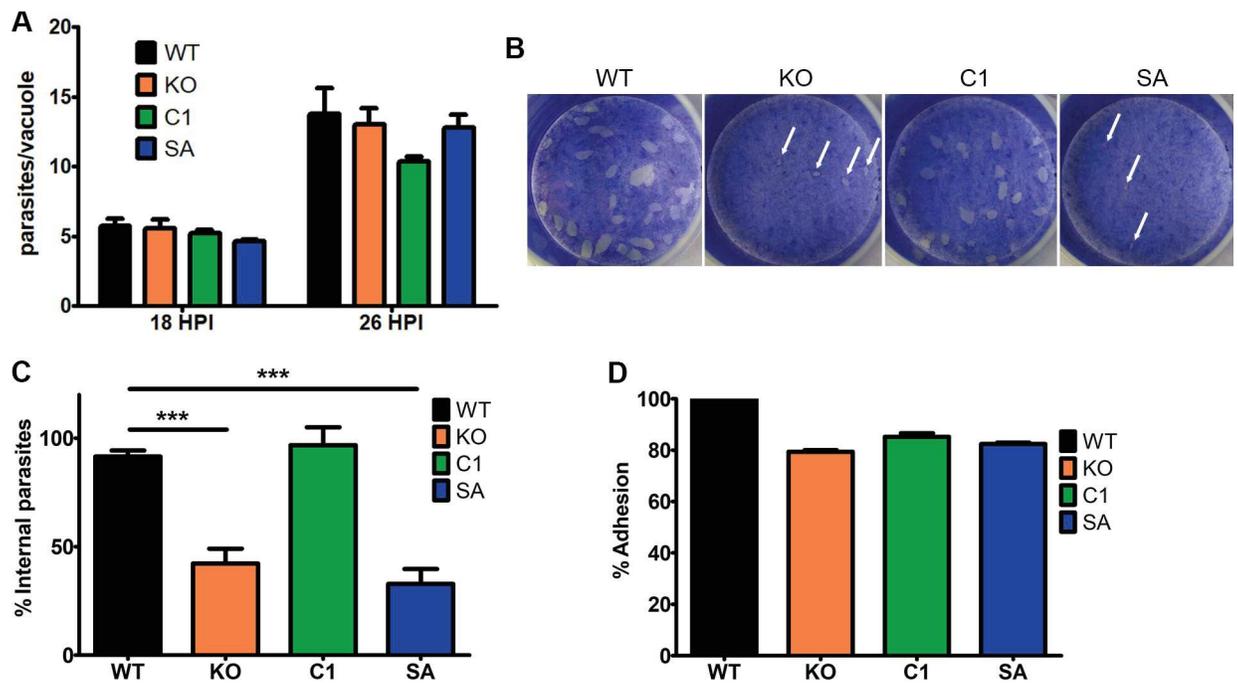


Fig 4. TgPL3 is critical for invasion but not attachment. (A) Triplicate monolayers of HFFs were infected with 3.4×10^4 *T. gondii* parasites. At 18 or 26 hours post infection, tachyzoites per vacuole were scored in at least 100 randomly encountered vacuoles per replicate. Average tachyzoites per vacuole is shown at each time point. P value was nonsignificant in a two tailed t-test compared to WT. (B) 9 days post infection, HFF monolayers were stained with crystal violet to reveal *T. gondii* plaque formation. White arrows indicate the small plaques created by the KO and SA parasites. (C) The percentage of parasites that were successfully able to invade the host cell was determined using the red/green invasion assay [21]. Four independent experiments were performed in triplet, and the combined results are shown here. *** $p < 0.0001$. (D) The percentage of parasites that were attached to glutaraldehyde fixed host cells was examined but no significant differences were seen. Shown here the combined results from two independent experiments performed in triplet.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008650.g004>

glutaraldehyde fixed host cell assay [24]. We saw no difference in the attachment between the parental, knockout and complement strains (Fig 4D and S8 Fig). As a negative control we incubated all parasites strains with BAPTA-AM and saw no parasite attachment (S8 Fig). Finally, when we induced the egress of intracellular parasites, there was no difference in the ability of each strain to successfully egress from the host cell (S6B Fig).

Invasion defect of Δ TgPL3 is likely linked with reduced rhoptry and not microneme secretion

Invasion involves sequential secretion from micronemes and rhoptries. Therefore, to further investigate the mechanism behind the invasion defect of Δ TgPL3, we analyzed the ability of the parasites to discharge the content of both organelles. We induced the secretion of microneme proteins AMA1 and MIC2 by either ethanol and serum [25] or propranolol, and then monitored protein secretion by western blot. We saw no apparent difference in the ability of each strain to secrete AMA1 or MIC2 (Fig 5A, 5B and S6B, S6C Fig). We also determined rhoptry secretion in cytochalasin D (CytD) treated parasites, which inhibits actin polymerization and blocks invasion [26]. During invasion, rhoptry proteins are injected into the host cell and in CytD-treated parasites, clusters of ROP1-positive vesicles, called evacuoles, are visible inside the host cell [27]. We evaluated the formation of evacuoles in the different parasite lines and found that the Δ TgPL3 and S1409A parasites were significantly reduced in rhoptry secretion (Fig 5C and S9 Fig).

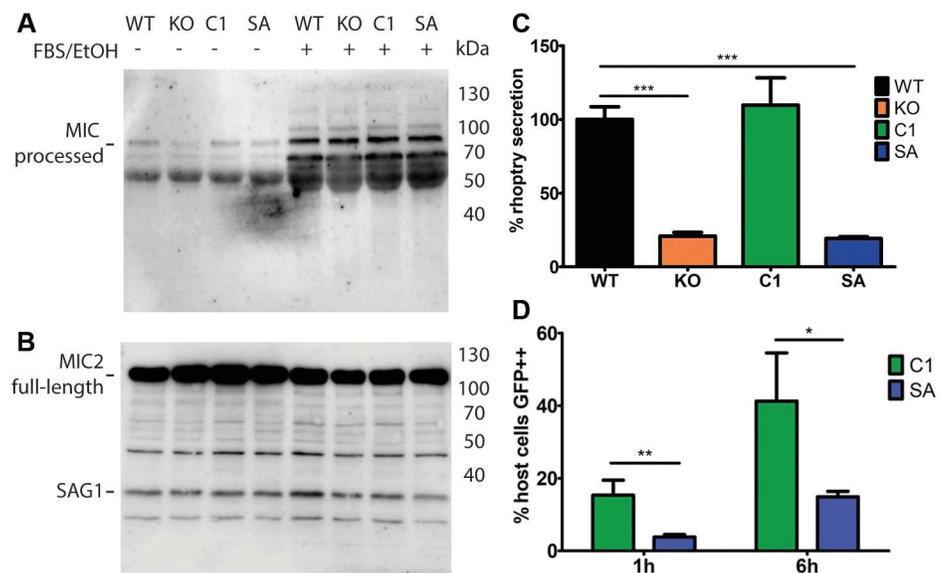


Fig 5. TgPL3 enhances rhoptry but not microneme secretion. Excreted/secreted antigen (ESA) was induced in 1×10^8 parasites by the addition of 3% fetal bovine serum and 1% ethanol (FBS/EtOH). Supernatant (A) and pellet (B) were run on a 12% SDS-page gel, transferred to PVDF membranes and simultaneously probed with rabbit anti-MIC2 and mouse anti-SAG1 (monoclonal DG52). (A) Western blotting showing processed MIC-2 (95–100 kDa) and no SAG1. Size markers are indicated on the right side in kDa. (B) Pellet or loading control shows the full-size MIC-2 band (115 kDa) and a lower band corresponding to SAG1 (30 kDa). (C) Quantification of rhoptry discharge during evacuole formation. Triplicate monolayers of HFFs were infected with 5×10^6 parasites that were pre-treated with cytochalasin D. After a 15-minute incubation, the parasites were stained with a mouse α -SAG1 antibody and a rabbit α -ROP1 antibody. After counting, percent rhoptry secretion was normalized to the WT strain. Three independent experiments were performed, and the combined results are shown here. *** $p < 0.001$ (D) Rhoptry secretion by the SeCreEt assay [28] and the number of GFP++ host cells was quantified by FACS analysis, as shown on the y-axis. After 1 hour of invasion, Δ TgPL3 parasites complemented with S1409A showed a significant difference in rhoptry secretion compared to parasites complemented with the WT gene (** $p < 0.01$). After 6 hours, this difference was less significant (* $p < 0.05$). Shown here the results from one of two independent experiments performed in triplet.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008650.g005>

We also determined rhoptry secretion by the SeCreEt assay, which uses rhoptry protein toxofilin coupled to Cre-recombinase to induce GFP expression in DsRed host cells [28]. The complement (C1) and S1409A (SA) parasites were allowed to invade the host cells for either 1 or 6 hours before changing the media to remove any remaining external parasites. After 24 hours, infected cells were trypsinized and the percentage of GFP expressing cells (successful rhoptry secretion) was determined by FACS. With 1 hour of invasion, Δ TgPL3 parasites complemented with the WT gene had significantly more GFP positive host cells than the Δ TgPL3 parasites complemented with the S1409A mutant gene ($p < 0.01$, Fig 5D and S10 and S11 Figs). With 6 hours of invasion, this difference was less significant ($p < 0.05$) in the first experiment, and not significant in the second experiment, highlighting that Δ TgPL3 parasites may be delayed in rhoptry secretion and will “catch-up” overtime in tissue culture. All together, these results suggest that a role of TgPL3 during invasion is specific to rhoptry secretion.

Δ TgPL3 and S1409A parasites are avirulent *in vivo* and provide protection against subsequent infection

We then tested if the apparent defect in rhoptry secretion of the Δ TgPL3 and S1409A mutant parasites would affect their virulence in a mouse model. Δ TgPL3 and S1409A complemented strains did not cause any disease symptoms in mice, even when infected with up to 1×10^5 parasites. The parental RH Δ Ku80 Δ HPT strain is a virulent type I strain, and infection with a dose of 100 parental or complement parasites resulted in all mice succumbing to infection by day 11 (S12A Fig). Mice infected with 1000 parental or complement parasites succumbed by day 9 (Fig 6A). All mice infected with 100, 1000, 1×10^4 and 1×10^5 Δ TgPL3 and S1409A mutant parasites survived acute infection and did not show signs of disease (Fig 6A, and S12A, S14 Figs). At 28 days post infection, brains were analyzed for bradyzoite cysts by staining with Dolichos biflorus agglutinin (DBA) and sera was tested for parasite antibody production. No cysts were found in mice infected with either Δ TgPL3 and S1409A parasites (S13 Fig), but all mice seroconverted (Fig 6B, S14 Fig). These results suggest immune exposure, but that these mutants were unable to disseminate and/or establish chronic infection. Mice infected with 1000 heat-killed parental parasites did not seroconvert, so the immune responses seen against Δ TgPL3 and S1409A infection were not simply a reaction to non-viable parasites (Fig 6B).

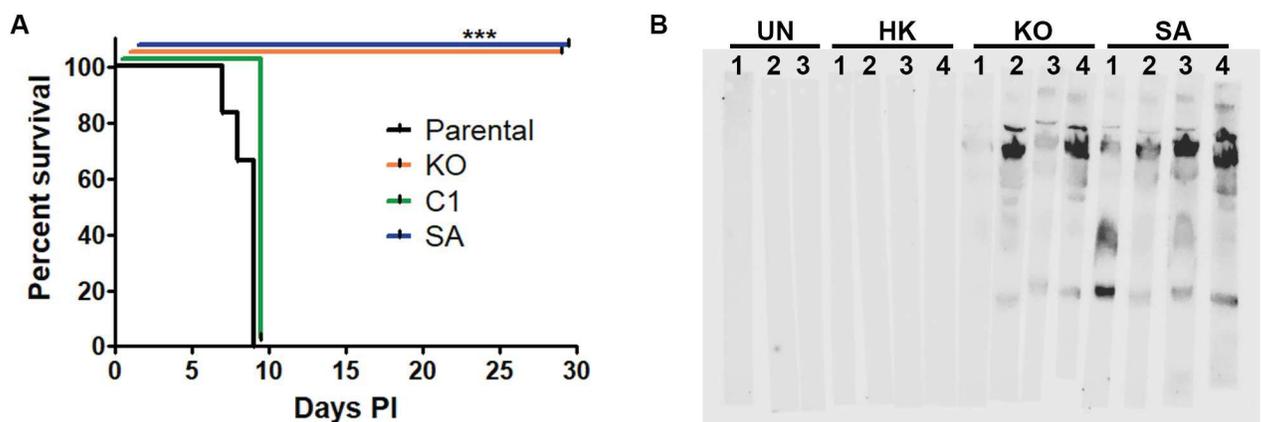


Fig 6. Δ TgPL3 and S1409A parasites are avirulent. (A) Shown is a combination of two independent experiments of 3–4 NMRI mice each, either all male or all female, with a total of 7 mice per strain. Mice were infected with 1000 *T. gondii* parasites and survival was monitored for 28 days post infection. No brain cysts were seen in surviving mice. *** $p < 0.001$. (B) Serum collected 28 days post infection in surviving mice tested for seropositivity with individual strip blots for each mouse (labeled 1, 2, 3 or 4). Seroconversion was seen in all Δ TgPL3 and S1409A infected mice but not in uninfected mice (UN) or mice infected with heat-killed parasites (HK). Shown is a representative of two independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008650.g006>

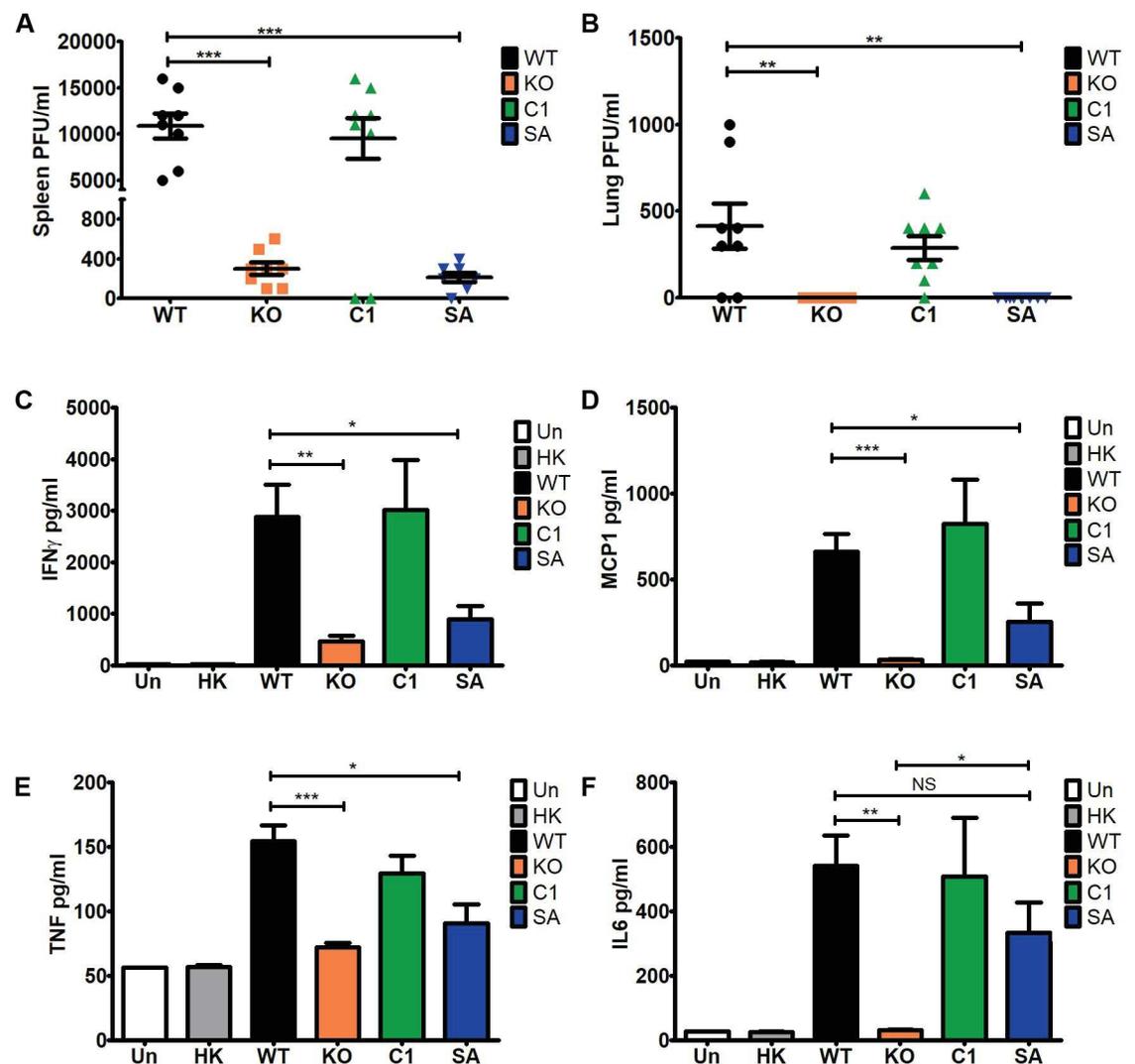


Fig 7. Δ TgPL3 and S1409 parasites are unable to disseminate *in vivo*. In 2 independent experiments, 4 male NMRI mice were infected with 1000 *T. gondii* parasites. 3 days post infection (A) spleens and (B) lungs were removed and homogenized. Homogenate was serially diluted, added to HFF monolayers in duplicate, and plaqued for 7 days. The monolayers were stained with crystal violet and PFU/ml calculated. (C-F) Serum was collected from the same mice at 3 days post infection and cytokine levels of (C) IFN γ , (D) MCP1, (E) TNF and (F) IL6 were determined using a cytokine bead array kit (Biosciences). Cytokine analysis was repeated with female mice and shown is one representative experiment. Uninfected mice and mice infected with 1000 heat-killed parasites were used as negative controls * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008650.g007>

To determine whether Δ TgPL3 and S1409A parasites were viable during infection and capable of dissemination, we performed a plaque assay on the lungs and spleen of mice at day 3 post infection. After infection with 1000 parasites, the parental and complement strains had high parasite infection in both organs, whereas Δ TgPL3 and S1409A mutant parasites had significantly fewer parasites present in the spleen and no parasites in the lung (Fig 7A and 7B). While both Δ TgPL3 and S1409A mutant parasites induced a significantly lower serum cytokine response than the parental and complement strains, they did induce a higher response than that of either uninfected mice or mice injected with heat-killed parasites (Fig 7C–7F and

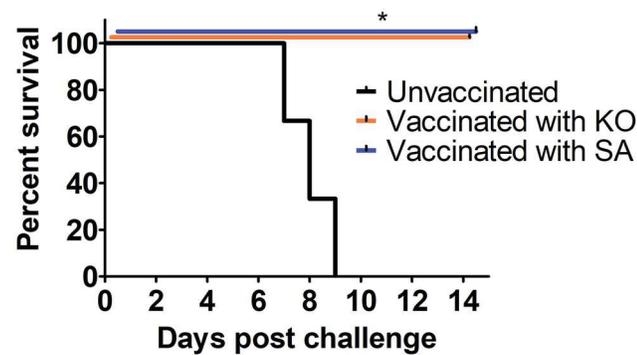


Fig 8. Δ TgPL3 and S1409 parasites induce a protective immunity against subsequent infections. 3 male NMRI mice were infected with 1000 Δ TgPL3 or S1409 parasites, or uninfected as a negative control. 30 days post infection, mice were tested for seropositivity and challenged with 1000 RH Δ Ku80 Δ HPT parasites. Survival was recorded for 14 days post challenge.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008650.g008>

(S12B–S12E Fig). These results suggest that Δ TgPL3 and S1409A mutant parasites were capable of low levels of replication in mice at or near the site of injection, but that they were unable to disseminate beyond the peritoneal cavity.

The vaccine potential of Δ TgPL3 and S1409A parasites to form protective immunity against subsequent infection was assessed. Mice were vaccinated with 1000 Δ TgPL3 or S1409A parasites and at 30 days post infection, serum samples were collected to confirm seropositivity (S15A Fig). These vaccinated mice, as well as age-matched uninfected control mice, were then challenged with 1000 parental RH Δ Ku80 Δ HPT parasites. Survival, disease symptoms, and weight change was recorded for 14 days post challenge. While all of the control mice succumbed to acute infection within 9 days, all vaccinated mice infected with Δ TgPL3 and S1409 survived the subsequent lethal challenge (Fig 8). These mice did show minor symptoms of disease, such as rough fur and weight loss. As early as 10 days post infection, they all appeared healthy and active again with no visible disease symptoms (S15B and S15C Fig).

Discussion

Here we define the role of the third characterized *T. gondii* PLP, TgPL3, that is localized to the apical cap of the parasite. Cytoskeleton extraction of extracellular parasites with deoxycholate shows that TgPL3 likely binds to the cytoskeleton. TgPL3 was identified previously in a screen to identify genes involved in chronic cyst formation [5]. However, the insertion formed a fusion transcript with the *TgPL3* gene, prompting us to create a full knockout strain to allow assessment of the locus. To generate Δ TgPL3 parasites, we used a FACS-based cloning method that would reduce the opportunity for competition among a population of transfected parasites. By using fluorescent proteins to sort parasites rather than drug selectable markers, we cloned the mCherry+/GFP- parasites into individual wells without passage after transfection, which allowed us to obtain a mutant with a severe invasion defect. Finally, as *T. gondii* strains change their virulence after serial passage in tissue culture, flow cytometry without passage after transfection reduced the opportunity for parasites to evolve away from their parental strain. Deletion of TgPL3 showed multiple phenotypes including reduced rhoptry secretion and invasion, and a severe virulence defect. All of these defective phenotypes were restored in parasites complemented with the entire ORF, but not if it contained a single point mutation in the active site of the PLP domain, changing a serine to alanine. These results highlight that the phenotypes due to TgPL3 deletion are most likely due to the loss of phospholipase activity.

Knockout of TgPL3 resulted in an invasion defect that accumulated over several lytic cycles to form smaller and fewer plaques than the parental parasites. Because rhoptry neck proteins play a critical role for invasion by building the moving junction necessary for intimate attachment of the parasite to the host cell, the possible defect in rhoptry secretion could be causing the invasion defect seen. Additionally, mutation of the active site serine recapitulated the invasion defects, suggesting that phospholipase activity is required for rhoptry secretion. Gliding motility, microneme secretion, and egress were apparently unaffected by Δ TgPL3 or S1409A, so the role of TgPL3 is not ubiquitous during invasion.

PUFAs and lysophospholipids (LPLs) are cleaved from phospholipids by PLA₂ and the release of these products destabilizes the membrane. Rhoptries have a higher membrane rigidity than the parasite as a whole [29], so PLP activity could have a significant effect on local membrane fluidity of the rhoptries, allowing for release of embedded rhoptry proteins in the organelle's membranes. PUFAs and LPLs can be recycled back into the lipid membrane or serve as signaling molecules to regulate lipolysis, lipogenesis, and the immune responses [8]. Phospholipase C activity was previously shown to be involved in invasion signaling. The enzyme cleaves phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate to release IP₃. When IP₃ binds with its receptor IP₃R, Ca²⁺ is released and triggers conoid extrusion, a critical step for successful invasion. [30]. TgPL3 could play a similar role in signaling for rhoptry secretion rather than a mechanical release of the proteins. Finally, PUFAs have been shown to act on syntaxin, a member of the soluble NSF-attachment receptor (SNARE) protein family involved in fusion of vesicles with the plasma membrane [31], so the generation of PUFAs through PLP activity could have a direct, essential action on the final stages of membrane fusion. We predict that the *in vivo* activity of TgPL3 is either involved in the mechanical release of the rhoptries themselves or its products are used as signaling molecules to induce the release of rhoptries. Future analysis will determine if and how the PLP activity plays a role during rhoptry secretion.

The tissue culture invasion defects conferred by the Δ TgPL3 were recapitulated when Δ TgPL3 was complemented with the entire TgPL3 ORF, but not if it contained a S1409A mutation. As TgPL3 is a large protein, most of which does not have predicted functional domains, we compared Δ TgPL3 and S1409A parasites in a mouse model to test whether there would be additional phenotypes of Δ TgPL3 *in vivo* that would be complemented by the S1409A construct. Δ TgPL3 and S1409A parasites were both virtually avirulent *in vivo*, with reduced cytokine stimulation, parasitemia and dissemination beyond the injection site. However, the S1409A mutant induced a statistically significant increase in IL6, and TNF α in the lower doses, *in vivo* compared to Δ TgPL3, suggesting a yet undefined role for TgPL3 beyond the PLP domain. IL-6^{-/-} mice are significantly more susceptible to *T. gondii* infection than WT mice due to a failure to produce a robust type I immune response during early infection, followed by a significantly amplified proinflammatory response during late acute and chronic infection that often proves lethal to the host [32]. Compared to WT mice, TNF^{-/-} mice fail to control *T. gondii* growth during chronic infection and succumb significantly earlier to encephalitis [33]. In future studies, truncated mutants that maintain PLP activity could determine alternative functions for TgPL3 that are outside of the PLP domain but currently being masked by the severe invasion defects.

Previously, the *T. gondii* armadillo-repeats-only protein (TgARO) was shown to be defective in rhoptry secretion [34]. Mice infected with Δ TgARO parasites survived acute infection and seroconverted similar to our mutants, but in this case, they failed to mount a protective immune response. Mice infected with the Δ TgPL3 and S1409A mutants not only survived acute infection, they never even showed the typical signs of disease such as ruffled fur or a humped back. However, these mice still produced a robust antibody response, which increased in a dose-dependent manner with the initial parasite infectious dose. Thirty days after initial

infection with Δ TgPL3 and S1409A mutants, mice survived a secondary challenge with a lethal dose of WT parasites with minimal disease symptoms. These results suggest that TgPL3, or even the PLP specifically, could be a compelling target for livestock vaccination. Toxoplasmosis is estimated to cause 10–23% of spontaneous abortion in sheep and goats in Europe and the United States [35]. Vaccinating livestock with Δ TgPL3 or S1409A parasites could protect against future infections or reactivation of chronic infections and would likely be a benefit to the agriculture economy.

To better understand the mechanism behind the phenotypes we saw in tissue culture and *in vivo*, we purified the PLP domain of TgPL3 for *in vitro* activity assays. Because we were unable to express the PLP domain in *E. coli*, likely due to the toxicity of expressing a lipase in live cells, we changed to an *in vitro* transcription and translation system using wheat germ extract. Although the domain was successfully expressed, attempts to show activity using a thin layer chromatography assay have been unsuccessful. TgPL3 is a 2579 amino acid protein of which the expressed PLP domain is only 67 kDa. It is likely that the domain alone is inactive or unable to fold correctly. It is also possible that TgPL3 requires a cofactor, similar to the *Pseudomonas aeruginosa* PLP, ExoU, which requires host ubiquitination to activate the PLA₂ activity [20], and the absence of this cofactor limits enzymatic activity even with proper folding. Future studies will address the substrate specificity of TgPL3 PLP domain to identify which specific phospholipids are targeted during rhoptry secretion.

PLP domains are present in high numbers across the Apicomplexa phylum, but none of these proteins have been characterized outside of *T. gondii*. None of the characterized PLP containing genes have shown activity *in vitro*, which could again indicate a need for additional host factors and further optimized assay buffers for parasite PLPs. Lipid metabolism and signaling is critical during the parasite lifecycle [36], but there is still much to discover about these complex processes. Future work on the remaining *T. gondii* PLPs and other parasite derived PLPs may reveal novel regulators of parasite replication, infection and virulence.

Materials and methods

Ethics statement

Mice were treated in compliance with the guidelines set by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Wisconsin School of Medicine and Public Health (protocol #M005217). The institution adheres to the regulations and guidelines set by the National Research Council.

Parasite and host cell culture

Toxoplasma gondii tachyzoites were cultured in human foreskin fibroblasts (HFF, ATCC) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin at 37°C with 5% CO₂.

Generation of TgPL3 knockout and complementation strains

Empty vector pBC_mCherry_GFP was created by digesting a pBC SK(-) vector with KpnI and PciI and inserting mCherry and GFP (mgfp5) PCR products using primers GFP GA F/R and mCherry GA F/R (S1 Table). The mCherry and GFP fragments were amplified from vectors optimized for expression in *T. gondii*, where both contain 5' α Tub promoters with 3' DHFR and SAG1 UTRs, respectively. pBC_mCherry_GFP was digested with SpeI and KpnI to insert the flanking regions of our gene of interest on either side of the mCherry positive marker. 1kb genomic fragments 5' and 3' of the TgPL3 locus were amplified by PCR with the Phusion

polymerase (Thermo Scientific) using primers TgPL3 US F/R and TgPL3 DS F/R (S1 Table). The resulting pBC_mCherry_GFP_305140 vector was linearized prior to electroporation with the BTX ECM 630 Electroporation System. The Q5 mutagenesis kit (NEB) was used to change the Cas9 plasmid (generous gift from Sebastian Lourido) gRNA sequence to 5'-CATTTCGG GGCAGCGAATC-3' using primers TgPL3 gRNA F/R to target Cas9 to the AGG PAM site 5' of the TgPL3 start codon. 100 µg of linearized pBC_mCherry_GFP_305140 and 20 µg of the TgPL3-specific Cas9 plasmid were electroporated into 2×10^7 parasites as described previously [37] and allowed to recover for 2–3 days prior to FACS sorting.

Δ TgPL3::TgPL3 complement strain were created by amplifying cDNA from the TgPL3 coding region using the TgPL3 ORF F/R primers (S1 Table) and inserting the coding region between the endogenous 5' and 3' flanking regions used in the knockout construct to allow for homologous recombination of the TgPL3 coding sequence back into its original locus. The Δ TgPL3::TgPL3^{S1409A} PLP domain mutant (S1409A) was created using the Q5 mutagenesis kit and primers Q5 S1409A F/R (S1 Table) to change nucleotide 5969 T>G, resulting in a serine to alanine mutation at amino acid 1409. To target the CGG PAM site within mCherry, the Cas9 plasmid gRNA sequence was changed to 5'-AGGCTGAAGCTGAAGGACGG-3' using primers mCherry gRNA F/R (S1 Table). Knockout parasites were electroporated as described before with linearized complement constructs and mCherry-specific Cas9 plasmid.

FACS sorting for clonal populations

The UW Carbone Cancer flow cytometry core assisted us in all FACS cell sorting. The BD FACS AriaII BSL-2 Cell Sorter was kept at room temperature when collecting parasites after sorting. mCherry-expressing RH parasites and GFP-expressing RH parasites are used as gating controls. Each population is scraped and syringed and 1 mL of the extracellular parasites moved into a polystyrene tube for sorting. For the knockout construct, single parasites that expressed mCherry, indicating insertion of the plasmid, but did not express GFP, indicating a successful double crossover event, were sorted directly into a 96-well plate. For the complement constructs, single parasites no longer expressing mCherry were sorted into a 15 mL polystyrene conical and transferred into a fresh flask of HFFs. These populations were then cloned by limiting dilution 2–3 days later.

Southern blot analysis to confirm knockout and complementation

The neutral transfer method of Southern blot analysis [38] was used to confirm knockout and complementation strains. A probe with homology to the 5' flank of TgPL3 was amplified by PCR using primers Southern probe F/R. The probe was labeled with [α -32P] dCTP using a random primed DNA labeling kit (Roche). gDNA from all candidate clonal strains was extracted using the TELT method [39] and digested with NotI and PstI overnight. Briefly, the digested gDNA samples were electrophoresed on an agarose gel, transferred to a positively charged nylon/nytran membrane and exposed to the hybridization probe. After stringent washing, the membrane was positioned against a phosphor screen (Molecular Dynamics) overnight before imaging on a Typhoon FLA 9000 machine (GE).

Production of TgPL3 antibodies

The TgPL3 PLP domain was expressed using the CellFree Sciences wheat germ system (WEPRO7240). The PLP domain was amplified from cDNA using primers PLP F/R (S1 Table) and inserted into the provided pEU-E01-MCS empty vector, which contains a C-terminal HIS tag. Transcription and translation were performed by manufacturer's instruction. The resulting protein was purified by nickel column chromatography. Alternatively, three peptides were

synthesized (Genscript) from unique locations along the gene based on maximizing the estimated immunogenicity and minimizing cross reactivity (S1 Fig). 100 µg of purified protein or peptide conjugated to KLH was mixed 50:50 with Freund's complete adjuvant and injected subcutaneously into two male BALB/c mice each. Booster intradermal injections of 100 µg of antigen in Freund's incomplete adjuvant were given 4 and 8 weeks later. Serum was collected by cardiac puncture 2 weeks after the final booster. Serum was prepared and stored at -80°C.

Immunofluorescence

T. gondii-infected HFF monolayers were fixed in 3.7% formaldehyde in PBS for 20 min, permeabilized and blocked with 0.2% v/v Triton x-100 (Sigma) and 3% BSA in PBS at room temperature for one hour. Primary antibody was incubated at 4°C overnight in 0.2% v/v Triton x-100 and 3% BSA in PBS (1:500 mouse anti-TgPL3, 1:500 rabbit anti-MIC2) washed 3 times with 0.2% Triton in PBS and incubated one hour with the specific secondary antibody (1:1000 goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 and 1:1000 goat anti-mouse Alexa Fluor 594) at room temperature for one hour and then washed 3 times with PBS. RH parasites with endogenously tagged CAP1-YFP or RNG1-YFP were also used as colocalization markers. Cells nuclei were stained with DAPI (Sigma). Slides were mounted in Vectashield antifade mounting medium (Vector-Labs). Samples were imaged on Zeiss Axioplan III equipped with a triple-pass (DAPI/fluorescein isothiocyanate [FITC]/Texas Red) emission cube, differential interference contrast optics, and a monochromatic Axiocam camera operated by Zen software (Zeiss) and processed using GIMP 2.

Detergent extraction

Naturally lysed parasites were collected by centrifugation at 1000 x g for 20 minutes at 4°C and resuspended in PBS containing 10 mg/mL deoxycholate (DOC) for 25 minutes at RT. Detergent-extracted parasite samples were settled onto poly-L-lysine coated coverslips for 15 minutes at RT. As a control, untreated parasites were adhered to the poly-L-lysine surface. These samples were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at RT prior to processing for immunofluorescence as described above, except the control slides were stained with IMC7 to indicate disruption of the parasite membrane structures.

Conoid extrusion

Naturally lysed parasites were pelleted and re-suspended in 20 mM HEPES, 5 mM CaCl₂ for calcium ionophore and 3 µM A23187. Parasites were then settled onto poly-L-lysine coated coverslips for 15 minutes at 37°C and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at RT prior to processing for immunofluorescence.

Replication assay

Internal replication assays were performed by seeding HFFs on sterile glass coverslips in 4-well plates (Corning) and infecting the monolayer with 3.2×10^4 parasites in triplicate per strain. The monolayers were washed with PBS to remove external parasites 3–4 hours post infection and fresh media was added to each well. 18 and 26 hours post infection, the monolayers were fixed and stained as above using 1:500 rabbit anti-SAG1 primary antibody and 1:1000 goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 secondary antibody. After mounting, the slides were blinded and the number of parasites per vacuole for at least 100 vacuoles were counted per slide.

Invasion assay

Invasion assays were slightly modified from the previously described red green method [23]. Confluent HFF cells on coverslips in 24 well plates were placed on ice in 300 μ L of complete media. Parasites were lysed, spun and resuspended to 5×10^6 per 300 μ L of cold complete media. HFFs on ice were infected with 300 μ L of each parasite strain in triplicate well, then left on ice for 20 min. After the 20 min on ice, parasites were allowed to invade for 5 min at 37°C. Cells were fixed at room temperature by adding 600 μ L of 8% paraformaldehyde in HBSS directly in the media, final volume 1.2 mL of 4% paraformaldehyde. After 10 min, the solution was changed and fixation continued for another 10 min. Extracellular parasites were stained with 1:500 rabbit anti-SAG1 primary antibody, then washed 3 times in HBSS. The cells were then permeabilized with 0.2% Triton x-100 and 3% BSA and incubated with either 1:500 mouse chronic serum or 1:500 rat anti-IMC7. The cells were washed three times and incubated with 1:1000 goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 and goat anti-mouse or anti-rat Alexa Fluor 594. At least 100 parasites per slide were scored as either red only (internal) or red and green (external). Slides were blinded to reduce bias and 20 random fields were counted per coverslip at the 40X objective.

Attachment assay

Attachment of all parasite strains was accessed using a modified version of the glutaraldehyde fixed host cell assay [24]. HFF cells were grown to confluency in chamber slides, washed with PBS and fixed in 2% glutaraldehyde/PBS for 5 min at room temperature. Cells were washed 3 times with PBS, then blocked with 0.16M ethanolamine for at 3 days at 4°C. Cells were washed in PBS before adding 200 μ l parasites to each chamber at a density of 5×10^7 /ml in DMEM/20mM HEPES/3% FBS. Parasites were allowed to attach for 15 min at 37°C, washed 3 times with PBS, and then fixed in 4% formaldehyde/0.02% glutaraldehyde for 20 min. Immunofluorescence was used to detect attached parasites using 1:500 rabbit anti-SAG1 and 1:1000 goat anti-rabbit Alexa Fluor 488. Ten random fields were counted per chamber at the 40X objective (at least 150 parasites per strain per experiment). As a negative control for attachment, all parasite strains were treated with 25 μ M BAPTA-AM (Sigma) for 10 min at room temperature.

Egress

Freshly egressed parasites were pelleted and resuspended to 1×10^6 /mL in HFF media. HFF monolayers seeded on coverslips in a 24-well plate were infected with 1×10^5 parasites to a total of 6 wells per strain. After incubation at 37°C for 2 hours, the wells were washed 5 times and allowed to grow another 28 hours. Media was replaced with serum-free media and 3 μ M A23187 was added to induce egress in three wells per strain or DMSO was added as a negative control for the remaining three wells per strain. After incubation for 5 minutes at 37°C, parasites were fixed with 4% paraformaldehyde prior to processing for immunofluorescence. Primary antibodies were mouse anti-GRA3 1:100 and rabbit anti-GAP45 1:5000. Secondary antibodies were anti-rabbit Alexa Fluor 594 1:4000 and anti-mouse Alexa Fluor 488 1:4000. At least 200 vacuoles were counted as egressed or not egressed per replicate.

Western blot analysis of secreted microneme proteins

Microneme secretion assays (Fig 5A and 5B) were slightly modified from the previously described [25]. Parasites were mechanically lysed and resuspended in DMEM plus 20 mM HEPES to a final concentration of 1×10^8 /mL. For excreted/secreted antigen (ESA) induction, 200 μ L of parasites were added to 200 μ L of 2% ethanol plus 6% FBS in DMEM preheated to

37°C. For the control, 200 μ L of parasites were added to 200 μ L of DMEM only. Both ESA and control were incubated at 37°C for 30 minutes, then chilled on ice for 5 minutes. Tubes were centrifuged at 1000 x g for 10 minutes. The pellet was collected as loading control and the supernatant was centrifuged again. After the second centrifugation, 300 μ L of the supernatant was collected and considered the ESA fraction. Pellet and ESA were run on 12% SDS-Page gel and blotted to PVDF membrane. Membranes were blocked in 5% BSA in TBS-T for 3 hours at room temperature, incubated overnight with 1:2000 rabbit anti-MIC2 and 1:4000 monoclonal mouse anti-SAG 1 (DG52) in 5% BSA in TBS-T. Membranes were washed, and incubated with goat anti-rabbit HRP conjugated (Sigma, A0545) and goat anti-mouse HRP conjugated (Invitrogen, 62–6520) for one hour at room temperature in TBS-T. Blots were washed, and incubated with chemiluminescent substrate (Promega, W1001) and imaged using Odyssey FC (LICOR).

For [S6C and S6D Fig](#), 1×10^8 freshly egressed parasites were washed, pelleted and resuspended in intracellular buffer (5 mM NaCl, 142 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 5.6 mM glucose, 25 mM HEPES pH 7.2). Samples were split into two treatment groups, pelleted and resuspended in serum-free media with either propranolol (500 μ M) to induce microneme secretion or DMSO as a negative control. The parasites were incubated at room temperature for 10 minutes, 37°C for 20 minutes and then kept on ice for the remainder of the protocol. Parasites were pelleted, supernatant was transferred to a new tube and the remaining pellet saved. The supernatant was re-pelleted before collecting the final supernatant sample, which contains the excretory secretory antigens (ESA). Pellet and ESA fractions were lysed in laemmli buffer, run on a 10% acrylamide gel and transferred to a PVDF membrane for western blot analysis. The membrane was blocked in PBS-Tween 5% milk, incubated with primary antibody (1:2000 rabbit anti-AMA1 or MIC2) followed by secondary antibody (1:10000 goat anti-rabbit HRP), and revealed with ECL substrate (clarity max, BioRad). The membrane was imaged on a BioRad ChemiDoc.

E-vacuole rhoptry secretion assay

Freshly egressed parasites were incubated with 1 μ M Cytochalasin D (Sigma C8273) for 10 minutes. HFF monolayers seeded on coverslips in a 24-well plate were infected with 5×10^6 parasites and incubated for 15 minutes. During this time, the plate was centrifuged for 1 minute at 250 x g and then placed at 37°C before fixing with 4% paraformaldehyde. Samples were processed for immunofluorescence using primary antibodies mouse anti-SAG1 1:2000 and rabbit anti-ROP1 1:3000 and secondary antibodies anti-rabbit 488 1:10000 and anti-mouse 594 1:4000.

SeCreEt assay for rhoptry secretion

SeCreEt assay protocol was modified from previously published [28]. Toxofilin coupled to Cre-recombinase was inserted into the UPT coding sequence in the Δ TgPL3::TgPL3 and Δ TgPL3::TgPL3^{S1409A} complemented strains. Single guides RNA were generated to cut the 5' and 3' end of UPRT gene respectively with primers ML3445/ML3446 and ML2087/ML2088. Amplification of donor DNA was done with KOD polymerase (Promega) using primers ML3522/ML3523. The total population was negatively selected for loss of the UPRT with 5 μ M pro-drug 5'-fluo-2'-deoxyuridine (FUDR) and clones were isolated using limiting dilution. Integration at the locus was checked with primers ML3547/ML3190 and ML3546/ML3187.

DsRed cells were seeded in T25 flasks at 2.5×10^5 cells per flask. 24 hours after, the cells were infected with 3×10^6 parasites of the toxofilin-Cre expressing lines, in triplicate, and the media was changed after 1 hour or 6 hours to remove any remaining external parasites. After

24 hours, cells were washed in HBSS and trypsinized before FACS analysis for GFP expression on a LSRFortessa cell analyser (BD Biosciences).

Mouse infection assays

Parasites were scraped and syringed from HFF monolayers and counted for intraperitoneal injection of 100 or 1000 parental RH Δ Ku80 Δ HPT, Δ TgPL3, complement or S1409A parasite strains. Additionally, mice were injected with 10^4 or 10^5 Δ TgPL3 and S1409A parasites. For each independent experiment, NMRI mice were sex-matched and aged 8–10 weeks. Uninfected mice and mice injected with heat-killed parasites were used as controls and each experiment was repeated at least 2 times. Mice were monitored for at least 26 days post infection and surviving mice were checked for seroconversion and brain cysts. Seroconversion was tested by loading tachyzoite lysate on a protein gel and performing western blots using serum from infected mice compared to an uninfected and heat-killed parasite controls. At 26 days post infection, the brains of all surviving mice were harvested, homogenized, processed for immunofluorescence assay using FITC-DBA (1:500) and counted as described previously [11]. Mice infected with ME49 parasites were used as positive immunofluorescence staining controls. Prism Graphpad software was used to analyze survival curve by log-rank (Mantel-Cox).

To measure serum cytokine levels during infection, serum was collected on days 3 and 6 post infection and cytokine levels determined using a cytometric bead array kit (BD) following manufacturer's instructions. The samples were run on an Attune analysis cytometer (Thermo-Fisher) at the University of Wisconsin Carbone Cancer Center (Grant P30 CA014520) and analyzed using FlowJo.

To measure parasite dissemination, mice were injected with 1000 parasites and euthanized on day 3 post infection. Spleens and lungs were collected, homogenized and plated by serial dilution on monolayers of HFFs. Plaque forming units per mL of material was calculated based on plaque formation after 8 days.

To test the vaccine potential of Δ TgPL3 parasites, 3 mice were infected with either 1000 Δ TgPL3 or S1409A parasites, or kept uninfected as an age-matched control. 30 days post infection, mice were tested for seropositivity as described above and challenged with 1000 RH Δ Ku80 Δ HPT parasites. Survival, disease symptoms, and weight change were recorded for 18 days post challenge. Disease symptoms were scored on a 1–4 scale, with 1 indicating no pain and distress and 4 indicating pain and distress [40]. Prism Graphpad software was used to analyze survival curve by log-rank (Mantel-Cox).

Statistical methods

All results are presented at mean values \pm SEM. Two-tailed unpaired t-tests were used to determine statistical significance between conditions using GraphPad. In vivo survival curves were analyzed for significance by log-rank (Mantel-Cox) test using GraphPad.

Supporting information

S1 Fig. Antibodies against synthetic TgPL3 peptides confirm localization. (A) Three peptides were synthesized (Genscript) from unique locations along the gene based on maximizing the estimated immunogenicity and minimizing cross reactivity. (B) One or two female BALB/c mice were immunized with each peptide and serum was collected following administration of multiple boosters. Immunofluorescence of the peptide TgPL3 antibodies (green) co-labeled with MIC2 (red) reproduces localization seen with the wheat germ PLP domain antibody. Images were taken under the same magnification and the scale bar in the lower left corner

equals 5 μm .
(TIF)

S2 Fig. TgPL3 localizes with β -tubulin even after DOC extraction. Top five panels show extracellular tachyzoites adhered to poly-L-lysine coated coverslips and stained for immunofluorescence imaging for TgPL3 (green), IMC7 (red) and β -tubulin (blue). Bottom five panels show TgPL3 localization in extracellular tachyzoites after extraction with deoxycholate extraction (DOC). Images for panels were taken under the same magnification and the scale bars in the lower right corners equal 5 μm .

(TIF)

S3 Fig. STM insertional mutant does not disrupt transcription. Northern blot analysis revealed that the original STM mutant had an insertion into the TgPL3 promoter that created a fusion transcript of the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) and TgPL3 genes. Transcription is driven by the constitutively active α -tubulin promoter on the pT230-TUB/CAT insertion plasmid. Introns and UTRs are shown in grey and exons are shown in orange.

(TIF)

S4 Fig. FACS sorting for clonal populations of Δ TgPL3. RH parasites expressing mCherry or GFP were used as gating controls for RH transfections. Pru parasites expressing either mCherry or GFP were used as gating controls for ME49 transfections. For each transfection, single parasites that expressed mCherry, indicating insertion of the plasmid, but did not express GFP, indicating a successful double crossover event, were sorted directly into a 96-well plate using the BD FACS AriaII BSL-2 Cell Sorter. Parasites positive for both mCherry and GFP indicate a random insertion event. mCherry+/GFP- and mCherry+/GFP+ events are shown as a percentage of the total live, single-cell population from each strain.

(TIF)

S5 Fig. TgPL3 is not critical for the replication rate of internalized parasites. Triplicate monolayers of HFFs were infected with 3.4×10^4 *T. gondii* parasites. Tachyzoites per vacuole were scored in at least 100 randomly encountered vacuoles per replicate. (A) 18 hours post infection, (B) 26 hours post infection.

(TIF)

S6 Fig. TgPL3 deletion does not affect egress or microneme secretion. (A) 9 days post infection, HFF monolayers were stained with crystal violet to reveal *T. gondii* plaque formation. Plaques numbers are shown for each strain, shown here the combined results from two independent experiments performed in duplicate. (B) HFF monolayers were infected with 1×10^5 parasites, 6 replicates per strain. 30 hours post infection, cells were treated with DMSO as a negative control in triplicate or egress was induced with A23187 in triplicate for 5 minutes before staining with mouse α -GRA3 and rabbit α -GAP45. At least 200 vacuoles were counted as egressed or not egressed per replicate. (C) The excretory secretory antigens (ESA) supernatant fraction was separated from the pellet fraction, which is used as an input control. Microneme secretion was induced with propranolol (ESA Induced) or treated with DMSO as a negative control (ESA Uninduced). Full AMA1 is 63 kDa while the secreted form is 53 kDa. GRA3, the control to ensure the parasites remained intact through processing, is run slightly off the bottom of the gel in this experiment. (D) Parasites were processed the same as panel B except the blots were probed for MIC2. Full MIC2 is 115k Da while the secreted form is 95–100 kDa. GRA3 is a control to ensure the parasites remained intact through processing. M is the marker lane using PageRuler (Thermo) where the orange band is 70 kDa. B is a blank lane.

(TIF)

S7 Fig. Representative images from the invasion assay. The percentage of parasites that were successfully able to invade the host cell was determined using the red/green invasion assay [21]. Shown here is one of 20 random fields that were counted at the 40X objective. All images were taken at the same magnification and the white scale bar is 20 μm .
(TIF)

S8 Fig. Representative attachment assay images. Shown here is one of the ten random fields that were counted for the number of parasites attached to glutaraldehyde fixed host cells at the 40X objective. All images were taken at the same magnification and the white scale bar in lower right corner is 20 μm .
(TIF)

S9 Fig. Representative e-vacuoles. Freshly egressed parasites were incubated with Cytochalasin D, then seeded onto HFF monolayers and centrifuged for 1 minute at 250 x g before incubation at 37°C. Parasites were fixed with paraformaldehyde and stained for ROP1 (green) and SAG1 (red). Shown are representative panels of WT parasites with the thin white arrows indicating parasites that have discharged their rhoptry contents and the wide yellow arrowheads indicate parasites that have not discharged their rhoptries. All images were taken at the same magnification and the white scale bar in upper left corner is 5 μm .
(TIF)

S10 Fig. FACS plots from SeCreEt assay experiment 1. Toxofilin coupled to Cre-recombinase was inserted into the UPT coding sequence in $\Delta\text{TgPL3}::\text{TgPL3}$ and $\Delta\text{TgPL3}::\text{TgPL3}^{\text{S1409A}}$ complemented strains. DsRed positive cells were infected with 3×10^6 parasites of the toxofilin-Cre expressing lines in triplicate and the media was changed after 1 hour (1Hr) or 6 hours (6Hr). After 24 hours, DsRed cells were dissociated with trypsin and the single-celled suspension was analyzed by Flow Cytometry using a LSRFortessa cell analyser (BD Biosciences). The bar graph shows the number of GFP++ host cells on the y-axis. After 1 hour of invasion, ΔTgPL3 parasites complemented with S1409A showed a highly significant difference in rhoptry secretion compared to parasites complemented with the WT gene (** $p < 0.01$). After 6 hours, this difference was less significant (* $p < 0.05$). Also shown are the FACS plots of for each sample with the DsRed-A channel on the y-axis and the GFP-A channel on the x-axis. The gate used to count the percentage of GFP positive cells was denominated as GFP++. The percentage correspondent to GFP positive cells is indicated for each sample in white.
(TIF)

S11 Fig. FACS plots from SeCreEt assay experiment 2. Toxofilin coupled to Cre-recombinase was inserted into the UPT coding sequence in $\Delta\text{TgPL3}::\text{TgPL3}$ and $\Delta\text{TgPL3}::\text{TgPL3}^{\text{S1409A}}$ complemented strains. DsRed positive cells were infected with 3×10^6 parasites of the toxofilin-Cre expressing lines in triplicate and the media was changed after 1 hour (1Hr) or 6 hours (6Hr). After 24 hours, DsRed cells were dissociated with trypsin and the single-celled suspension was analyzed by Flow Cytometry using a LSRFortessa cell analyser (BD Biosciences). The bar graph shows the number of GFP++ host cells on the y-axis. After 1 hour of invasion, ΔTgPL3 parasites complemented with S1409A showed a highly significant difference in rhoptry secretion compared to parasites complemented with the WT gene (** $p < 0.01$). After 6 hours, this difference was not significant (NS). Also shown are the FACS plots of for each sample with the DsRed-A channel on the y-axis and the GFP-A channel on the x-axis. The gate used to count the percentage of GFP positive cells was denominated as GFP++. The percentage correspondent to GFP positive cells is indicated for each sample in white.
(TIF)

S12 Fig. Δ TgPL3 and S1409A parasites are avirulent at a low infectious dose. (A) Shown is a combination of two independent experiments of 4–5 male NMRI mice each, with a total of 9–10 mice per strain. Mice were infected with 100 *T. gondii* parasites and survival was monitored for 28 days post infection. No brain cysts were seen in surviving mice. (B–E) Serum was collected from the same mice at 3 days post infection and cytokine levels of (B) IFN γ , (C) IL6, (D) IL12 and (E) TNF were determined using a cytokine bead array kit (Biosciences). Shown is a single representative experiment. While one parental-infected mouse did survive, it did not sera convert, have cytokine levels above the uninfected control, or show brain cysts so we removed it from the analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. (TIF)

S13 Fig. Representative infected brain samples. Mice were infected with 1×10^5 Δ TgPL3 (KO) or 2×10^3 ME49 (WT) parasites. Mice were monitored for at least 26 days post infection, then their brains were harvested, homogenized, processed for immunofluorescence assay using FITC-DBA. The left four panels are representative images of mice infected with Δ TgPL3 and the left four panels are representative images of mice infected with of wild type ME49 parasites. All images were taken with the same magnification under the 40X objective, with the white scale bar in the lower right corner equal to 20 μ m. (TIF)

S14 Fig. Δ TgPL3 and S1409A parasites are avirulent at a high infectious dose. 3–4 male NMRI mice were infected with 10^4 or 10^5 Δ TgPL3 or S1409A parasites only and survival was monitored for 28 days post infection. All mice survived and no brain cysts were seen. Serum collected 28 days post infection and tested for seropositivity with individual strip blots for each mouse (labeled 1, 2, 3 or 4). (TIF)

S15 Fig. Δ TgPL3 and S1409A parasites induce a protective immunity against subsequent infections. 3 male NMRI mice were infected with 1000 Δ TgPL3 or S1409 parasites, or uninfected as a negative control. (A) 30 days post infection, mice were tested for seropositivity with individual strip blots for each mouse (labeled 1, 2, or 3). (B) After challenged with 1000 RH Δ Ku80 Δ HPT parasites, weight change was recorded for 14 days post challenge and (C) disease symptoms were scored on a 1–4 scale, with 1 indicating no pain and distress and 4 indicating pain and distress. (TIF)

S1 Table. Primer list. All primers are listed in the 5' to 3' direction with a brief description of their purpose. Primers used in the Gibson assembly (NEB) method include 18–22 bp annealing portions and 18–22 bp overhangs with homology to the backbone vector. (DOCX)

Acknowledgments

We sincerely thank Dana Mordue for CAP1-YFP parasites, John Boothroyd and David Sibley for antibodies, Nate Wlodarchak and Troy King Jr. for advice on protein purification and structural alignment, Andrew Garfoot and Andres Tibabuzo Perodomo for mouse infection assistance, Anita Koshy for the toxofilin-Cre plasmid, Helen Blau's lab for the Cre reporter DsRed cell line, Mae Huynh for advice on the attachment assay, and the University of Wisconsin Carbone Cancer Center for flow cytometry and FACS assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Sarah K. Wilson, Laura J. Knoll.

Funding acquisition: Maryse Lebrun, Laura J. Knoll.

Investigation: Sarah K. Wilson, Justine Heckendorn, Bruno Martorelli Di Genova, Lindsey L. Koch, Peggy J. Rooney, Naomi Morrisette, Maryse Lebrun, Laura J. Knoll.

Methodology: Sarah K. Wilson, Laura J. Knoll.

Project administration: Laura J. Knoll.

Resources: Naomi Morrisette, Laura J. Knoll.

Supervision: Maryse Lebrun, Laura J. Knoll.

Visualization: Sarah K. Wilson, Laura J. Knoll.

Writing – original draft: Sarah K. Wilson.

Writing – review & editing: Sarah K. Wilson, Justine Heckendorn, Bruno Martorelli Di Genova, Lindsey L. Koch, Maryse Lebrun, Laura J. Knoll.

References

1. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis—a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS one*. 2014 Mar 24; 9(3):e90203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203> PMID: 24662942
2. Dobrowolski JM, Carruthers VB, Sibley LD. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Molecular microbiology*. 1997 Oct; 26(1):163–73. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5671913.x> PMID: 9383198
3. Parker ML, Penarete-Vargas DM, Hamilton PT, Guérin A, Dubey JP, Perlman SJ, Spano F, Lebrun M, Boulanger MJ. Dissecting the interface between apicomplexan parasite and host cell: Insights from a divergent AMA–RON2 pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Jan 12; 113(2):398–403.
4. Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews Microbiology*. 2008 Jan; 6(1):79. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800> PMID: 18059289
5. Frankel MB, Mordue DG, Knoll LJ. Discovery of parasite virulence genes reveals a unique regulator of chromosome condensation 1 ortholog critical for efficient nuclear trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Jun 12; 104(24):10181–6.
6. Senda K, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K. A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant and Cell Physiology*. 1996 Apr 1; 37(3):347–53. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a028952> PMID: 8673343
7. Shewry PR. Tuber storage proteins. *Annals of botany*. 2003 Jun 1; 91(7):755–69. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg084> PMID: 12730067
8. Banerji S, Aurass P, Flieger A. The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila*—identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008 Apr 1; 298(3–4):169–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.11.004> PMID: 18178130
9. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Critical Care*. 2014 Dec; 18(6):668. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0668-9> PMID: 25672496
10. Wilson SK, Knoll LJ. Patatin-like phospholipases in microbial infections with emerging roles in fatty acid metabolism and immune regulation by Apicomplexa. *Molecular microbiology*. 2018 Jan; 107(1):34–46. <https://doi.org/10.1111/mmi.13871> PMID: 29090840
11. Mordue DG, Scott-Weathers CF, Tobin CM, Knoll LJ. A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in activated macrophages. *Molecular microbiology*. 2007 Jan; 63(2):482–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05538.x> PMID: 17166175
12. Tobin CM, Knoll LJ. A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in a nitric oxide-dependent manner. *Infection and immunity*. 2012 Jan 1; 80(1):55–61. <https://doi.org/10.1128/IAI.05543-11> PMID: 22006568
13. Magle CT, Pittman KJ, Moser LA, Boldon KM, Knoll LJ. A *Toxoplasma* patatin-like protein changes localization and alters the cytokine response during toxoplasmic encephalitis. *Infection and immunity*. 2014 Feb 1; 82(2):618–25. <https://doi.org/10.1128/IAI.00444-13> PMID: 24478077

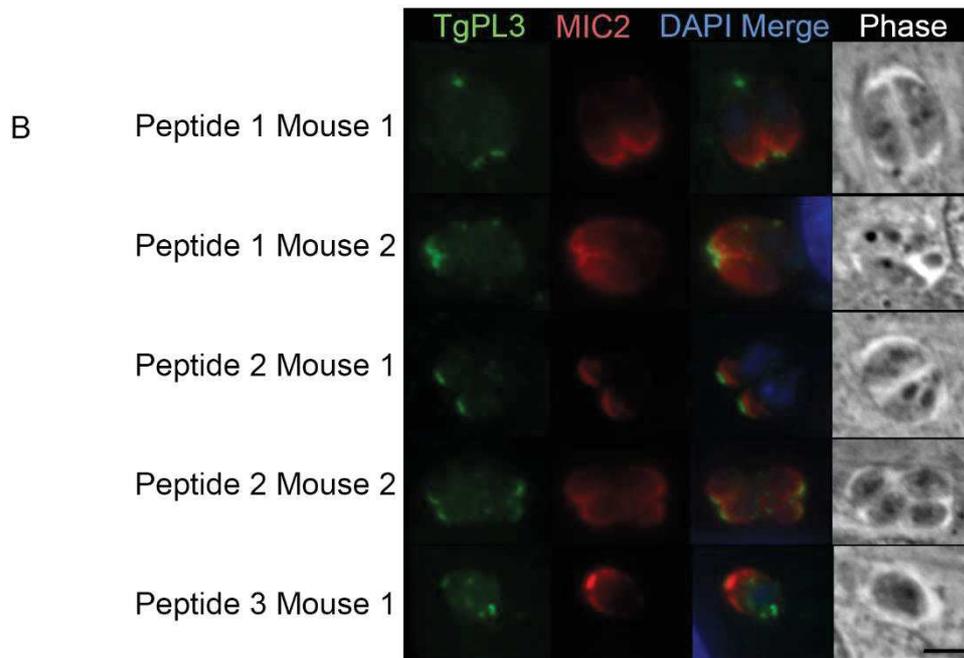
14. Lévêque MF, Berry L, Yamaryo-Botté Y, Nguyen HM, Galera M, Botté CY, Besteiro S. TgPL2, a patatin-like phospholipase domain-containing protein, is involved in the maintenance of apicoplast lipids homeostasis in *Toxoplasma*. *Molecular microbiology*. 2017 Jul; 105(1):158–74. <https://doi.org/10.1111/mmi.13694> PMID: 28419631
15. Ling L, Goeddel DV. MIP-T3, a novel protein linking tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 to the microtubule network. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Aug 4; 275(31):23852–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001095200> PMID: 10791955
16. Wilson P. A., Gardner S. D., Lambie N. M., Commans S. A., and Crowther D. J. Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J. Lipid Res*. 2006. 47: 1940–1949. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600185-JLR200> PMID: 16799181
17. Rydel TJ, Williams JM, Krieger E, Moshiri F, Stallings WC, Brown SM, Pershing JC, Purcell JP, Alibhai MF. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry*. 2003 Jun 10; 42(22):6696–708. <https://doi.org/10.1021/bi027156r> PMID: 12779324
18. Tran JQ, de Leon JC, Li C, Huynh MH, Beatty W, Morrisette NS. RNG1 is a late marker of the apical polar ring in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton*. 2010 Sep; 67(9):586–98. <https://doi.org/10.1002/cm.20469> PMID: 20658557
19. Skariah S, Bednarczyk RB, McIntyre MK, Taylor GA, Mordue DG. Discovery of a novel *Toxoplasma gondii* conoid-associated protein important for parasite resistance to reactive nitrogen intermediates. *The Journal of Immunology*. 2012 Apr 1; 188(7):3404–15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101425> PMID: 22387554
20. Anderson DM, Schmalzer KM, Sato H, Casey M, Terhune SS, Haas AL, Feix JB, Frank DW. Ubiquitin and Ubiquitin-Modified Proteins Activate the *Pseudomonas aeruginosa* T3SS Cytotoxin, ExoU. *Mole Micro*. 2011 Dec 82(6): 1454–1467.
21. Sidik SM, Huet D, Ganesan SM, Huynh MH, Wang T, Nasamu AS, Thiru P, Saeij JP, Carruthers VB, Niles JC, Lourido S. A genome-wide CRISPR screen in *toxoplasma* identifies essential apicomplexan genes. *Cell*. 2016 Sep 8; 166(6):1423–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.019> PMID: 27594426
22. Huynh MH, Carruthers VB. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryotic cell*. 2009 Apr 1; 8(4):530–9. <https://doi.org/10.1128/EC.00358-08> PMID: 19218426
23. Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VB. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2–M2AP adhesive protein complex. *The EMBO journal*. 2003 May 1; 22(9):2082–90. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg217> PMID: 12727875
24. Mineo JR, Kasper LH. Attachment of *Toxoplasma gondii* to Host Cells Involves Major Surface Protein, SAG-1 (P-30). *Experimental Parasit*. 1994 August 79(1):11–20.
25. Huynh M, Boulanger MJ, Carruthers VB. A Conserved Apicomplexan Microneme Protein Contributes to *Toxoplasma gondii* Invasion and Virulence. *Infection and Immunity* p. 4358–4368 October 2014 Volume 82 Number 10 <https://doi.org/10.1128/IAI.01877-14> PMID: 25092910
26. Dobrowolski JM, Sibley LD. Toxoplasma Invasion of Mammalian Cells Is Powered by the Actin Cytoskeleton of the Parasite. *Cell*. 1996 March; 84(6):933–939. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81071-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81071-5) PMID: 8601316
27. Hakansson S, Charron AJ, Sibley LD. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J*. 2001 June 20(12) 3132–3144. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3132> PMID: 11406590
28. Koshy AA, Fouts AE, Lodoen MB, Alkan O, Blau HM, Boothroyd JC. Toxoplasma secreting Cre recombinase for analysis of host-parasite interactions. *Nat Methods*. 2010. 7, 307–309. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1438> PMID: 20208532
29. Besteiro S, Bertrand-Michel J, Lebrun M, Vial H, Dubremetz JF. Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* tachyzoites rhoptries: further insights into the role of cholesterol. *Biochemical Journal*. 2008 Oct 1; 415(1):87–96. <https://doi.org/10.1042/BJ20080795> PMID: 18564055
30. Del Carmen MG, Mondragon M, Gonzalez S, Mondragon R. Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cellular microbiology*. 2009 Jun; 11(6):967–82. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01304.x> PMID: 19416276
31. Connell E, Darios F, Broersen K, Gatsby N, Peak-Chew SY, Rickman C, Davletov B. Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin–Munc18. *EMBO reports*. 2007 Apr 1; 8(4):414–9. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400935> PMID: 17363971
32. Jebbari H, Roberts CW, Ferguson DJ, Bluethmann H, Alexander J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite immunology*. 1998 May; 20(5):231–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00152.x> PMID: 9651924

33. Schlüter D, Kwok LY, Lütjen S, Soltek S, Hoffmann S, Körner H, Deckert M. Both lymphotoxin- α and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *The Journal of Immunology*. 2003 Jun 15; 170(12):6172–82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.6172> PMID: [12794148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12794148/)
34. Mueller C, Klages N, Jacot D, Santos JM, Cabrera A, Gilberger TW, Dubremetz JF, Soldati-Favre D. The *Toxoplasma* protein ARO mediates the apical positioning of rhoptry organelles, a prerequisite for host cell invasion. *Cell host & microbe*. 2013 Mar 13; 13(3):289–301.
35. Dubey JP. Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years. *Veterinary parasitology*. 2009 Jul 7; 163(1–2):1–4. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.026> PMID: [19395175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19395175/)
36. Martorelli Di Genova B, Wilson SK, Dubey JP, Knoll LJ. Intestinal delta 6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLoS Biology*. 2019 17(8):e3000364. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000364> PMID: [31430281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31430281/)
37. Soldati D, Boothroyd JC. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science*. 1993 Apr 16; 260(5106):349–52. <https://doi.org/10.1126/science.8469986> PMID: [8469986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8469986/)
38. Brown T. Southern blotting. *Current protocols in molecular biology*. 1993 Jan; 21(1):2–9.
39. Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Molecular and biochemical parasitology*. 1993 Jun 1; 59(2):327–9. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90231-I](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90231-I) PMID: [8341329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8341329/)
40. Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. Health evaluation of experimental laboratory mice. *Current protocols in mouse biology*. 2012 Jun; 2(2):145–65.

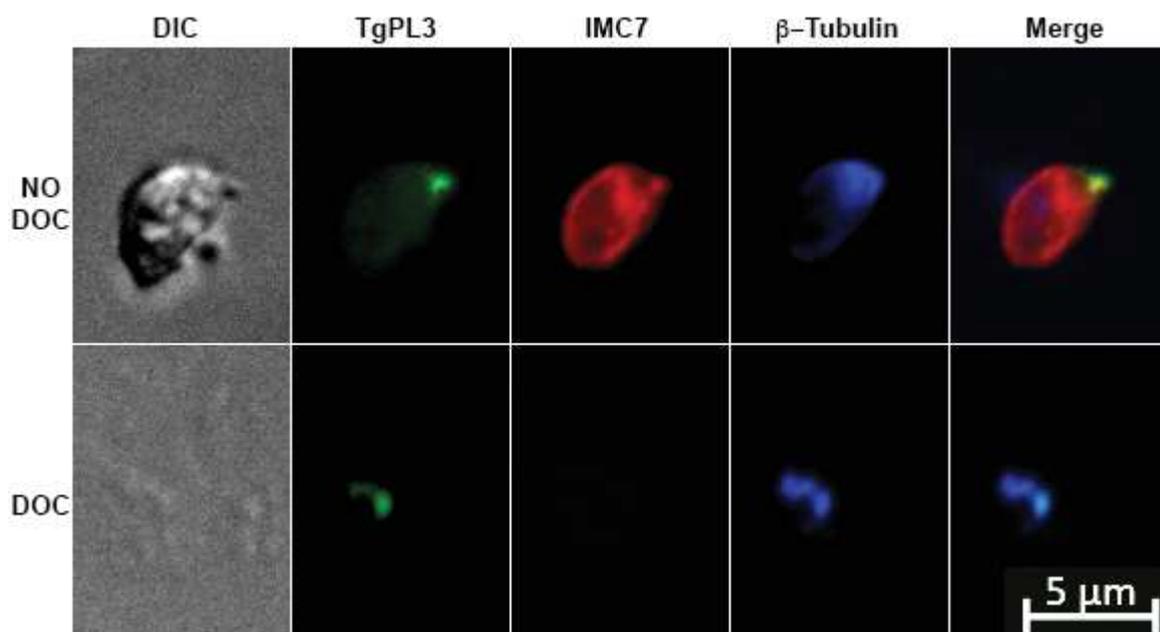
Supporting information

A

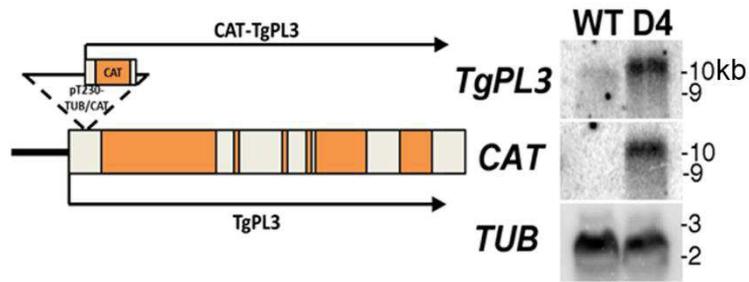
Peptide Number	Start Location	Antigenic Determinant	Length	Antigenicity/Surface/Hydrophilicity	Disordered Score	Synthesis	Mus_musculus Rattus_norvegicus Oryctolagus_cuniculus blast
1	2496	CRNSAHDKDRHNEGD	14	3.40/1.00/1.39	0.2292	Easy	42% 49% 42%
2	107	HSKKSDFSPRSVATC	14	2.88/0.79/0.65	0.1592	Easy	49% 49% 64%
3	1260	CRLKPKASKGDREK	14	2.49/0.86/1.36	0.2764	Easy	56% 56% 57%



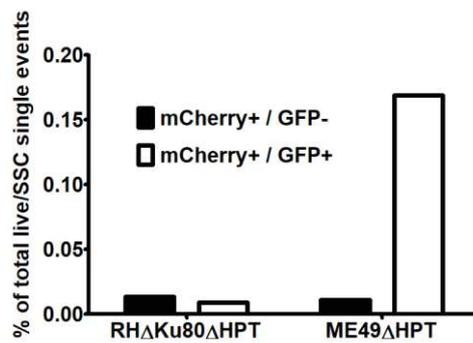
S1 Fig. Antibodies against synthetic TgPL3 peptides confirm localization.



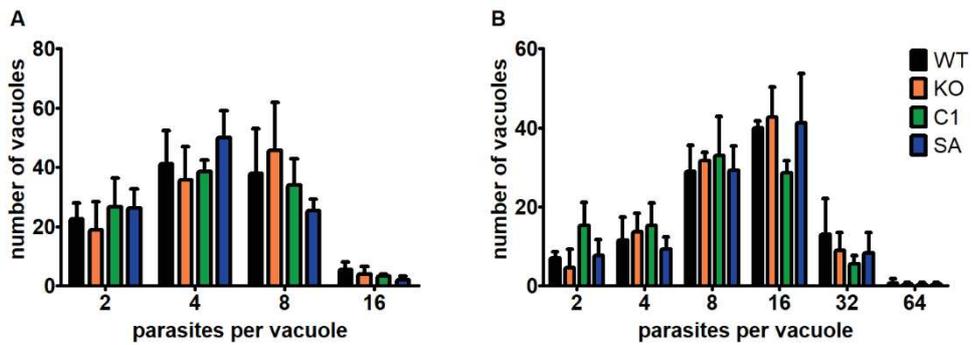
S2 Fig. TgPL3 localizes with β -tubulin even after DOC extraction.



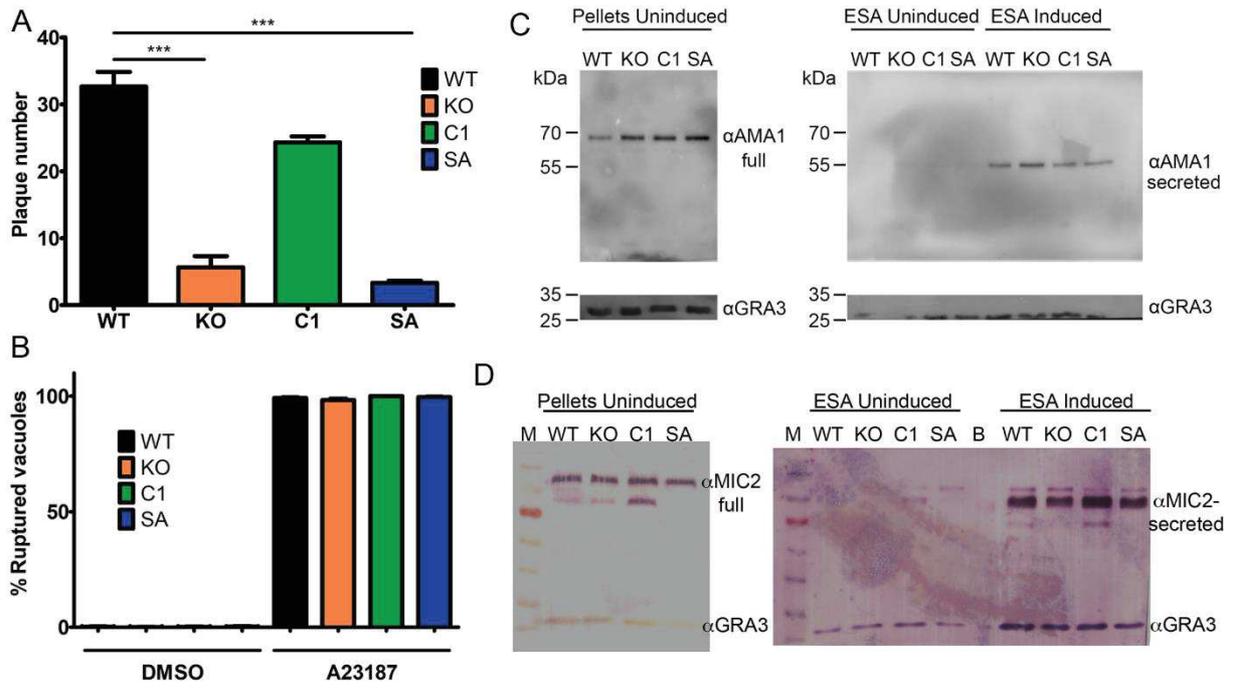
S3 Fig. STM insertional mutant does not disrupt transcription.



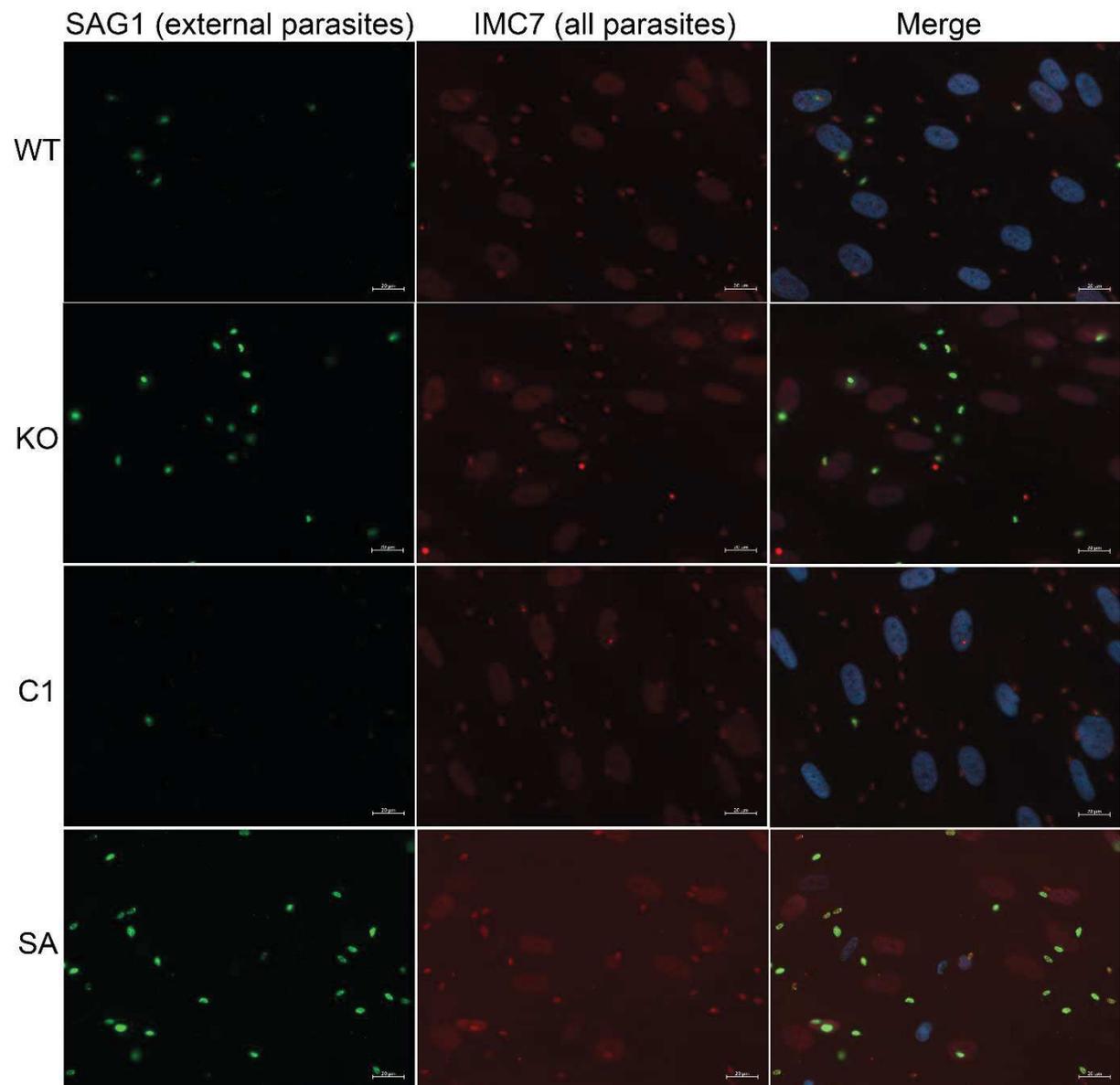
S4 Fig. FACS sorting for clonal populations of Δ TgPL3.



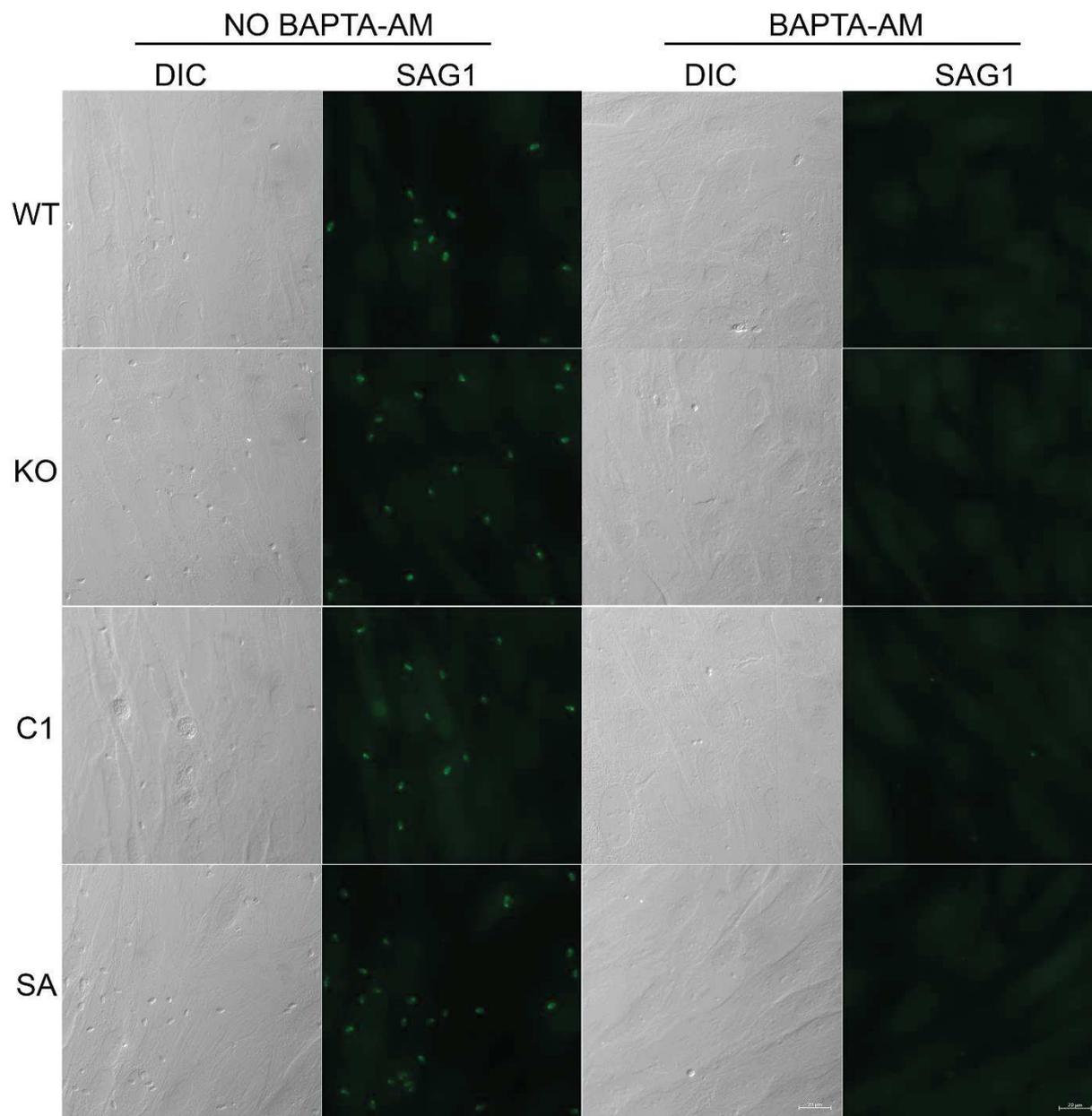
S5 Fig. TgPL3 is not critical for the replication rate of internalized parasites.



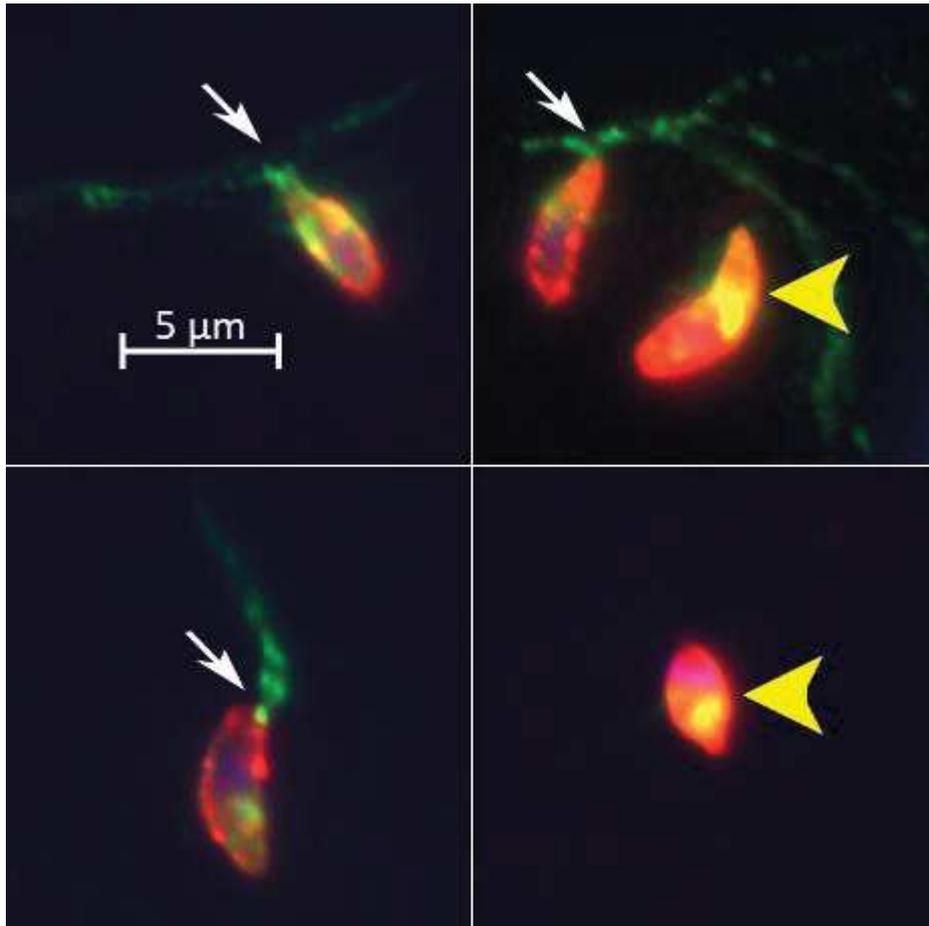
S6 Fig. TgPL3 deletion does not affect egress or microneme secretion.



S7 Fig. Representative images from the invasion assay.

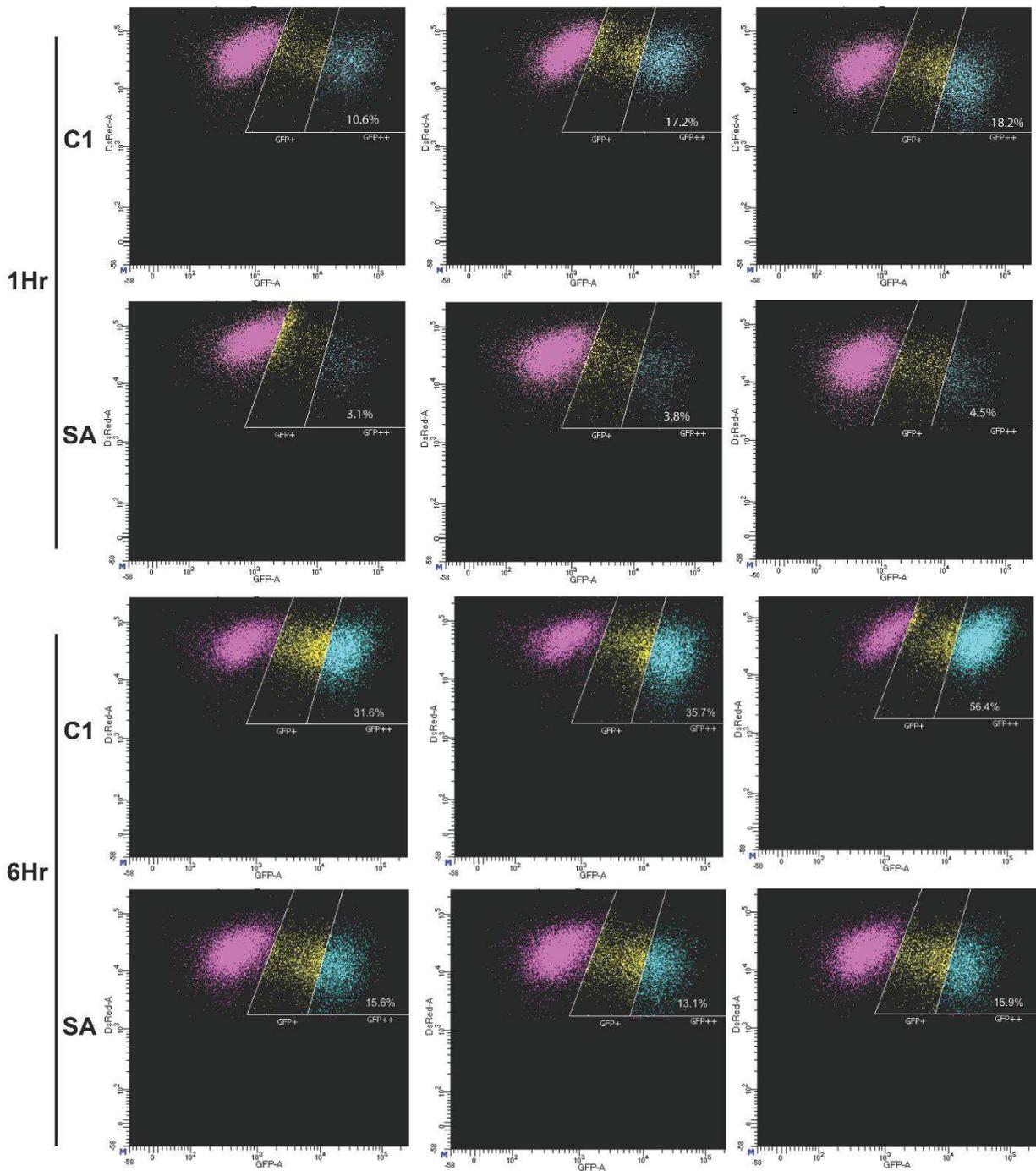
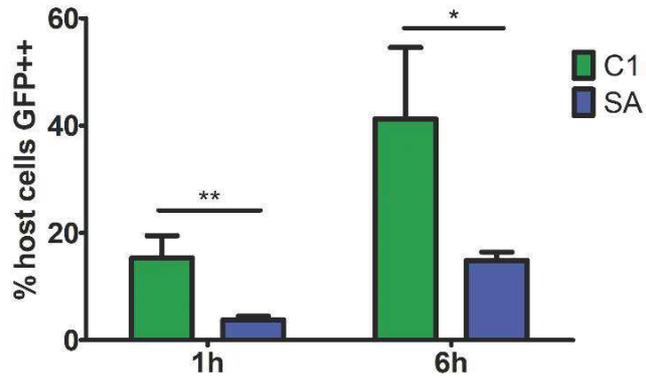


S8 Fig. Representative attachment assay images.



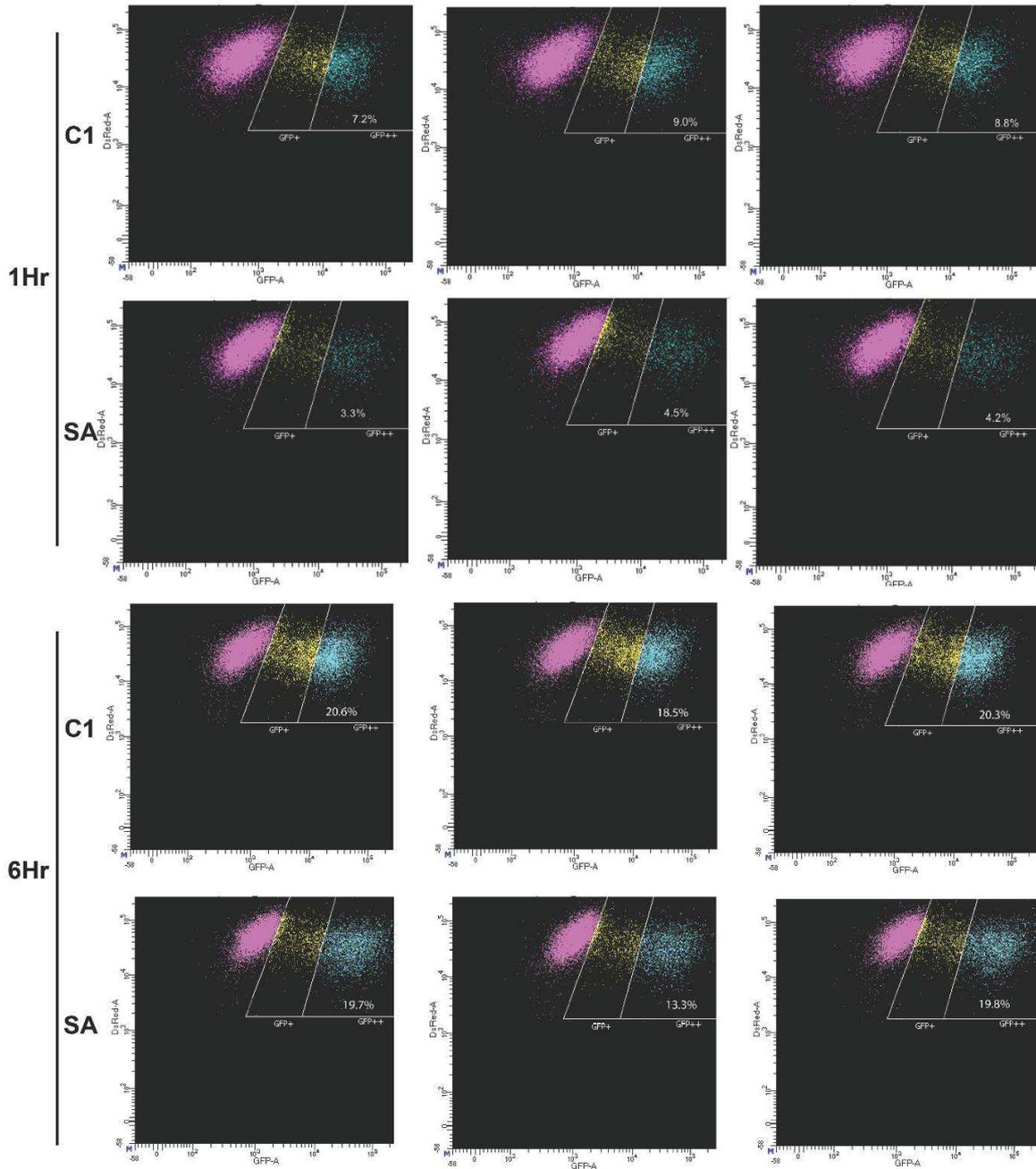
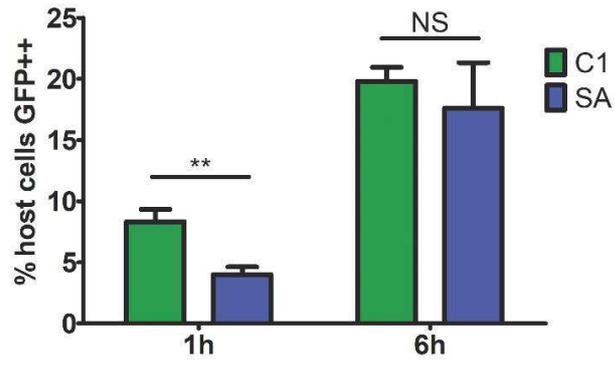
S9 Fig. Representative e-vacuoles.

Experiment 1

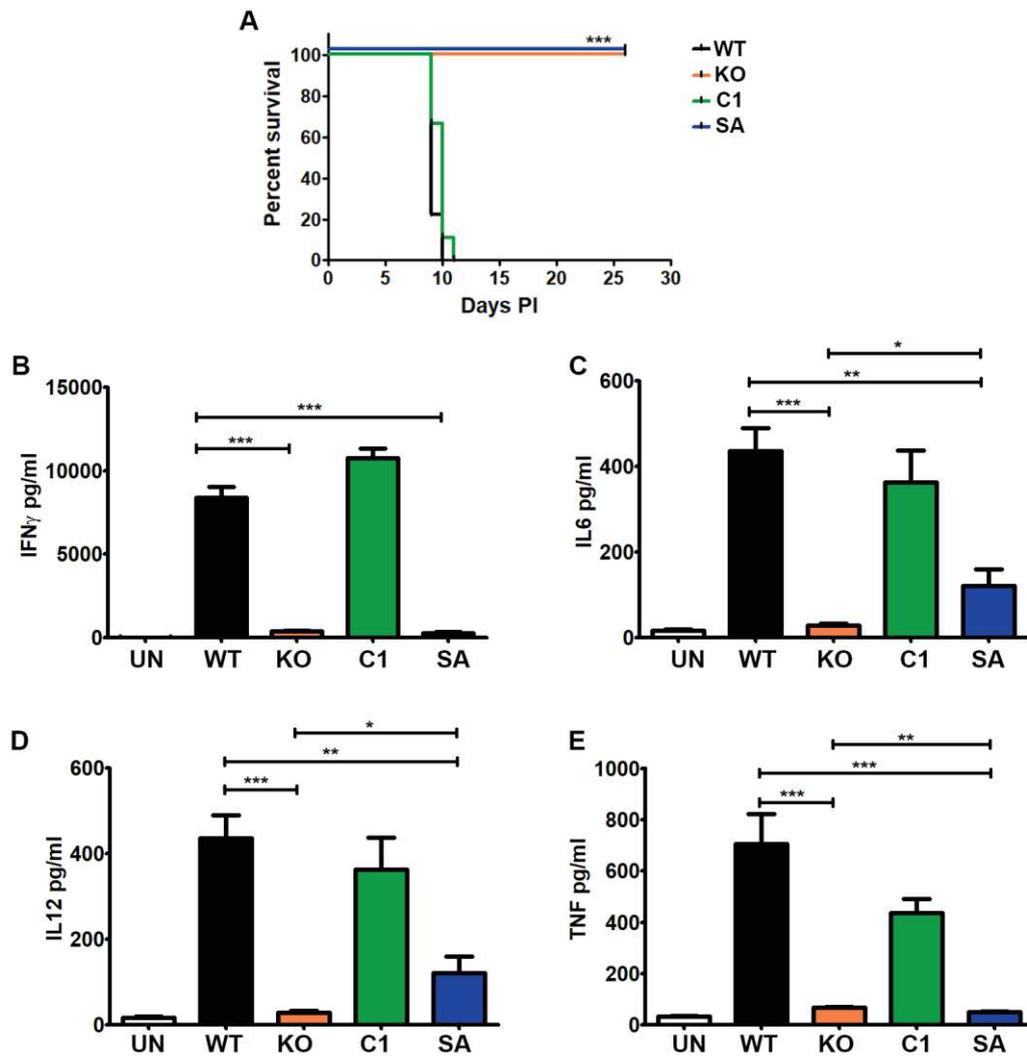


S10 Fig. FACS plots from SeCreEt assay experiment 1.

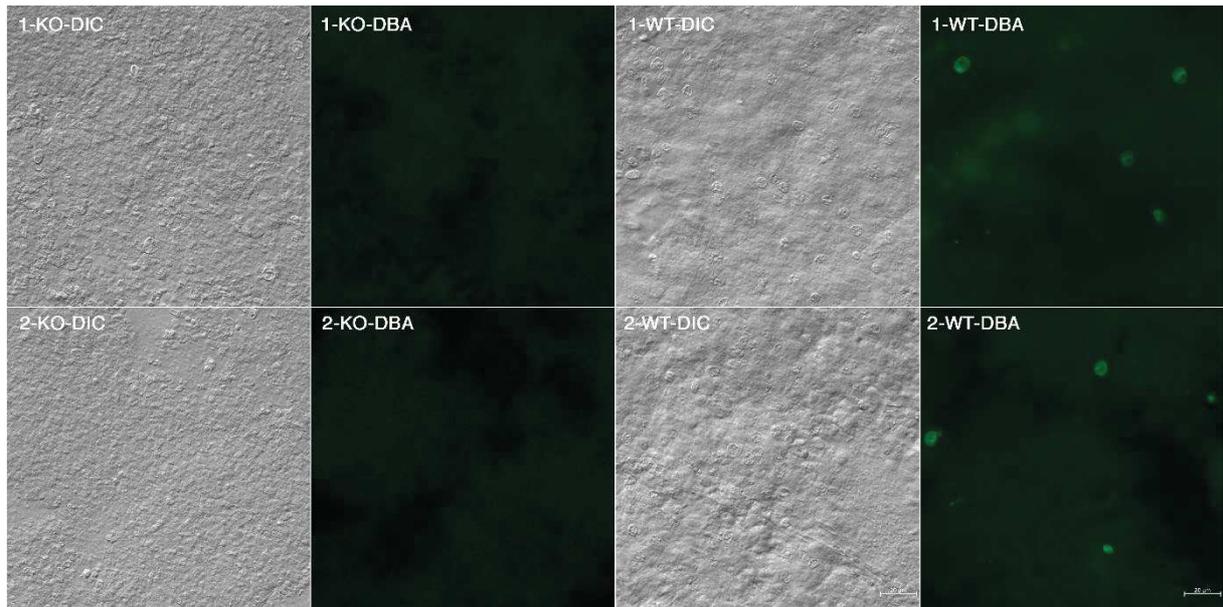
Experiment 2



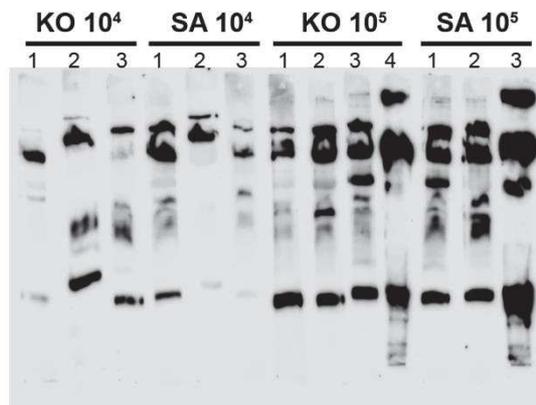
S11 Fig. FACS plots from SeCreEt assay experiment 2.



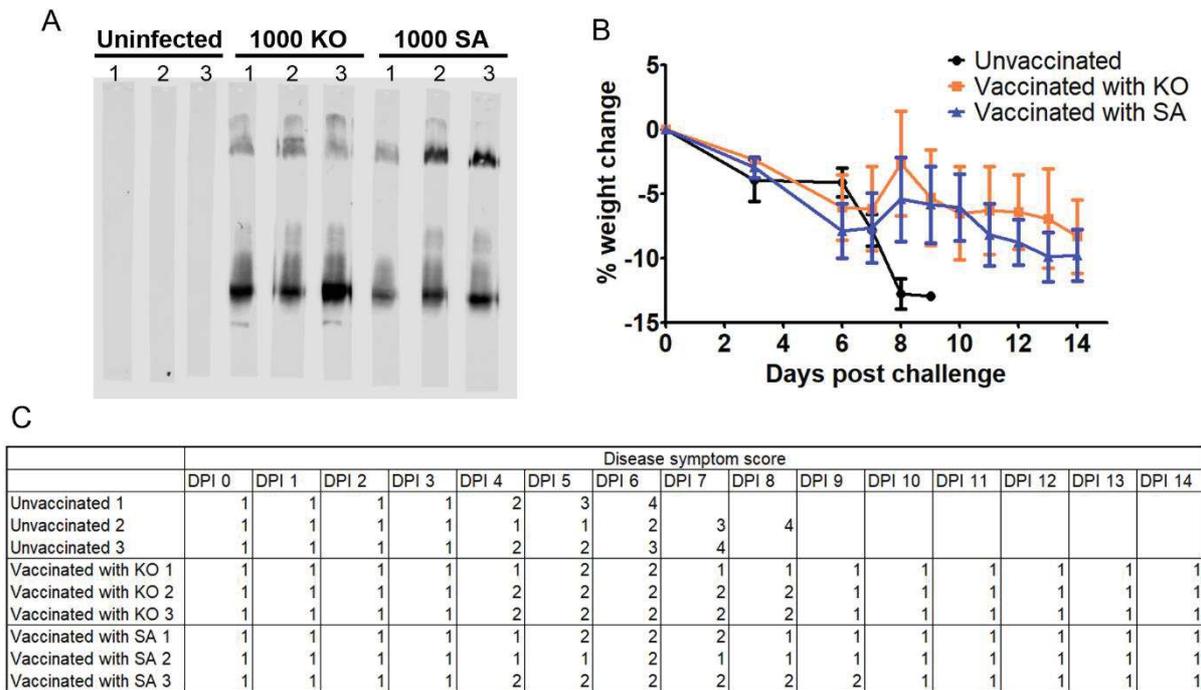
S12 Fig. Δ TgPL3 and S1409A parasites are avirulent at a low infectious dose.



S13 Fig. Representative infected brain samples.



S14 Fig. Δ TgPL3 and S1409A parasites are avirulent at a high infectious dose.



S15 Fig. Δ TgPL3 and S1409A parasites induce a protective immunity against subsequent infections.

Primer name	Use	Primer Sequence (5' to 3')
GFP GA F	GFP for FACS	AGTGACACTCTAGACTAGTATGTCCGCGTTCGTGAAATTC
GFP GA R	GFP for FACS	GCTGGCCTTTTGCTCAACATGTCGGGGGGGCAAGAATTG
mCherry GA F	mCherry for FACS	GGGCGAATTGGGTACCTGTCCCGCTTCGTGAAATTC
mCherry GA R	mCherry for FACS	CGGACATACTAGTCTAGAGTGTACTGTAGCCTGCCAGAAC
TgPL3 US F	TgPL3 upstream flank	CTATAGGGCGAATTGGGTACCACGCCTAGTTGCATGCTTG
TgPL3 US R	TgPL3 upstream flank	ATTTACGAACGCGGGACAGCGTGTGATCAGCAACGGAC
TgPL3 DS F	TgPL3 downstream flank	GGCTACAGTGACACTCTAGAGAGATGCACCGATGGACG
TgPL3 DS R	TgPL3 downstream flank	ACGAACGCGGACATACTAGTACCAAGTGGAAAGCCAGTTG
TgPL3 gRNA F	TgPL3 gRNA Q5 mutagen.	CATTTCCGGGGCAGCGAATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
TgPL3 gRNA R	TgPL3 gRNA Q5 mutagen.	AACTTGACATCCCCATTTAC
TgPL3 ORF F	TgPL3 cDNA complement	CATGGGTTCTCACTCGACGTCGC
TgPL3 ORF R	TgPL3 cDNA complement	AATTGGTGCATGCACGTGATGACTC
Q5 S1409A F	S1409A Q5 mutagenesis	CGCCGGTGCCCGCGCTGGCGG
Q5 S1409A R	S1409A Q5 mutagenesis	ACGGGAGTGTACTGGTTAATCACATTCGCCTCGC
mCherry gRNA F	mCherry gRNA Q5 mutagen.	CTGAAGGACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
mCherry gRNA R	mCherry gRNA Q5 mutagen.	CTTCAGCCTAACTTGACATCCCCATTTAC
Southern probe F	Southern blot probe	CCGTTTCTCCCGTTTGTGG
Southern probe R	Southern blot probe	CAGCAACGGACAAGTCTAC
PLP F	wheat germ expression PLP	AAAAGTAGTGAAGAAGCGTACTCTGCG
PLP R	mCherry gRNA Q5 mutagen.	AATTCTAGATTAACCTGCGAACGGTTTTCTCTCG
ML3522	SeCreEt donor DNA PCR F	TTGGTCACGCCTCCACAAGGCGTATTCCTCAAAGCACGGAGGAGAGACG
ML3523	SeCreEt donor DNA PCR R	CTTGTCGCGCACCAAGGCGCTCACAACTATAGGCACCCAGGCTTTACA
ML3445	SeCreEt gRNA 5' F	AAGTTGCAGGGCTTCTAAAATGGCGCG
ML3446	SeCreEt gRNA 5' R	AAAACGCGCCATTTTAGAAGCCCTGCA
ML2087	SeCreEt gRNA 3' F	AAGTTGGCTCCCACGTCCTCACCATG
ML2088	SeCreEt gRNA 3' R	AAAACATGGTGAGGGACGTGGGAGCCA
ML3547	SeCreEt 5' integration F	GTATCAGTTGTGCGCGGAAG
ML3190	SeCreEt 5' integration R	TCCCGTTACAGGTGTACGGG
ML3546	SeCreEt 3' integration F	GAGGGCTAGCAAAGCGTC
ML3187	SeCreEt 3' integration R	CTCGGCTCCATCTCATTCC

S1 Table. Primer list.

Résumé

L'invasion de la cellule hôte par les parasites *Apicomplexes* est médiée par la sécrétion séquentielle et coordonnée de deux types d'organites apicaux spécialisés : les micronèmes et les rhoptries. Les événements de fusion membranaire et mécanismes de l'exocytose de ces organites restent peu connus. Les Apicomplexes font partie, avec les Ciliés et les Dinoflagellés, du phylum des Alveolés. Les Alveolés, bien qu'ayant de substantielles différences morphologiques, partagent notamment la présence d'organites sécrétoires. Chez *Paramecium tetraurelia*, un Cilié, de précédentes études ont permis d'observer que l'exocytose des trichocystes, leurs organites sécrétoires, pouvait être induite par diverses stimulations. En analysant des mutants déficients pour l'exocytose, nommés Nd pour « non-discharge », ces études ont identifié des composants essentiels du système de fusion membranaire. Notre équipe a démontré précédemment la conservation des gènes *Nd6* et *Nd9* chez *Toxoplasma* et *Plasmodium* et leur implication dans l'invasion et la sécrétion des rhoptries. *Nd6* et *Nd9* appartiennent à un complexe comprenant deux autres facteurs également conservés chez les Ciliés et que l'équipe a montré nécessaire à la sécrétion des rhoptries et des organelles de sécrétion d'un autre cilié *Tetrahymena*. Ces résultats supportent l'hypothèse d'un mécanisme d'exocytose des rhoptries conservé chez les Alveolés. Chez *Tetrahymena*, les gènes impliqués dans la biogenèse et la sécrétion des organites de défense sont exprimés au cours du cycle de façon synchronisée. Dans un criblage bio-informatique, nous avons identifié les gènes de *Tetrahymena* co-régulés avec le gène *Nd6* conservés chez les Apicomplexes. Nous avons démontré que deux protéines de *Toxoplasma gondii*, appelées *Nd11* et *Nd12* et identifiées par ce criblage, sont impliquées dans l'invasion, et que l'incapacité à envahir en l'absence de ces protéines pourrait être liée à une perte de la capacité à sécréter les rhoptries. *Nd11* et *Nd12* sont localisées dans le cytoplasme de manière ponctuelle et possèdent de nombreux domaines transmembranaires ainsi que des domaines prédits d'interaction avec des protéines ou des sucres. Par Co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse, nous avons démontré que *Nd11* et *Nd12* interagissaient entre elles et avec deux autres protéines inconnues, impliquées dans les mécanismes d'invasion et de sécrétion des rhoptries et possédant des domaines de liaison aux sucres. Notre étude supporte l'hypothèse de la conservation des mécanismes de sécrétion au sein des Alveolata et valide l'utilité des études comparatives entre espèces comme stratégie d'identification d'effecteurs de l'exocytose chez les Apicomplexes. En outre cette étude a permis l'identification d'un nouveau complexe protéique essentiel à la sécrétion des rhoptries chez *T. gondii*.