



**HAL**  
open science

# Un récepteur unique et essentiel au *Toxoplasma* et au *Plasmodium* : de la structure-fonction vers de nouvelles stratégies thérapeutiques antiparasitaires

Houévo Ariane Honfozo

► **To cite this version:**

Houévo Ariane Honfozo. Un récepteur unique et essentiel au *Toxoplasma* et au *Plasmodium* : de la structure-fonction vers de nouvelles stratégies thérapeutiques antiparasitaires. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay; Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 2022. Français. NNT : 2022UP-ASL089 . tel-04050149

**HAL Id: tel-04050149**

**<https://theses.hal.science/tel-04050149>**

Submitted on 29 Mar 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.

# Un récepteur unique et essentiel au *Toxoplasma* et au *Plasmodium* : de la structure-fonction vers de nouvelles stratégies thérapeutiques antiparasitaires

*A unique and essential receptor for Toxoplasma and Plasmodium: from  
structure and function to new antiparasitic therapeutic strategies*

**Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay et de l'Université  
d'Abomey-Calavi**

École doctorale n° 577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

**Spécialité de doctorat** : Biologie moléculaire et cellulaire

**Graduate school** : Sciences de la vie et santé. Référent : Faculté des Sciences d'Orsay

Thèse préparée dans les unités de recherche **Institute for Integrative Biology of the  
Cell (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS)** et **Laboratoire de Biochimie et Biologie  
Moléculaire (Université d'Abomey-Calavi, MESRS)**

Sous la direction de Monsieur **Stanislas TOMAVO**, Directeur de recherche et  
Madame **Lucie AYI-FANOU**, Professeure

**Thèse soutenue à Abomey-Calavi, le 13 Décembre 2022, par  
Houévo Ariane HONFOZO**

## Composition du Jury

Membres du Jury avec voix délibérative

<b>Monsieur Lamine BABA-MOUSSA</b> Professeur, Université d'Abomey-Calavi	Président & Rapporteur
<b>Monsieur Jérôme CLAIN</b> Directeur de recherche, Université Paris Cité	Rapporteur & Examineur
<b>Madame Sylviane PIED</b> Directrice de recherche, Université de Lille	Rapporteur & Examinatrice
<b>Monsieur Laurent COMBETTES</b> Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Examineur
<b>Monsieur Maximin SENOU</b> Maître de Conférences, Université Nationale des Sciences, Technologies, Ingénierie et Mathématiques, Abomey	Examineur
<b>Monsieur Akadiri YESSOUFOU</b> Professeur, Université d'Abomey-Calavi	Examineur

**Titre :** Un récepteur unique et essentiel au *Toxoplasma* et au *Plasmodium* : de la structure-fonction vers de nouvelles stratégies thérapeutiques antiparasitaires

**Mots clés :** *Toxoplasma*, *Plasmodium*, Récepteur, Structure-fonction, Thérapeutiques

**Résumé :** Les *Apicomplexa* sont un embranchement de parasites protozoaires intracellulaires obligatoires responsables de graves pathologies aussi bien chez l'homme que chez les animaux. *T. gondii* et *P. falciparum* sont des membres notables de ce phylum et possèdent, à l'instar de leurs homologues un assortiment d'organites sécrétoires apicaux exclusifs (micronèmes et rhoptries) qui orchestrent leur entrée dans la cellule hôte. Les micronèmes interviennent dans la motilité, l'attachement, et enfin l'échappement de la cellule hôte après la réplication du parasite. Les rhoptries agissent en synergie avec les protéines des micronèmes pour permettre l'invasion et sont également impliquées dans le détournement des fonctions de l'hôte et l'établissement de la vacuole parasitophore. Cependant, chez *T. gondii*, notre modèle d'étude, ces organites sont sous la dépendance de *TgSORT*, un récepteur cargo transmembranaire résidant dans le post-Golgi et l'ELC et qui assure le tri des protéines de ces organites. En effet, le domaine N-terminal (N-SORT) fixe les protéines des micronèmes et des rhoptries qu'il conduit à l'ELC afin qu'elles servent plus tard à la biogenèse des micronèmes et des rhoptries. Il est de ce fait indispensable à la virulence et à la survie du parasite. *TgSORT* est homologue à la sortiline humaine, un récepteur multifonctionnel requis pour le transport des protéines vers les lysosomes par une voie indépendante du mannose-6-phosphate. Un homologue est également présent chez *P. falciparum* où il joue un rôle tout aussi crucial pour la survie du parasite. Cette thèse a pour objectif principal d'étudier les mécanismes d'interaction entre *TgSORT* et ses ligands.

Nous avons établi un protocole et exprimé dans *Pichia pastoris* *TgN-SORT*, qui était précédemment insoluble lorsqu'elle était exprimée dans *E. coli*. Nous avons également exprimé ses partenaires MIC5, ROP18 et ROP16. Par ailleurs, nous avons réalisé des expériences de cryoEM de *TgN-SORT* qui ont montré qu'elle présente une structure torique, ce qui est conforme aux prédictions. Cette observation a été confirmée par le puissant algorithme Alphafold 2 qui nous a permis d'obtenir avec un score de confiance satisfaisant la structure 3D de *TgN-SORT*. Cette structure est semblable à celle de la sortiline humaine et se présente sous la forme de 10 domaines  $\beta$ -propellers arrangés sous forme d'hélice suivis de deux motifs 10CC avec un tunnel central. Chez le parasite, trois boucles sont retrouvées à l'extérieur du tunnel. En outre, Alphafold 2 a révélé une liaison directe entre *TgN-SORT* et les protéines de rhoptries grâce aux mêmes motifs qu'utilise la sortiline humaine pour lier la neurotensine. Par la suite, nous avons testé 12 composés positifs identifiés à partir d'un screening automatisé d'une librairie de 1121 composés sur une souche transgénique de *T. gondii* SORT-GFP/ROP1-mCherry que nous avons générée. L'objectif est d'identifier des petites molécules qui pourraient modifier profondément la distribution subcellulaire du récepteur *TgSORT* et celle des protéines de rhoptries qui dépendent de sa fonction biologique. Les activités de 4 composés parmi les douze ont été validées sur la souche de référence *P. falciparum* 3D7.

**Title: A unique and essential receptor for *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*: from structure and function to new therapeutic strategies**

**Keywords:** *Toxoplasma*, *Plasmodium*, Receptor, Structure, Function, Therapeutic

*Apicomplexa* is a phylum of obligate intracellular protozoan parasites responsible for serious diseases in both humans and animals. *T. gondii* and *P. falciparum* are notable members of this phylum and possess, like their counterparts, an assortment of exclusive apical secretory organelles (micronemes and rhoptries) that orchestrate their entry into the host cell. Micronemes are involved in motility, attachment, and finally escape from the host cell after parasite replication. Rhoptry proteins act in synergy with microneme proteins to enable invasion and are involved in the hijacking of host functions and the establishment of the parasitophorous vacuole. In *T. gondii*, our model of study, these organelles are dependent on *TgSORT*, a transmembrane cargo receptor residing in the post-Golgi and endosome-like compartment (ELC) that sorts proteins from these organelles. Indeed, the N-terminal domain (*TgN-SORT*) binds microneme and rhoptries proteins and lead them to the ELC for later use in these organelles biogenesis. The receptor is thus essential for the virulence and survival of the parasite. *TgSORT* is homologous to human sortilin, a multifunctional receptor required for protein transport to lysosome using a mannose-6-phosphate independent pathway. A homolog is also present in *P. falciparum* where it plays an equally crucial role for parasite survival. The main objective of this thesis is to study mechanisms of interaction between *TgSORT* and its ligands.

Using the yeast *Pichia pastoris*, we successfully expressed and purified *TgN-SORT*, which was previously insoluble when expressed in *E. coli*. We also produced its partners MIC5, ROP18 and ROP16. In addition, we performed cryoEM experiments of *TgN-SORT*, which showed that *TgN-SORT* has a toroidal structure, which is consistent with predictions. This observation was confirmed by the powerful AlphaFold 2 algorithm, which allowed us to obtain with a satisfying confidence score the 3D structure of *TgSORT*. This structure is similar to that of human sortilin and is in the form of 10  $\beta$ -propeller domains arranged as a helix followed by two 10CC motifs with a central tunnel. In the parasite, three loops are found outside the tunnel. In addition, AlphaFold 2 revealed direct binding between *TgN-SORT* and rhoptries proteins through the same motifs that human sortilin uses to bind neurotensin. Subsequently, we tested 12 positive compounds identified from an automated screening of a library of 1121 compounds on a transgenic strain of *T. gondii* SORT-GFP/ROP1-mCherry that we generated. The objective is to identify small molecules that could profoundly alter the subcellular distribution of the *TgSORT* receptor and rhoptries proteins that depend on its biological function. The activities of 4 of the 12 compounds were validated on the reference strain *P. falciparum* 3D7.





## REMERCIEMENTS

Au terme de ces années d'étude, ma profonde gratitude va à l'endroit de toutes les personnes et institutions qui ont contribué de près ou de loin à leur déroulement.

Merci

- ✚ Au Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'Ambassade de France au Bénin et à l'Union Economique et Monétaire Ouest Africaine (UEMOA) pour le financement,
- ✚ Au Dr Stanislas TOMAVO, Chef de l'équipe de Trafic Intracellulaire et Biogenèse des Organites chez *Toxoplasma gondii* (TIBOT) à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) en France pour avoir encadré ce travail, en particulier pour ses contributions scientifique et financière afin de permettre son aboutissement,
- ✚ A ma co-directrice de thèse Prof Lucie AYI-FANOUE et au Dr Mènonvè ATINDEHOU pour n'avoir ménagé aucun effort en vue de permettre la réalisation de mes travaux et ce, dans de bonnes conditions,
- ✚ Aux membres du jury pour avoir accepté évaluer ce travail en dépit de leurs multiples occupations,
- ✚ A la direction de l'I2BC pour m'avoir accueillie au sein de l'institut, au service des ressources humaines pour toutes les démarches administratives menées pour faciliter mes séjours, ainsi qu'aux directeurs de l'école doctorale Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV),
- ✚ Aux différents membres des comités de suivi thèse au Bénin et en France. Mes pensées chaleureuses vont à l'endroit du Dr Agnès DELAHODDE qui nous a quittés trop tôt.

- ✚ A Sophie ZINN-JUSTIN pour sa grande contribution à travers la chromatographie d'exclusion stérique et pour ses analyses structurales.
- ✚ A Ana ARTENI, Malika OULD ALI, et Rania GHOUIL du département B3S de l'I2BC pour les efforts considérables fournis pour la cryoEM,
- ✚ Au Prof Achille MASSOUGBODJI et au Dr Célia DECHAVANNE pour m'avoir acceptée au CERPAGE afin que j'effectue les expériences sur *Plasmodium falciparum* ainsi qu'à Sébastien DECHAVANNE, Firmine VIWAMI et Odilon NOUATIN pour avoir apporté leur expertise,
- ✚ Au Professeurs Ambaliou SANNI et Latifou LAGNIKA pour toutes les démarches menées en vue de la réalisation de ma thèse de doctorat,
- ✚ A Marie-Eliane CASTOR et Amirdavalli SUKUMAR pour leur précieuse aide dans la stérilisation des milieux de culture et leur sollicitude,
- ✚ Aux différents membres de l'équipe TIBOT présents au cours de mes séjours : Mahendra JAMDHADE, Omar NDAO, Rodrigue HOUNGUE et Aïssatou DIENG ; merci pour les échanges scientifiques et pour les bons moments passés ensemble
- ✚ A Fulbert AGBO'SAGA et Blanche AGUIDA pour m'avoir apporté leur aide inconditionnelle pendant mon séjour en France malgré les différents challenges auxquels ils faisaient face en ce moment,
- ✚ A Sara HOUNGUE, Firmin SAGBO et Frédéric ASSOGBA pour leur aide dans les démarches administratives au Bénin
- ✚ A ma famille, en particulier mes parents Daniel HONFOZO et Aurélie NANSOUNON, et ma tante Eulalie NANSOUNON pour les efforts consentis et pour leurs prières, à mes sœurs et à Monel GAFFAN pour son soutien en toute circonstance,
- ✚ A toutes les personnes qui y ont contribué d'une manière ou d'une autre.

## ARTICLES

**Ariane Honfozo**, Rania Ghouil, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, Malika Ouldali, Ana-Andreea Arteni, Mènonvè Cynthia Atindehou, Lucie Ayi Fanou, Yetrib Hathout, Sophie Zinn-Justin and Stanislas Tomavo (2023). The luminal domain of *Toxoplasma gondii* sortilin adopts a ring-shaped structure exhibiting motifs specific to apicomplexan parasites. *Front. Parasitol.* 2:1103772. doi: 10.3389/fpara.2023.1103772

**Ariane Honfozo**, Rodrigue Houngue, Alexandre Vandeputte, Sébastien Dechavanne, Odilon Nouatin, Mènonvè Cynthia Atindehou, Lucie Ayi Fanou, Achille Massougbodji, Célia Dechavanne, Priscille Brodin and Stanislas Tomavo (2023). An image-based high-content screening for compounds targeting *Toxoplasma gondii* repurposed inhibitors effective against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* [doi: 10.3389/fcimb.2023.1102551](https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1102551)

## **SIGLES ET ABREVIATIONS**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AMA1** : Antigène Membranaire Apical 1

**ATc**: AnhydroTétracycline

**BDNF**: brain-derived neurotrophic factor

**BMGY**: Buffered Glycerol-complex Medium

**BMMY**: Buffered Methanol-complex Medium

**CDPK4**: protéine kinase dépendant du calcium

**CMI**: Complexe Membranaire Interne

**CORVET**: Class C core vacuole / endosome tethering

**CPRG**: ChloroPhenol Red- $\beta$ -D-Galactopyranoside

**CS**: circumsporozoïte

**DHFR**: Dihydrofolate réductase

**DHPS**: dihydroptéroate synthétase

**DMEM**: Dulbecco's Modified Eagle Medium

**Drps**: Dynamin-related proteins

**EBA**: l'antigène de liaison aux érythrocytes

**EGF**: Epidermal Growth Factor

**ELISA**: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**GPI**: glycoposphatidylinositol

**GRA**: GRAnule dense protein

**GTP**: Guanosine TriPhosphate

**HFF**: Human Foreskine Fibroblast

**HOPS:** Homotypic fusion and vacuole protein sorting

**HO-TO:** Hoechst-Thiazole Orange

**ICAM-1:** InterCellular Adhesion Molecule 1

**IMC:** Inner Membrane Complex

**LpL:** Lipoprotéine Lipase

**M6P:** Mannose-6-Phosphate

**MPS:** protéines de surface du mérozoïte

**NGF:** Nerve Growth Factor- $\beta$

**NSF:** N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor

**NTS3:** neurotensin receptor-3

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

***Pf*cert:** *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

***Pf*dhfr:** *Plasmodium falciparum* dihydrofolate réductase

***Pf*dhps:** *Plasmodium falciparum* dihydroptéroate synthase

***Pf*mrp1:** *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein-1

***Pf*RRH:** protéines homologues de type réticulocytes

**PKG:** Protéine kinase cyclique GMP-dépendante

**proTgMIC3:** MICroneme protein 3

**RAMA-RAP:** Rhoptry-Associated Membrane Antigen-Rhoptry-Associated Protein

**RAP:** receptor-associated protein

**RBC:** Red Blood Cells

**SAG1:** Surface Antigen 1

**SNAREs:** N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor proteins

**SVF:** Sérum de Veau Fœtal

**TE:** Tris-EDTA

**TEV:** Tobacco Etch Virus

**TgAP1:** adaptor protein 1

**TgCAM1-2:** CALcium-binding proteins

**TgDLC1:** Dynein Light Chain TgCAM1-2

**TgFER:** Ferlins

**TgMIC1:** MICroneme protein 1

**TgMIC2:** MICroneme protein 2

**TgSORT:** *Toxoplasma gondii* Sortilin

**TgSPATR:** Secreted Protein with an Altered Thrombospondin Repeat

**TgSUB1:** Subtilisin-like protein

**Vps:** Vacuolar Protein Sorting

## Table des matières

REMERCIEMENTS .....	i
SIGLES ET ABREVIATIONS .....	iv
Liste des figures .....	ix
Liste des tableaux .....	x
Introduction .....	1
GENERALITES .....	4
I- <i>Toxoplasma gondii</i> et <i>Plasmodium falciparum</i> , deux parasites <i>Apicomplexa</i> .....	4
A- Généralités sur <i>T. gondii</i> .....	4
1- Différents types.....	5
2- Cycle biologique.....	5
3- Différentes formes parasitaires .....	8
4- Toxoplasmose .....	8
5- Diagnostic .....	9
6- Manifestations physiopathologiques .....	10
7- Traitement pharmacologique .....	11
8- Ultrastructure de <i>T. gondii</i> .....	11
9- Mécanisme d'invasion de la cellule hôte.....	17
B- Généralités sur <i>P. falciparum</i> .....	19
1- Ultrastructure de <i>P. falciparum</i> .....	19
2- Cycle biologique.....	21
3- Paludisme.....	24
II- Trafic intracellulaire des protéines des organites sécrétoires apicaux chez <i>T. gondii</i> .....	30
III- Famille des récepteurs à domaine Vps10p-D chez les mammifères .....	38
A- Origine et description .....	38
B- Localisation .....	40
C- Structure et Fonction .....	41
PROBLEMATIQUE .....	44
MATERIELS ET METHODES .....	46
I- Culture cellulaire.....	46
A- Culture de <i>T. gondii</i> .....	46
1- Culture des fibroblastes humains.....	46



2-	Entretien des parasites <i>T. gondii</i> .....	46
3-	Purification des parasites <i>T. gondii</i> .....	46
B-	Culture de <i>P. falciparum</i> .....	47
II-	Biologie moléculaire .....	47
A-	Construction des plasmides d'expression des protéines recombinantes N-SORT, N-SORT tronquée, ROP16, ROP18, MIC5 .....	47
B-	Transformation des souches <i>P. pastoris</i> .....	49
C-	Criblage des transformants <i>P. pastoris</i> par PCR.....	50
D-	Complémentation fonctionnelle par CRISPR-Cas9 de TgSORT dans le mutant iKO-TgSORT.....	51
III-	Biochimie .....	53
A-	Expression de protéines recombinantes N-SORT, MIC5, ROP16 et ROP18.....	53
B-	Chromatographie d'affinité et gel filtration ou chromatographie d'exclusion stérique.....	53
C-	Electrophorèse en gel de polyacrylamide et Western blot .....	54
D-	Test de l'activité anti-toxoplasmique d'inhibiteurs : dosage de la bêta-galactosidase .....	54
IV-	Biologie cellulaire .....	55
A-	Immunofluorescence indirecte sur <i>T. gondii</i> .....	55
B-	Test de l'activité antipaludique des inhibiteurs : cytométrie en flux .....	55
V-	Analyses statistiques .....	56
	RESULTATS .....	59
I)	Expression optimisée de TgN-SORT et ses partenaires dans la levure méthylo-trophique <i>P. pastoris</i> .....	59
II)	Evaluation des activités anti-toxoplasmique et anti-paludique de composés .....	74
	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	91
	PERSPECTIVES.....	99
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	100

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> <i>Ctenodactylus gundi</i> .....	4
<b>Figure 2:</b> Cycle de <i>T. gondii</i> (Delgado et al. 2022).....	7
<b>Figure 3:</b> Pellicule de <i>T. gondii</i> (d'après Keeley et Soldati, 2004) .....	13
<b>Figure 4:</b> Ultrastructure de <i>T. gondii</i> (Sanchez et Besteiro, 2021).....	17
<b>Figure 5:</b> Processus d'invasion de la cellule hôte (Shen et Sibley, 2012).....	19
<b>Figure 6:</b> Ultrastructure d'un mérozoïte de <i>P. falciparum</i> (Flammersfeld et al. 2018) .....	20
<b>Figure 7:</b> Cycle biologique de <i>P. falciparum</i> (Maier et al. 2019).....	24
<b>Figure 8:</b> Représentation schématique d'un trophozoïte montrant les sites d'action de nouveaux antipaludiques (Ashley and Phyto 2018).....	28
<b>Figure 9:</b> Représentation schématique de la sortiline humaine et de TgSORT (Sloves et al. 2012).....	36
<b>Figure 10:</b> Trafic intracellulaire vers les micronèmes (Venugopal et Marion 2018).....	37
<b>Figure 11:</b> Trafic intracellulaire vers les rhoptries (Venugopal and Marion 2018).....	38
<b>Figure 12:</b> Représentation schématique de Vps10p et des membres de la famille des récepteurs à domaine Vps10p-D .....	40
<b>Figure 13:</b> Structure de l'ectodomaine de Sortilin montrant une dimérisation à pH acide (Leloup et al. 2017).....	42
<b>Figure 14:</b> Structure 3D prédictive du domaine luminal de TgSORT (Sloves et al. 2012).....	43
<b>Figure 15 :</b> Construction du plasmide N-SORT-pPINK $\alpha$ -HC pour l'expression de protéine recombinante dans <i>P. pastoris</i> .....	48
<b>Figure 16:</b> Analyse de la propension au désordre de N-SORT en utilisant PrDOs.....	49
<b>Figure 17:</b> Schéma de TgSORT montrant les délimitations des différentes insertions.....	53
<b>Figure 18:</b> Expériences pilotes d'expression de MIC5 (23kDa).....	72
<b>Figure 19:</b> Expériences pilotes d'expression de ROP16 et ROP18 .....	73

## **Liste des tableaux**

**Tableau 1 :** Familles d'antipaludiques et mécanismes d'action

**Tableau 2 :** Liste des amorces utilisés

**Tableau 3 :** Liste des anticorps primaires utilisés

## Introduction

Les *Apicomplexa* représentent un embranchement de plus de 5000 espèces de parasites protozoaires intracellulaires obligatoires (Tonkin 2020; Briquet, Gissot, et Silvie 2022). Parmi les membres les plus notables de ce phylum figurent *Eimeria sp.*, agent pathogène pour la volaille et le bétail, *Cryptosporidia*, pathogène opportuniste pour les humains et les animaux, *Babesia* et *Theileria*, parasites du bétail, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), responsable de la toxoplasmose et *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), la cause la plus mortelle du paludisme (Hu et al. 2006a). *T. gondii* et *P. falciparum* sont les deux espèces dont la motilité et l'invasion ont été les plus étudiées en raison de leur accessibilité génétique et expérimentale (Fréchal and Soldati-Favre 2013a).

La toxoplasmose est une infection d'origine alimentaire présente à l'échelle mondiale. Sa fréquence et son mode de transmission sont influencés par le mode de vie, la présence de félinidés (hôtes définitifs) dans l'environnement et les comportements alimentaires différents et propres à chaque pays (Giraud, 2004). Ainsi, dans diverses régions du monde, il a été démontré que plus de 60% des populations sont infectées avec une prédominance dans les zones à climat chaud, humide et à basse altitude (CDC, 2018). *T. gondii* est la seule espèce du genre et ce parasite fait l'objet de nombreuses études à travers le monde à cause de son impact sanitaire. En effet, il est capable d'infecter toutes les cellules des organes de l'organisme humain, en particulier celles du cerveau provoquant des lésions graves et peut être fatal en cas d'immunodéficience liée au virus du SIDA. La toxoplasmose est également responsable d'affections oculaires qui peuvent être invalidantes de l'enfance jusqu'à l'âge adulte. Une infection par *T. gondii* pendant le premier trimestre de la grossesse, peut entraîner des avortements, des mortalités natales et des anomalies cérébrales irréversibles chez le nouveau-né.

Les parasites *Apicomplexa* partagent une variété de caractéristiques morphologiques qui représentent le signe distinctif du phylum. La plus remarquable est la présence d'un complexe apical auquel le phylum doit son nom (Hu et al. 2006 ; Morrissette and Sibley 2002a). Ce complexe est constitué d'un anneau polaire à travers lequel deux organites sécrétoires spécialisés (les micronèmes et les rhoptries) libèrent leurs contenus. Les protéines de micronèmes interviennent pour la motilité, l'attachement à la cellule hôte, l'invasion et la sortie des cellules tandis que celles des rhoptries participent à l'invasion et à l'établissement du parasitisme cellulaire (Boothroyd and Dubremetz 2008a; Dubois and Soldati-Favre 2019). Ces rôles clés rendent ces organites indispensables à la survie des apicomplexes. Le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse de

doctorat a découvert en 2012 chez *T. gondii*, un récepteur essentiel nommé *TgSORTLR* pour *T. gondii* SORTILIN Like Receptor ou *TgSORT* (Sloves *et al.* 2012). Le clonage et le séquençage de l'ADN complémentaire et la spectrométrie de masse ont révélé qu'il s'agit d'une protéine transmembranaire de 105 kDa qui sert de cargo pour le transport des protéines et facteurs de virulence vers les rhoptries (ROP) et micronèmes (MIC). *TgSORT* est localisé dans l'appareil de Golgi et les endosomes. Le domaine N-terminal du récepteur (NSORT) co-immunoprécipite les protéines ROP et MIC. L'invalidation du gène qui code *TgSORT* conduit à une délocalisation des protéines ROP et MIC qui diffusent dans le cytoplasme du parasite et celui de la cellule hôte. Par ailleurs cette invalidation a empêché la formation des rhoptries et des micronèmes. *TgSORT* est donc essentiel au bon adressage des protéines des organites sécrétoires et à la biogenèse de ces organites (Sloves *et al.* 2012). Toutefois, les mécanismes d'interaction entre le récepteur et ses partenaires restent inconnus jusqu'à ce jour.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse de doctorat dont l'objectif général est de déterminer le mécanisme d'interaction entre le récepteur *TgSORT* et les facteurs de virulence ROP et MIC et d'identifier à terme de possibles inhibiteurs de cette interaction.

Trois objectifs spécifiques découlent de ce principal objectif. Ce sont :

- Déterminer la structure tridimensionnelle du domaine N-terminal de *TgSORT* (NSORT) en absence de ligand et en présence des partenaires ROP et MIC
- Etudier l'interaction entre NSORT et ROP d'une part et entre NSORT et MIC d'autre part dans le but de mettre en évidence les acides aminés impliqués
- Caractériser des inhibiteurs identifiés lors d'un criblage en utilisant un parasite transgénique doublement fluorescent exprimant *TgSORT*-GFP (vert)/ROP1-RFP (rouge)

# GENERALITES

## GENERALITES

### I- *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*, deux parasites *Apicomplexa*

#### A- Généralités sur *T. gondii*

*T. gondii* est un protozoaire intracellulaire obligatoire et constitue un véritable modèle dans la biologie cellulaire des organismes *Apicomplexa*. C'est sans doute le plus répandu des parasites du phylum *Apicomplexa*, capable d'infecter presque tous les vertébrés à sang chaud, une cause courante d'infection chez les animaux domestiques et sauvages, de même que la population humaine mondiale (Robert-Gangneux et al, 2012). Historiquement, la découverte de *T. gondii* est attribuée à Charles Nicolle et Louis Manceaux en 1908, tous deux chercheurs à l'Institut Pasteur de Tunis. Dans l'optique d'explorer les réservoirs environnementaux de la leishmaniose, ils isolent un nouveau parasite au cours de prélèvements sur *Ctenodactylus gundi*, un rongeur autochtone de l'actuelle Tunisie (Figure 1). Ce parasite morphologiquement proche d'amastigotes de leishmanie mais avec des propriétés biologiques différentes : plus allongé, sans centrosome et ne pouvant pas se multiplier dans des milieux de culture spécifiques aux leishmanies (Nicolle et Manceaux, 1908 ; Dubey, 2008). De son côté, Alfonso Splendore à São Paulo a confirmé l'existence de *T. gondii* la même année chez un lapin de laboratoire au Brésil (Splendore, 1908 ; Hamidović, 2020). Le nom du genre du parasite provient de sa morphologie ; *Toxoplasma* (du grec toxon signifiant arc pour sa morphologie) et son nom d'espèce, *gondii*, a été donné pour sa découverte chez le rongeur *Ctenodactylus gundi* (Bittame, 2011).



**Figure 1:** *Ctenodactylus gundi*

Source : <https://www.biolib.cz> consulté le 07/09/22



## 1- Différents types

L'analyse génétique de populations de *T. gondii* isolées en Europe et en Amérique du nord, a permis de les classer en 3 lignées clonales nommées types I, II et III (Howe et Sibley 1995). Les différences génétiques entre ces trois différentes lignées sont estimées entre 1% et 3% tandis qu'elles sont très faibles au sein d'une même lignée (< 0,01%) (Aïjoka, 1998). Les différences phénotypiques entre les lignées se remarquent au niveau de leur virulence. Connue pour son extrême virulence, la souche RH est une souche de type I isolée dans un cas d'encéphalite aiguë chez l'homme

Les génotypes avec une majorité d'allèles de type I sont généralement les plus virulents (Mercier et al, 2010) avec une dose létale de 100% (DL100) pour un parasite moins de 10 jours post-infection (Sibley and Boothroyd 1992).

Le type II présente une virulence intermédiaire avec une dose létale  $DL_{50}$  supérieure à  $10^3$ . Le type III est quasiment non-virulent avec une dose létale supérieure à  $10^5$  (Sibley and Ajioka 2008). De plus, le taux de multiplication chez le type I est le plus élevé.

Cependant, depuis une vingtaine d'années, en Guyane française et en Amérique latine, des souches atypiques sont décrites. Ces souches ont la particularité d'être extrêmement pathogènes chez les patients immunocompétents et sont à la base de la définition d'une nouvelle entité clinique : la toxoplasmose amazonienne (Simon et al. 2019) .

## 2- Cycle biologique

*T. gondii* se démarque des autres apicomplexes par son aptitude à parasiter n'importe quel organisme homéotherme. Ces organismes représentent les hôtes intermédiaires, chez qui le parasite effectue un cycle évolutif incomplet composé exclusivement d'une phase asexuée. Par contre, chez les hôtes définitifs que sont le chat et autres félinés, le parasite développe un cycle évolutif complet comprenant une phase sexuée et une phase asexuée (Bittame, 2011). La majorité des mammifères a la capacité de convertir l'acide linoléique en acide arachidonique. La première étape de cette conversion est catalysée par la  $\Delta$ -6-désaturase. Les chats étant dépourvus de cette enzyme, ils puisent l'acide arachidonique de leur alimentation et l'acide linoléique est accumulée. Cette forte présence d'acide linoléique dans les intestins des félinés favorise la progression des bradyzoïtes vers les mérozoïtes puis vers les macro et microgamètes. C'est ce qui ferait d'eux les hôtes définitifs du parasite (Sinclair et al. 1979 ; English et Striepen, 2019).

## **2.1- Cycle sexué**

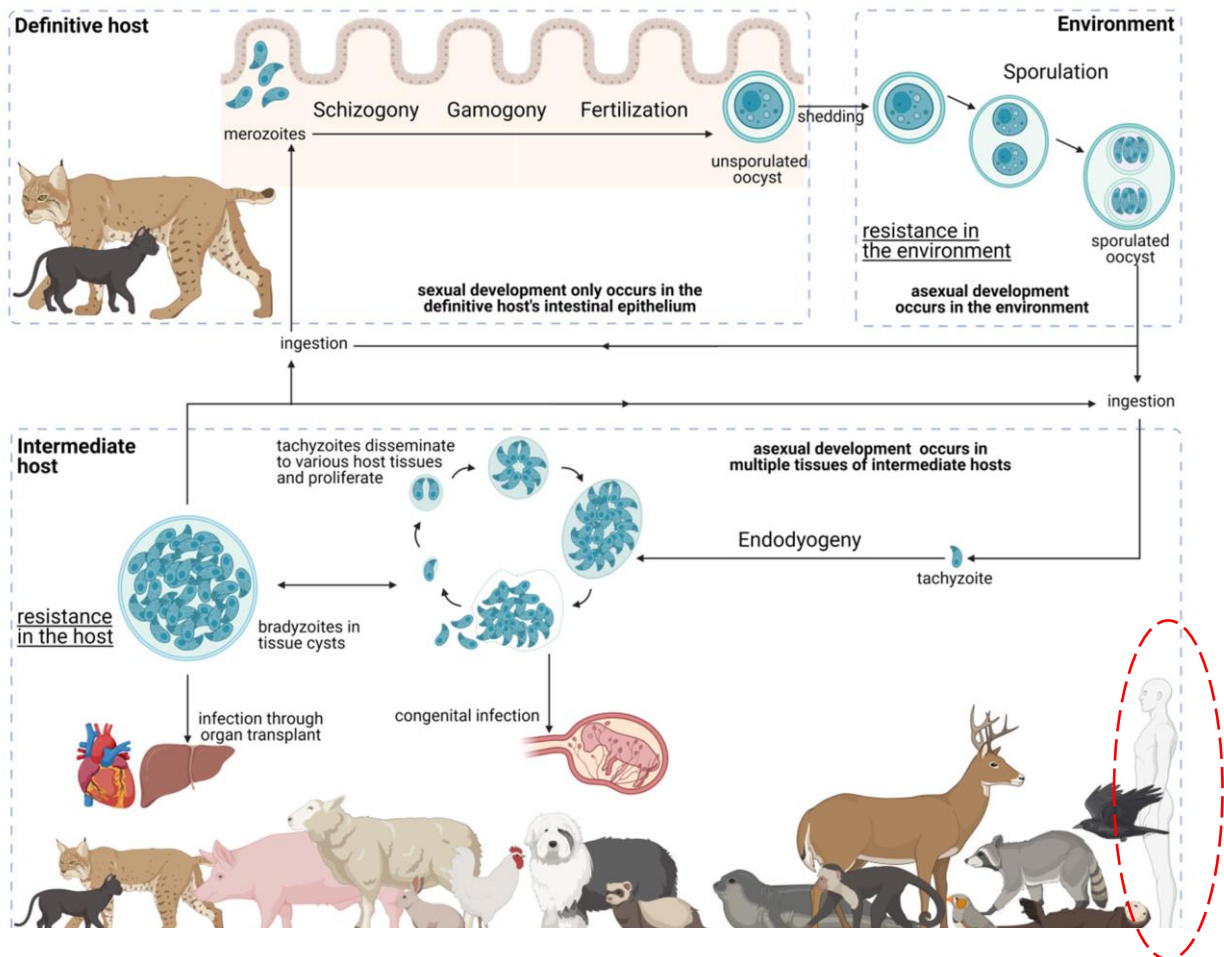
L'hôte définitif est contaminé par carnivorerisme (consommation d'animaux infectés contenant des bradyzoïtes enkystés) ou via l'ingestion d'oocystes sporulés dispersés dans la nature. Ces bradyzoïtes sont évacués des kystes sous l'effet des enzymes intestinales et de l'acidité du milieu puis ils envahissent les cellules épithéliales de l'intestin grêle. Malgré l'aptitude du parasite à se disséminer dans le corps de l'hôte définitif, l'infection ne donne lieu à des signes cliniques sévères que rarement (Calero-Bernal et Gennari, 2019). Les bradyzoïtes se développent dans l'intestin grêle en l'espace de quelques jours et donnent lieu à différents stades morphologiques (Speer et Dubey, 2005). La reproduction sexuée débute deux jours après l'ingestion des kystes. La formation des gamètes mâles et femelles dans l'épithélium intestinal commence deux jours après l'ingestion des kystes et dure jusqu'à 15 jours. La fusion de ces gamètes donnent naissance à des oocystes diploïdes recouverts d'une enveloppe imperméable. Ces oocystes sont libérés dans l'environnement via les fèces des félinés. Il faut rappeler que les chats ont l'habitude d'enfouir leurs selles dans la terre ou le sable, ce qui procure les conditions idéales à la survie des oocystes de *T. gondii*. Plusieurs facteurs tels que le vent, les animaux, la pluie participent à la prolifération des oocystes et cette dissémination est freinée par la fermeté et la densité des fèces. (Dubey, 2010).

## **2.2- Cycle asexué**

Les oocystes retrouvés dans l'environnement sont ingérés par hôte intermédiaire et débutent un nouveau cycle qui se manifestent sous la forme d'une reproduction asexuée. En effet, les sporozoïtes envahissent les cellules de l'hôte et se différencient très vite en tachyzoïtes à l'intérieur d'une vacuole parasitophore. Les tachyzoïtes sont aptes à la prolifération rapide et sont à la base des manifestations cliniques de la toxoplasmose aigüe (Tilley et al, 1997). Ils ont la capacité de se propager à travers les vaisseaux sanguins ou la lymphe et de contaminer divers organes (muscles, viscères et tissus nerveux) et diverses cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et les globules blancs (Dubey, 2010). Ce qui devient encore plus inquiétant lorsque l'infection est contractée pendant la grossesse car il y a des risques de transmission de la mère au fœtus des tachyzoïtes qui franchissent aisément la barrière placentaire. Par ailleurs, le fœtus ne dispose pas d'un système immunitaire propre. Cependant, le système immunitaire de l'hôte intervient et pousse les tachyzoïtes à se différencier en bradyzoïtes qui s'enkystent pour y échapper. La phase chronique

de l'infection se manifeste ainsi et perdure en théorie toute la vie de l'hôte (Elbez-Rubinstein et al, 2009).

En outre, le mode de contamination dépend du stade parasitaire. Les herbivores subissent une infection environnementale par ingestion des oocystes contenus dans l'eau ou les végétaux souillés par les excréments des félins. Les carnivores sont infectés par consommation des kystes retrouvés dans les tissus de leurs proies. Les omnivores tels que l'homme peuvent être contaminés des deux manières. Une bonne hygiène passant par le nettoyage des mains, des aliments et la consommation d'eau propre peut prévenir l'infection par les oocystes et une cuisson de la viande à plus de 60°C la contamination par les kystes (El-Nawawi et al, 2008).



**Figure 2:** Cycle de *T. gondii* (Delgado et al. 2022)

### **3- Différentes formes parasitaires**

*T. gondii* existe sous trois différentes formes évolutives partageant la même morphologie de croissant : le tachyzoïte, le bradyzoïte et le sporozoïte.

- **Le tachyzoïte**

Il est majoritairement présent dans l'épithélium intestinal lors de l'infection aiguë et parfois dans les fluides tels que la salive, le sang, la lymphe etc. (Derouin et al, 2005). Cette forme répliquative ressemble à un arc et mesure 6 à 8 µm de long et environ de 2 à 3 µm de large. Son extrémité apicale est plus effilée que sa base et son noyau est central (Dubremetz et al, 1993). Cette forme est la plus sensible aux conditions environnementales et physiologiques variées (Tenter et al, 2000). Chez la souris, elle est infectieuse suite à une trentaine de minutes d'exposition à 45°C. La pasteurisation lui est fatale (Derouin et al, 2005 ; Tenter et al, 2000).

- **Le bradyzoïte**

Le bradyzoïte provient du tachyzoïte lorsque le développement de ce dernier est freiné pour lui permettre de subsister à l'intérieur de kystes dans les tissus de l'hôte (Villeneuve, 2003). Cette forme latente est observée pendant la phase chronique de l'infection. Selon leur sénescence à l'intérieur des tissus, les kystes ont une taille allant de 5 à 100 µm et les bradyzoïtes ne sont libérés qu'à leur destruction (Dubey et al, 1998). Ils ont une forme allongée dans les muscles et globuleuse dans le cerveau (Dubey, 2010). Les kystes sont détruits à une température de 67°C (Dubey et al, 1990). Le bradyzoïte se différencie du tachyzoïte par son métabolisme ralenti se traduisant par son état de latence. De plus l'enkystement le rend inaccessible aux défenses immunitaires.

- **Le sporozoïte**

Cette forme est hébergée par les oocystes matures. Les oocystes sont des structures ovales mesurant 12 à 14 µm qui sont larguées dans le biotope avec les excréments des félins. Environ une semaine après leur excrétion, les oocystes forment des spores et sont infectieux. Chaque oocyste contient alors deux sporocystes comprenant chacun quatre sporozoïtes. La sporulation permet aux oocystes de survivre pendant environ un an dans un environnement humide (Tenter et al, 2000).

### **4- Toxoplasmose**

La toxoplasmose est présente dans toutes les régions du monde à des prévalences différentes et la majorité des études chez l'humain sont effectuées sur les femmes enceintes en raison du risque

encouru par le foetus. En France, en 2010, 36,7% de femmes enceintes étaient séropositives pour l'infection toxoplasmique (Tourdjman et al, 2015), 31% en 2016 (rapport CNR 2019). Chez les humains et les ovins, la toxoplasmose est une cause majeure d'avortements et est aussi responsable de baisses des performances de reproduction, de résorptions fœtales, de momifications, de mortinatalité et de mortalité néonatales (Innes et al, 2007).

La relation hôte/pathogène est un facteur déterminant dans la virulence du parasite. Chez certaines espèces, il peut être particulièrement virulent même lorsqu'il s'agit de souches classées comme non virulentes (Type II) selon les études expérimentales sur souris de laboratoire. Par exemple, une forte mortalité a été observée chez les singes du Nouveau-Monde (Epiphanio et al, 2003), des chats de Pallas en zoo avec des souches de Type II considérées comme non-virulentes chez la souris Swiss de laboratoire (Brown et al, 2005).

## **5- Diagnostic**

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour diagnostiquer la toxoplasmose. En Europe, le diagnostic repose généralement sur le dépistage sérologique au cours du premier trimestre de grossesse et un suivi mensuel chez les femmes testées négatives (Robert-Gangneux et al, 2012). Diverses méthodes de diagnostic peuvent être employées notamment ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ainsi que la PCR (Polymerase Chain Reaction) et ses variantes pour identifier des gènes spécifiques de *T. gondii* comme SAG1(Surface Antigen 1).

- **Dépistage sérologique**

C'est la méthode la plus courante et elle a pour but de dater l'infection en détectant les IgM spécifiques qui indiquent une phase aiguë et les IgG spécifiques, traduisant une plus vieille infection (Hill et Dubey, 2002).

- **Identification par fluorescence**

La fluorescence permet la détection et la quantification du parasite dans les tissus. La cytométrie en flux est très efficace sur des quantités minimales de tissus (cerveau de souris). Il en est de même pour la microscopie à haut débit (Aldebert et al, 2011).

- **Techniques de PCR**

Lorsque *T. gondii* est recherché dans la viande, les techniques de PCR se révèlent très sensibles, spécifiques et constituent des méthodes de diagnostic rapide (Bessières et al, 2009). Le recours à

la PCR en temps réel (qPCR) renseigne de surcroît sur la quantité d'acide désoxyribonucléique (ADN) présente. SAG1 et B1 sont les marqueurs les plus recherchés.

## **6- Manifestations physiopathologiques**

La toxoplasmose est la plupart du temps bénigne et ses symptômes sont quasiment imperceptibles chez les personnes immunocompétentes. En effet, aucune manifestation n'est décelée chez près de 80% des individus infectés et chez les 20% restant, des symptômes non spécifiques comme l'asthénie, la fièvre ou la lymphadénopathie sont présents (Halonen et Weiss, 2013 ; Taila et al, 2011).

Les signes cliniques varient selon la cible et la forme parasitaire. Ainsi, l'infection par *T. gondii* chez la femme enceinte varient en fonction de l'âge gestationnel à la primo-infection (avortement pendant le premier trimestre ; très graves lésions neurologiques, oculaires et autres atteintes multi-viscérales pendant le deuxième trimestre ; lésions moins sévères au cours du troisième trimestre) (Chalhoub, 2012). Chez le nouveau-né, les atteintes les plus graves sont : l'hydrocéphalie, le retard mental, l'épilepsie et la cécité, mais ces manifestations peuvent apparaître plus tard dans la vie (McAuley, 2014). Chez l'adulte, la défaillance du système immunitaire (cas d'infection par le VIH, cancer ou transplantation d'organe), peut donner lieu à une toxoplasmose sévère résultant soit d'une infection aigüe acquise, soit d'une infection latente réactivée (Wang et al, 2017, Ali et al, 2019). Dans le cas de la toxoplasmose oculaire aussi bien congénitale qu'acquise, l'installation d'une rétinite nécrosante peut progresser jusqu'à provoquer la cécité (Park et al, 2013). La dissémination des tachyzoïtes dans les muscles et le cerveau peut déclencher des lésions ou former des kystes qui peuvent se rompre en cas d'immunité faible. La sévérité et la fréquence plus élevées de la toxoplasmose oculaire en Amérique du Sud par rapport à l'Europe sont probablement dues à l'exposition à des souches plus virulentes (Gilbert et al, 2008 ; Pfaff et al, 2014).

Dans le domaine de l'élevage, les pertes économiques peuvent être importantes lorsque la toxoplasmose est contractée pendant la gestation et la sévérité de l'infection est dépendante de l'âge gestationnel. Des risques d'infertilité sont possibles au stade précoce de la gestation. Cependant, la primo-infection confère une immunité durable (Owen et al, 1998).

## **7- Traitement pharmacologique**

Lors d'une infection sans signe clinique chez un patient immunocompétent, aucun traitement n'est recommandé. Lors de toxoplasmose (choriorétinite, encéphalite), une combinaison de médicaments antiparasitaires est généralement prescrite (souvent constituée de sulfonamides et de pyriméthamine). En effet, les sulfonamides bloquent la fabrication des bases puriques et autres en rapport avec la formation des acides nucléiques et la pyriméthamine est un inhibiteur de la synthèse de l'acide folique, perturbant la synthèse des acides nucléiques parasitaires. L'efficacité de ces traitements sur les kystes toxoplasmiques sont très limités ou inexistantes. En effet, certains médicaments antifongiques tels que fluconazole et itraconazole ont montré une activité antitoxoplasmique sur les kystes chez la souris infectée par le toxoplasme (Martins-Duarte et al, 2010). Chez les animaux, aucun traitement n'est actuellement disponible. Plusieurs thérapies de toutes sortes (antimicrobiennes, anti-protazoaires, anti-fongiques, anti-bactériennes, immuno-modulatrices, anti-rétrovirales, anti-cancérigènes et anti-psychothiques) sont envisageables dans les revues de la littérature (Neville et al, 2015). Chez la femme enceinte, la clindamycine est proposée à cause de l'effet tératogène pour le fœtus de l'association pyriméthamine et sulfamides.

## **8- Ultrastructure de *T. gondii***

*T. gondii* possède les organites universels des eucaryotes que sont le noyau, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Toutefois, il arbore des organites spécifiques au phylum (Khan et al, 2005).

### **Les organites typiques des parasites *Apicomplexa***

*T. gondii* est pourvu des compartiments spécifiques que sont : la pellicule, le cytosquelette contenant des microtubules très stables et rigides, l'apicoplaste et des organites sécrétoires apicaux nommés rhoptries, micronèmes et granules denses, indispensables à l'infection de l'hôte. Les micronèmes permettent la reconnaissance de la cellule hôte, les rhoptries, la formation de la jonction mobile lors de l'invasion, de la vacuole parasitophore et la modulation de la réponse immune. En effet, un bon nombre des protéines ROP sont des kinases ou des pseudokinases qui sont envoyées dans le noyau de la cellule infectée pour contrôler la transcription des gènes de l'hôte en phosphorylant des molécules comme STAT1 ou STAT6, ce qui fait de ces ROPs des facteurs de virulences et les parasites de type I sont particulièrement connus pour avoir ces phénotypes contrairement au parasite de type II (Boothroyd and Dubremetz 2008a) (Saeij et al. 2006). Ces



deux organites, rhoptries et micronèmes ont une localisation apicale. Par ailleurs, *T. gondii* possède un troisième organite sécrétoire à savoir les granules denses dispersées dans tout le parasite ; les granules denses interviennent dans la maturation de la vacuole parasitophore en un compartiment fonctionnel permettant le développement du parasite (Carruthers et Sibley, 1997). Cependant, il a été récemment décrit en 2017 que certaines protéines GRA sont ciblées dans le noyau de la cellule infectée et y régulent la transcription (Hakimi, Olias, and Sibley 2017). En dehors du génome nucléaire, ce parasite a la particularité de disposer du génome de l'apicoplaste, organite caractéristique des *Apicomplexa* et du génome mitochondrial (Pelletier et al, 2002).

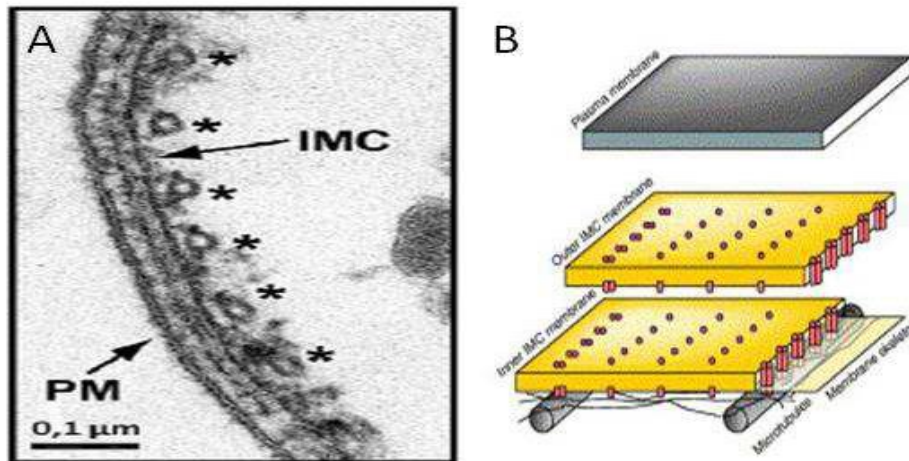
- **L'apicoplaste**

Tous les parasites apicomplexes excepté *Cryptosporidium parvum* possèdent un apicoplaste (Zhu et al, 2000). Cet organite provient d'une endosymbiose secondaire au cours de laquelle l'ancêtre des parasites de ce phylum aurait ingéré une algue rouge, il est donc entouré de quatre membranes lipidiques (Roos et al, 1999 ; Van Dooren et Striepen, 2013). Son génome est circulaire, mesure 35 kb et est composé d'environ 50 gènes. Au cours de l'évolution, un bon nombre de ces gènes a été transféré dans le génome nucléaire et code des protéines de cet organite. Par conséquent, cet organite n'a plus d'activité photosynthétique mais conserve ses fonctions de synthèse d'acides gras et de composés isoprénoïdes (Köhler et al, 1997). Les parasites génétiquement modifiés et privés d'apicoplaste n'étant pas viables, cet organite est essentiel au développement et à la survie de *T. gondii* (He et al, 2001).

- **La pellicule**

Le parasite est entouré d'une pellicule de 60 nm d'épaisseur composée d'une membrane externe, une membrane intermédiaire, et une membrane interne. La membrane plasmique du parasite correspond à la membrane externe. Elle est soutenue sur sa face cytoplasmique par un réseau complexe et hautement organisé de protéines de type filament intermédiaire et par un réseau subpelliculaire de cytosquelette de microtubules, qui joue un rôle déterminant dans la conduite de la motilité par glissement du parasite (Frénal et al, 2017). Ces protéines de surface (SAGs : Surface AntiGens) sont impliquées dans l'adhésion initiale du parasite à la cellule hôte lors du processus d'invasion ; dans la virulence de la souche parasitaire ; dans la modulation de la réponse immunitaire, et dans la protection du parasite en milieu extracellulaire (Mineo et Kasper, 1994 ; He et al, 2002).

Le complexe membranaire interne (CMI) (Figure 3) est interrompu à plusieurs niveaux : au niveau apical au-dessous du conoïde, au niveau de la partie postérieure arrondie du parasite, et au niveau du micropore, invagination circulaire et latérale de la membrane plasmique qui pourrait être impliquée dans les processus d'endocytose (Nichols et al, 1994).



**Figure 3:** Pellicule de *T. gondii* (d'après Keeley et Soldati, 2004)

- **Le cytosquelette cortical**

Le complexe apical, qui a donné son nom à l'embranchement des *Apicomplexa*, comprend une structure cytosquelettique appelée le conoïde (Figure 4). Il s'agit d'un assemblage de fibres disposées en spirale provenant des anneaux préconoïdaux, à l'extrémité distale de la structure, mais aussi de l'anneau polaire, d'où partent les 22 microtubules subpelliculaires. Le conoïde a la forme d'un cylindre conique constitué de filaments de tubulines polymérisées qui sont assemblés en proto-filaments de 26 à 30 nm de long enroulés en spirale selon une architecture originale (Hu et al, 2002).

Lors de l'invasion de la cellule hôte, la protrusion conoïdale ainsi que la sécrétion des protéines de micronèmes et de rhoptries à travers la membrane plasmique sont induites par le flux calcique. La rétraction du conoïde a lieu à la fin de l'invasion et implique notamment TgDLC1 (Dynein Light Chain) qui pourrait former une partie du moteur ; TgCAM1-2 (CALcium-binding proteins) qui réguleraient la motilité du conoïde suite à l'influx calcique précédant l'invasion (Hu et al, 2006).

- **Les micronèmes**

Les micronèmes sont des organites sécrétoires en forme de petits bâtonnets de 0,4 x 0,1 µm rattachés à la face cytoplasmique du CMI au niveau de l'apex du parasite. Ils renferment un grand

nombre de protéines qui jouent un rôle primordial dans l'infection. Ce sont les protéines MIC (pour MICronème) à domaine adhésine (TgMIC1 à TgMIC16), TgSUB1, protéine pourvue d'un domaine « subtilisin-like serine protease » et intervenant dans la formation de la jonction mobile, TgAMA1 (Apical Membrane Antigen 1) disposant de domaines de type thrombospondine et TgSPATR (Secreted Protein with an Altered Thrombospondin Repeat) (Kawase et al, 2010).

Les adhésines interviennent dans les processus d'attachement à la cellule hôte. C'est l'exemple de MIC2 qui se lie aux protéoglycannes héparanes sulfates et à la protéine ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) (Harper et al, 2004 ; Barragan et al, 2005). Par ailleurs, l'inactivation du gène TgMIC2 a provoqué des défauts dans le trafic de M2AP, la déficience de l'attachement et de l'invasion de la cellule hôte, la perte de la motilité par glissement hélicoïdale du parasite et l'incapacité à soutenir une infection létale dans un modèle murin de toxoplasmose aiguë. Ce qui montre que le complexe MIC2-M2AP est essentiel pour la virulence de *T. gondii* (My-Hang Huynh and Carruthers 2006). La protéine MIC1 reconnaît et interagit avec les résidus d'acides sialiques grâce au domaine lectinique (Blumenschein et al, 2007). Le complexe TgMIC3/TgMIC8 semble interagir avec du N-acétyl-glucosamine (Cerede et al, 2002 ; 2005). Les protéines TgMIC10 et MIC11 ne possèderaient pas de domaine d'adhésion. Ce sont des protéines solubles, courtes qui ne s'enchâssent pas dans la membrane du parasite au moment de l'invasion et qui auraient un rôle dans l'agencement des complexes protéiques dans les micronèmes.

Les protéines de micronèmes agissent en synergie au moment de l'invasion, les protéines transmembranaires établissant un lien entre la cellule hôte et le moteur acto-myosine situé sous la membrane parasitaire pour permettre la pénétration du parasite à l'intérieur de la cellule hôte (Jewett et Sibley, 2003). Les protéines de micronèmes de type perforine permettent l'échappement de la cellule hôte.

- **Les rhoptries**

*T. gondii* possède 6 à 12 rhoptries. Ces organites de sécrétion sont remarquablement gros et présentent une base en forme de bulbe et d'un cou effilé vers l'apex (mesures 2-3 $\mu$ m x 0,2  $\mu$ m). Leur cou effilé peut fusionner avec la membrane apicale. Les rhoptries possèdent un pH acide, ce qui suggère une origine émanant probablement des voies de sécrétion et d'endocytose (Shaw et al, 1998). Les rhoptries sont synthétisées via un organite intermédiaire, la pré-rhoptrie dans laquelle se déroule notamment un clivage protéolytique des protéines de rhoptries. Cette étape qui est cruciale pour la maturation des protéines de rhoptries et par conséquent à la formation d'un organite

fonctionnel (Shaw et al, 2002). On y trouve notamment des hydrolases spécialisées, caractéristiques des lysosomes des peptidases impliquées dans la maturation des protéines. (Que et al, 2002).

En effet, toutes les protéines de rhoptries possèdent un peptide signal, un prodomaine, et beaucoup présentent au moins un domaine transmembranaire potentiel ou une ancre GPI, ce qui suggère une association avec les membranes. Plusieurs ROPs et de RONs présentent des domaines répétés qui pourraient être impliqués dans des interactions protéines-protéines. Les protéines de rhoptries jouent un rôle dans l'établissement de la vacuole parasitophore tandis que d'autres serviraient à détourner ou contrôler certaines fonctions biologiques de l'hôte. C'est le cas des « expériences kinases » en présence de P32 qui ont montré l'autophosphorylation de ROP16 et cette protéine est capable de phosphoryler des substrats de la cellule hôte (Ong et al, 2010). On trouve également différents types de protéases dans les rhoptries. Par exemple, SUB2 est une sérine-protéase de type subtilisine qui a été identifiée par homologie avec la protéine SUB2 du parasite *P. falciparum* (Miller et al, 2003). Certaines protéines comme agissent dans le noyau de la cellule hôte. ROP18 phosphoryle et inactive une famille de GTPases liées à l'immunité de l'hôte, préservant le parasite de la lyse (Fentress et Sibley, 2011). ROP16 interfère avec la transduction du signal dans le noyau de l'hôte par la phosphorylation de l'activateur STAT3/6 (Butcher et al., 2011).

Les rhoptries de *T. gondii* contiennent aussi une fraction lipidique, composée majoritairement de cholestérol et de phospholipides parmi lesquels la phosphatidylcholine (Foussard et al, 1991). Lors du relargage des rhoptries, la sécrétion des lipides faciliterait la formation de la membrane de la vacuole naissante. Des études plus récentes suggèrent que le cholestérol contenu dans la membrane de la vacuole parasitophore provient majoritairement de la cellule hôte et que la contribution parasitaire bien que mineure, pourrait être essentielle à la formation de la vacuole parasitophore (Coppens et Joiner, 2003, Coppens, 2006).

- **Les granules denses**

Les granules denses constituent le troisième type d'organite sécrétoire et dont les protéines permettent l'établissement intracellulaire de *T. gondii* à l'intérieur de la vacuole parasitophore et participent au contrôle de la transcription (Mercier et al, 2015).

Avec des structures sphériques de 200 nm de diamètre, on dénombre environ 15 GD par tachyzoïte, dispersés dans l'ensemble du cytoplasme. La plupart des protéines GRA possèdent un peptide signal et un domaine transmembranaire de type I entouré par deux domaines hydrophiles. Les GRA

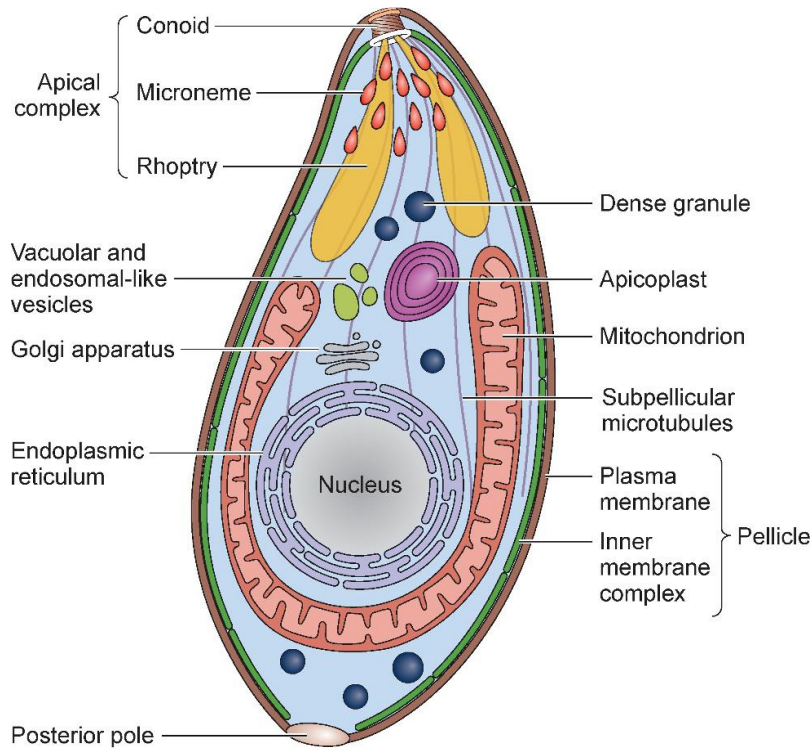
ne présentent pas d'homologie de séquences avec d'autres protéines connues. On retrouve dans cet organite également deux nucléotide-hydrolases (Bermudes et al, 1994), deux inhibiteurs de protéases (Pszenny et al, 2000) et une peptidyl-prolyl isomérase (Carey et al, 2000).

Les protéines GRA sont secrétées dans la vacuole parasitophore une fois celle-ci refermée autour du parasite (Carruthers et Sibley, 1997). Certaines protéines de granules denses sont impliquées dans la maturation de la vacuole parasitophore, dans le recrutement de nutriments au sein de la cellule hôte ou dans le déclenchement de la réponse immune de l'hôte. De plus, la sécrétion des granules denses intervient en deux temps, tout d'abord sous forme d'un pulse de sécrétion au moment de l'invasion, puis de manière continue pendant le développement intracellulaire du parasite. La sécrétion de ces organites ne peut être déclenchée par le  $Ca^{2+}$ . Elle présente donc des traits caractéristiques à la fois d'une sécrétion régulée et d'une sécrétion constitutive.

La sécrétion des protéines GRA coïncide avec des changements structuraux de la vacuole. Il y a en effet l'établissement d'un réseau membranaire formant des nanotubes présents dans l'espace entre les parasites et la membrane de la vacuole parasitophore. Ce réseau permet de connecter les parasites à la membrane interne de la vacuole parasitophore, et d'établir des liens entre eux. La majeure partie des protéines GRA est associée au réseau membranaire, soit au niveau des tubules membranaires (TgGRA2/TgGRA4/TgGRA6) (Mercier et al, 2002), soit au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore et des extensions vers le cytoplasme de la cellule hôte (TgGRA3/TgGRA5/TgGRA7/TgGRA8, Mercier et al, 2005).

- **La vacuole parasitophore (VP)**

La vacuole parasitophore sert de barrière physique entre *T. gondii* et le cytosol de la cellule hôte et protège le parasite contre l'acidification et la dégradation par les enzymes lysosomales (Dou et al. 2014). Elle est formée par invagination de la membrane plasmique de l'hôte au moment de l'invasion et est maturée par les protéines de granules denses afin d'offrir un environnement propice à la réplication et à la survie du parasite. *T. gondii* obtient le matériel de l'hôte par le biais de canaux membranaires et de transporteurs (Dou et al. 2014).



**Figure 4:** Ultrastructure de *T. gondii* (Sanchez et Besteiro, 2021)

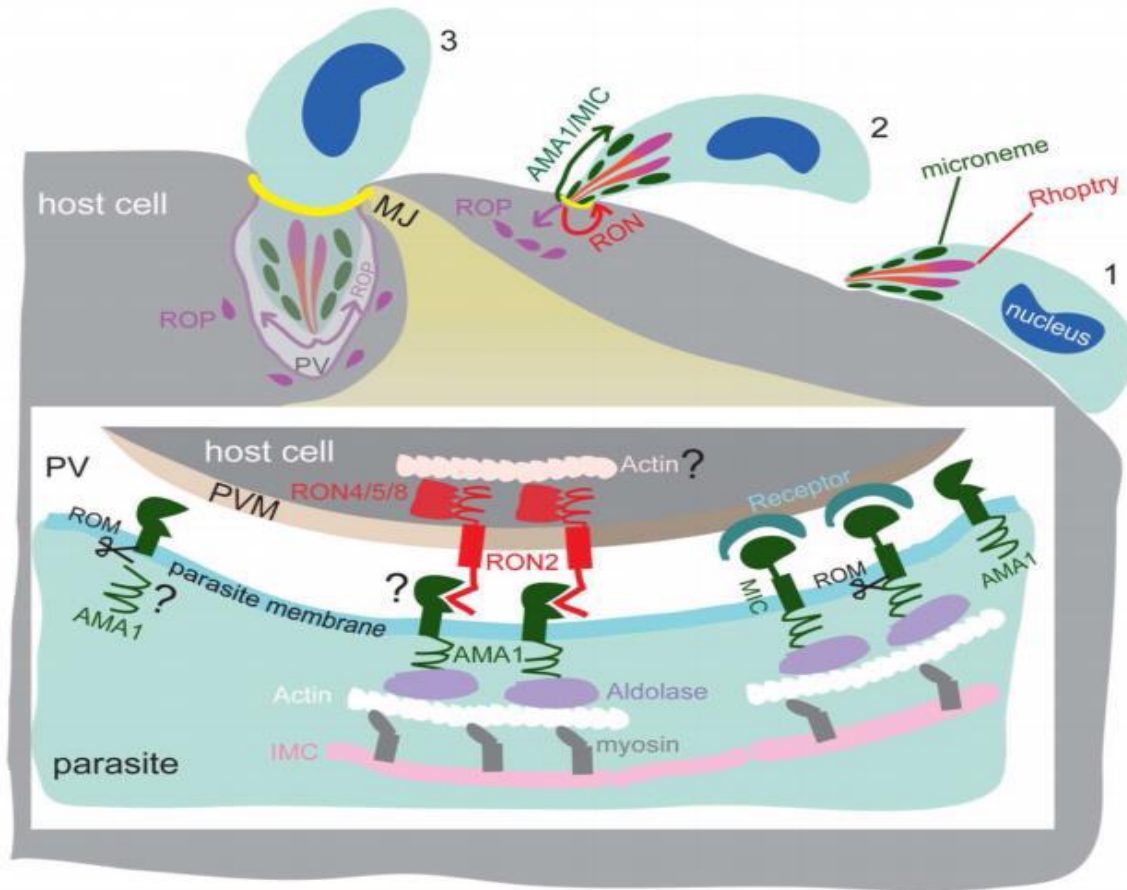
### 9- Mécanisme d'invasion de la cellule hôte

L'envahissement de la cellule hôte par les tachyzoïtes de *T. gondii* est régi par trois mécanismes successifs : l'attachement aux récepteurs de la cellule hôte ; la réorientation du pôle apical et la formation de la jonction mobile.

- L'attachement aux récepteurs** de la membrane plasmique (MP) de la cellule hôte : le contact entre les deux cellules est l'œuvre des protéines de micronèmes (MICs). La plupart de ces protéines possèdent un domaine extracellulaire et des adhésines facilitant ainsi leur rôle fonctionnel durant tout le processus d'invasion. Ainsi MIC1 possède un domaine lectine qui lui permet de rentrer en interaction avec des résidus d'acide sialique (Blumenschein et al, 2007). S'agissant de MIC2, elle se lie à des protéoglycannes héparines sulfates et la protéine ICAM-1 (Harper et al, 2004). Lors de ce contact membranaire entre le parasite et la cellule hôte, d'autres complexes protéiques telles que *TgMIC3/TgMIC8* (Figure 5) interagissent de façon spécifique avec de la N-acétyl-glucosamine de l'hôte (Cérède et al, 2005).

- Après ce premier contact, *T. gondii* **réoriente** son pôle apical qui vient se mettre perpendiculairement à la MP de la cellule hôte. Ce faisant la sécrétion des protéines ROP et MIC puis leur décharge dans la cellule en cours d'infection se mettent en route ainsi que le complexe moteur dénommé acto-myosine qui permet au parasite de glisser à l'intérieur de la cellule hôte. Il s'en suit la mise en place du complexe sous-membranaire (glidosome) qui résulte de la coordination du complexe acto-myosine et des MICs, ce qui donne la force motrice nécessaire au parasite pour invaginer la membrane plasmique de l'hôte (Jewett et Sibley, 2003 (Figure 5).
- **La création de la jonction mobile (JM)** : il s'agit du site contact entre les deux cellules et à travers lequel le parasite entre dans le cytoplasme de la cellule hôte. Elle est aussi indispensable à l'invasion comme les autres étapes d'ailleurs. La mise en place de la JM est l'œuvre de plusieurs protéines des micronèmes comme celles des rhoptries et surtout les protéines du cou des rhoptries (RONs). Les protéines RON2, RON4, RON5 et RON8 qui sont secrétées une fois libérées interagissent avec l'antigène majeur apical des micronèmes (AMA1) établissant ainsi la JM (Alexander et al, 2005 ; Besteiro et al, 2009).





**Figure 5:** Processus d'invasion de la cellule hôte (Shen et Sibley, 2012).

## B- Généralités sur *P. falciparum*

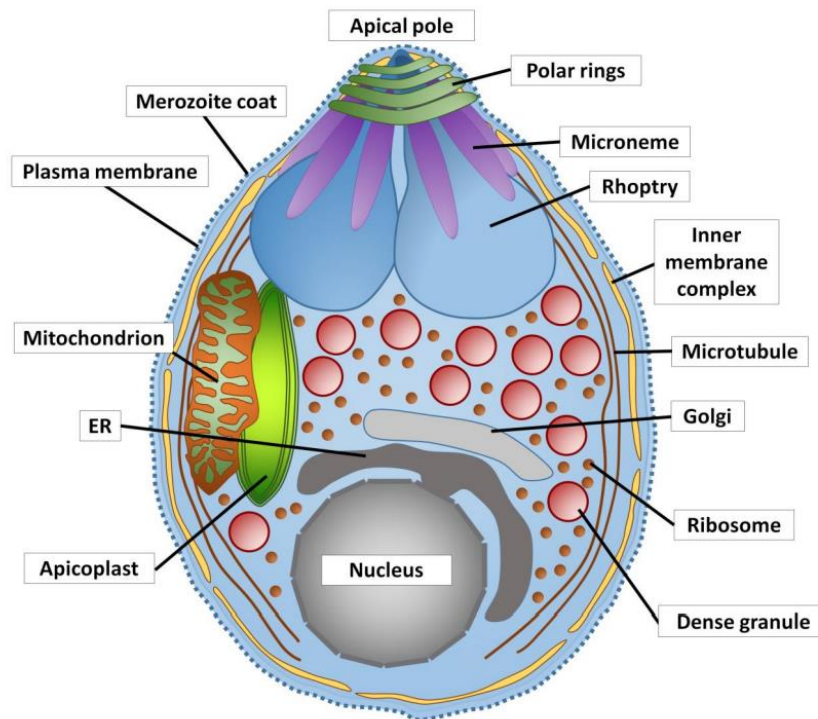
*P. falciparum* est un parasite intracellulaire obligatoire de l'homme qui cause le paludisme. Il est responsable d'une mortalité élevée et constitue ainsi un problème majeur de santé publique (Ali et al. 2021). Au cours de ma thèse, j'ai testé des inhibiteurs sur *T. gondii* et vérifié leur activité sur des stades érythrocytaires de *P. falciparum*.

### 1- Ultrastructure de *P. falciparum*

*P. falciparum* dispose des organites caractéristiques d'une cellule eucaryote. Il possède de surcroît, ceux propres aux *Apicomplexa* que sont les rhoptries, micronèmes et granules denses, formés de novo durant les derniers stades intracellulaires (Nishi et al. 2008), un complexe membranaire interne (Verhoef et al. 2021) et deux organites singuliers d'origine endosymbiotique (le

mitochondrion et l'apicoplaste) (Wilson et Williamson, 1997) qui y jouent le rôle que chez son homologue *T. gondii* (Figure 6).

La biogenèse des organites de *P. falciparum* est un processus complexe qui commence par être compris au fil des années (Hallée et al. 2018). Ce processus dynamique passe par différents stades du cycle de vie du parasite. Le stade invasif ou le mérozoïte est important du point de vue immunologique car il est brièvement extracellulaire et donc exposé aux anticorps de l'hôte entre le moment où il quitte un érythrocyte et entre dans le suivant (L. H. Bannister et al. 2000). Le complexe membranaire interne (IMC), des vésicules aplaties sous-jacentes à la membrane plasmique, le complexe apical et les organites sécrétoires séquentiellement libérés au cours du processus d'invasion définissent les structures du parasite à ce stade (Morrissette and Sibley 2002b). Les caractéristiques déterminantes de l'invasion des parasites mérozoïtes sont le complexe de la membrane interne et les organites sécrétoires apicaux (Hallée et al. 2018) et cela est similaire à *T. gondii*.



**Figure 6:** Ultrastructure d'un mérozoïte de *P. falciparum* (Flammersfeld et al. 2018)

## 2- Cycle biologique

Le cycle de vie de *P. falciparum* se déroule chez deux hôtes :

- L'hôte définitif: le moustique femelle hématophage du genre *Anopheles* au niveau duquel a lieu la reproduction sexuée;
- L'hôte intermédiaire: l'homme, qui héberge la reproduction asexuée du parasite.

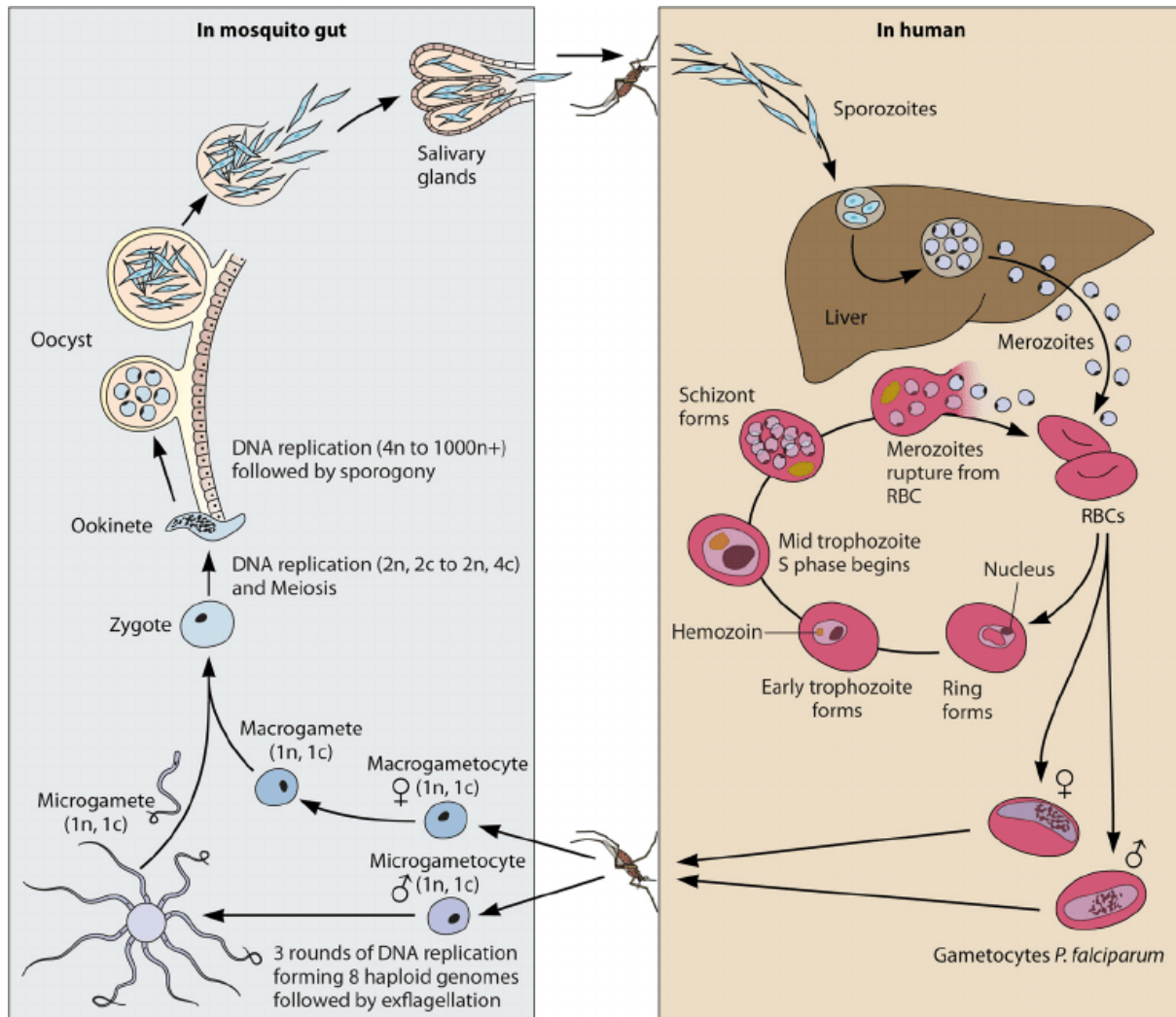
### 2.1- Chez l'hôte définitif

Il existe environ 25 espèces du genre *Anopheles* sur les 400 espèces connues qui sont de bons vecteurs du paludisme (Argy and Houzé 2018). La reproduction sexuée de *P. falciparum* chez le moustique femelle commence par l'ingestion d'un repas sanguin infecté (contenant des gamétocytes) chez les humains. Ces gamétocytes mâles et femelles murissent dans l'intestin du moustique sous l'influence de plusieurs facteurs environnementaux tels que la baisse de la température qui passe de 37°C à environ 5°C, l'augmentation du pH à environ 8 et l'exposition à l'acide xanthurénique (Bennink, Kiesow, and Pradel 2016). Suite à ces changements, des cascades de réactions biochimiques, produites, telles que l'activation de guanylyl cyclases et de kinases ainsi que l'activation de voies de transduction du signal dépendantes du calcium et de l'inositol triphosphate provoquent leur développement et leur sortie des globules rouges (Vlachou et al. 2006). Une protéine kinase dépendant du calcium, CDPK4, et une autre kinase activée par un mitogène, Pmap2, sont essentielles pour la régulation de l'exflagellation pour la libération d'un gamète femelle et la génération de huit gamètes mâles flagellés capables de se lier aux gamètes femelles pour la fécondation (Vlachou et al. 2006). Après la fusion des gamètes, le zygote se transforme en un ookinète mobile comportant des micronèmes, un complexe membranaire interne et des microtubules subpelliculaires, mais pas de rhoptries, et atteint la face basale de l'épithélium du moustique (Khan et al. 2005). Il commence à se transformer en oocyste en subissant une méiose sans cytokinèse, donnant ainsi lieu à un parasite multinucléé qui croît progressivement (Reininger et al. 2005). Le développement de l'oocyste se poursuit avec la division de son cytoplasme en plusieurs compartiments appelés sporoblastes dans lesquelles se réalise la sporogonie. En maturité, les sporozoïtes haploïdes bourgeonnent à partir des sporoblastes, se libèrent de l'oocyste, migrent dans l'hémocèle, où ils sont transportés par l'hémolymphe et infectent les glandes salivaires du moustique (Vlachou et al. 2006). A ce stade, une femelle moustique infectieuse est plus apte à piquer et augmente ainsi les chances des sporozoïtes à être transmis à un humain (Busula et al. 2017).

## **2.2- Chez l'hôte intermédiaire**

Lors de la prise d'un repas de sang chez un humain, le moustique infecté injecte également des sporozoïtes dans la peau de ce dernier. Ces sporozoïtes migrent du site d'inoculation dans la peau et franchissent plusieurs barrières cellulaires, y compris les fibroblastes dermiques, les cellules endothéliales, les cellules endothéliales sinusoidales du foie et les cellules de Kupffer avant d'atteindre leur destination finale: les hépatocytes (Loubens et al. 2021). Les processus impliqués dans la reconnaissance et pénétration de ces différentes cellules ne sont pas encore bien élucidés (Iyer et al. 2007). Dans le parenchyme hépatique, les sporozoïtes traversent plusieurs hépatocytes, parfois établissent à l'intérieur de quelques hépatocytes une vacuole transitoire, avant de passer à l'invasion d'un hépatocyte final avec formation de la vacuole parasitophore et différenciation dans un premier cycle de réplication asexuée (Govindasamy et al. 2016). L'hépatocyte ainsi infecté est débarrassée de certaines protéines sélectives pouvant entraîner l'apoptose (Vaughan and Kappe 2017). La motilité des sporozoïtes est régulée par la protéine kinase cyclique GMP-dépendante (PKG) et la protéine kinase 4 dépendante du calcium (CDPK4). L'invasion des hépatocytes est déclenchée par une cascade d'événements de signalisation initiés par l'interaction entre la protéine circumsporozoïte (CS) à la surface du sporozoïte et les protéoglycanes d'héparane sulfate fortement chargés négativement à la surface des hépatocytes (Coppi et al. 2007). Ces événements entraînent la régulation de la sécrétion de protéines par des organites spécialisés, la signalisation médiée par le calcium et le traitement des adhésines de surface chez les sporozoïtes. Le processus d'invasion est régulé par la protéine kinase 4 dépendante du calcium (CDPK4) et la protéine kinase cyclique GMP-dépendante (PKG) régule la formation et/ou à la libération du mérosome qui permet aux mérozoïtes formés de sortir de l'hépatocyte infecté (Govindasamy et al. 2016). Le mérosome migre dans les sinusoides et atteint les capillaires, où il libère les milliers de mérozoïtes qu'il contient dans la circulation sanguine. Les mérozoïtes envahissent les globules rouges (RBC), dans lesquels un deuxième cycle de réplication asexuée a lieu (Venugopal et al. 2020). Au cours de la rencontre, le mérozoïte et le RBC subissent une série ordonnée d'interactions adhésives, dont la plupart sont médiées par l'interaction des récepteurs des RBC avec des protéines parasites, ou des ligands d'invasion, ancrés à la surface de la membrane plasmique du mérozoïte. En effet, les protéines de surface du mérozoïte (MPS) sont attachées sous forme de protéines ancrées au glycoposphatidylinositol (GPI) lors de l'attachement initial (Beeson et al. 2016). Le mérozoïte se

réoriente ensuite, de sorte que son extrémité apicale entre en contact avec la surface du RBC. Simultanément, le parasite induit localement la déformation de l'érythrocyte (Iyer et al. 2007). Des interactions secondaires se produisent alors, médiant un attachement fort et irréversible au RBC. Elles se font entre les familles de protéines de l'antigène de liaison aux érythrocytes (EBA) et des protéines homologues de type réticulocytes (PfrH) du mérozoïte avec le RBC (Paul, Egan, and Duraisingh 2015). Une fois la réorientation effectuée, les protéines des micronèmes et rhoptries interviennent dans des interactions spécifiques entre le parasite et l'hôte (Iyer et al. 2007). En effet, l'antigène membranaire apical 1 (AMA1), une protéine intégrale liée à la membrane interagit avec les protéines RON2 (partie du complexe RON), qui sont sécrétés par les mérozoïtes et transloqués à la surface des globules rouges avant l'invasion, ce qui permet d'initier la jonction mobile (Richard et al. 2010). Suite à cela, l'invasion s'effectue rapidement avec l'évacuation du contenu en micronèmes, rhoptries et enfin granules denses (Iyer et al. 2007). Grâce au glidésome, le mérozoïte pénètre dans le RBC, formant un anneau circonférentiel autour du parasite qui délimite également la vacuole parasitophore naissante (Koch and Baum 2016; Paul, Egan, and Duraisingh 2015). L'anneau se développe pour donner un trophozoïte. A ce stade, le parasite comporte tous ses organites et modifie le RBC, en exportant des protéines et en récupérant des nutriments importants pour sa croissance et son développement (L. Bannister et Mitchell, 2003). Le parasite se développe ensuite en schizonte, et celui-ci se divise pour donner de nombreux mérozoïtes, lesquels, après rupture de la membrane érythrocytaire, vont pouvoir infecter d'autres érythrocytes (Baunaure and Langsley 2005) (Figure 7).



**Figure 7:** Cycle biologique de *P. falciparum* (Maier et al. 2019)

### 3- Paludisme

Le paludisme est une cause importante de morbidité et de mortalité et crée d'énormes difficultés socio-économiques. La maladie est confinée aux climats tropicaux et subtropicaux, en particulier en Afrique. Les espèces de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* (*wallerikeri et curtisi*), *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* sont les parasites responsables du paludisme. Mais la majorité des cas et presque tous les décès sont causés par *Plasmodium falciparum*. Les efforts actuels de lutte contre le paludisme se concentrent sur la réduction de la morbidité et de la mortalité attribuables. La chimioprophylaxie ciblée et l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide ont été couronnées de succès dans certaines zones

endémiques (Suh, Kain, and Keystone 2004). Mais force est de constater qu'il existe aujourd'hui un risque accru de cas de résistance antipaludique et de résistance aux insecticides dans les zones endémiques. Ce qui oblige à se tourner vers la recherche de nouvelles molécules antipaludiques et insecticides. D'autres approches de lutte contre le paludisme, y compris la manipulation génétique des moustiques et des vaccins contre le paludisme, sont des domaines de recherche en cours.

### **3.1- Traitement du paludisme**

Plusieurs médicaments antipaludiques sont utilisés dans la lutte contre *P. falciparum*. Ces drogues sont réparties en quatre familles suivant leurs structures chimiques et leurs modes d'action et sont répertoriées dans le tableau 1.

**Tableau 1:** Familles d'antipaludiques et mécanismes d'action

A partir des données de (Antony and Parija 2016), (Arrow, Panosian, and Gelband 2004; Müller and Hyde 2010; Tse, Korsik, and Todd 2019).

Familles des antipaludiques	Familles structurales chimiques	Noms des médicaments	Mécanismes d'action moléculaire
<b>Dérivés des quinoléines</b>	4-aminoquinolines	Chloroquine Amodiaquine Pipéraquine	S'accumulent dans la vacuole digestive, se lient à la molécule de $\beta$ -hématine et inhibent la voie de détoxification de l'hème
	Amino-alcools	Quinine, Mefloquine, Halofantrine, Luméfantrine,	
	8-aminoquinolines	Primaquine Tafénoquine	Inconnu
	Naphtoquinones	Atovaquone	Agit comme un complexe inhibiteur du cytochrome bc <sub>1</sub> en bloquant le transport mitochondrial des électrons au cours de la respiration cellulaire.
<b>Dérivés antifolates</b>	Pyriméthamine	Pyriméthamine	Inhibent la biosynthèse du folate en agissant comme des inhibiteurs compétitifs (cible l'activité de la dihydrofolate réductase (DHFR) et l'activité de la dihydroptéroate synthétase (DHPS))
	Proguanil	Proguanil	
	Sulfamides	Sulfamides Sulfadoxine Sulfone	
<b>Dérivés de l'artémisinine</b>	Endopéroxyde de lactone sesquiterpénique	Dihydroartémisinine Artésunate Artéméther	Activation de la molécule par l'hème suivie de la production des radicaux libres qui endommagent

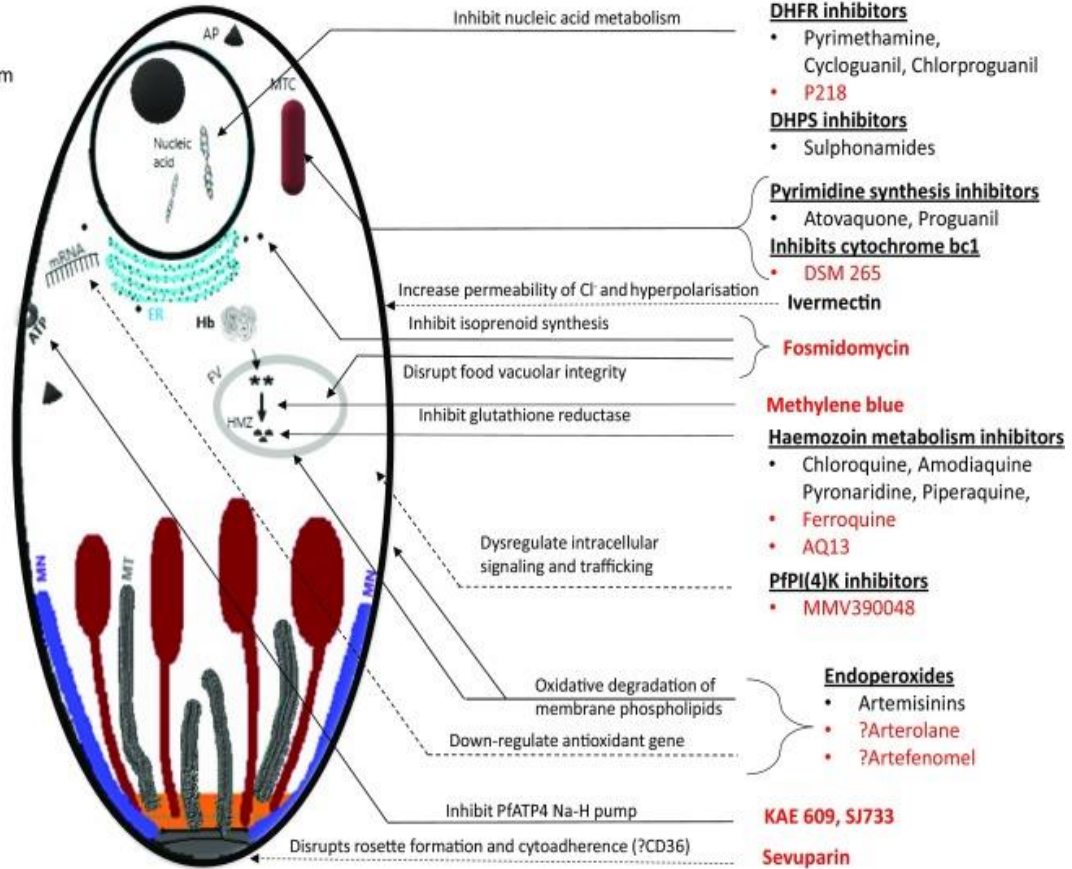


			les protéines parasites les protéines majeurs
<b>Antibiotiques</b>	Tétracycline et Lincisamide	Tétracycline Doxycycline Clindamycine	Inhibent les facteurs de la traduction et les voies de synthèse protéique

### **Progrès dans le développement de nouveaux médicaments antipaludiques**

L'émergence des résistances de *Plasmodium sp.* face aux médicaments actuellement disponibles conduit au développement de nouveaux médicaments antipaludiques et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces nouveaux médicaments doivent respecter des caractéristiques à savoir: (i) résoudre les problèmes de pharmacorésistance, (ii) avoir un délai d'action rapide, (iii) être sûr, en particulier chez les enfants et les femmes enceintes, et (iv) guérir le paludisme en une seule dose idéalement (Burrows et al. 2017). Outre cela, les protéines cibles antipaludiques actuellement étudiées sont entre autre les protéases, les protéines kinases, l'inhibiteur du transporteur de sucre *Plasmodium*, l'inhibiteur de l'aquaporine-3, l'inhibiteur du transport de la choline, l'inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase, l'inhibiteur de la biosynthèse des isoprénoides, l'inhibiteur de la farnésyltransférase et les enzymes impliqués dans le métabolisme des lipides et la réplication de l'ADN (Belete 2020). Il existe environ 13 nouveaux médicaments antipaludiques en développement clinique, dont neuf sont en phase 2 (Ashley and Phyto 2018). La figure 8 résume quelques médicaments utilisés et ceux en développement ainsi que leurs cibles thérapeutiques.

MTC=Mitochondrion  
 AP=Apicoplast  
 ER=Endoplasmic Reticulum  
 Hb=Haemoglobin  
 FV=Food Vacuole  
 HMZ=Haemozoin  
 MN=Micronemes  
 MT=Microtubules



**Figure 8:** Représentation schématique d'un trophozoïte montrant les sites d'action de nouveaux antipaludiques (Ashley and Phyo 2018)

Malgré les efforts et les moyens de lutte contre *Plasmodium*, la résistance aux médicaments apparaît à plusieurs reprises à la suite de l'utilisation généralisée et fréquente de médicaments antipaludiques et a contribué significativement à l'échec du contrôle et de l'éradication du paludisme dans le monde (Takala-Harrison and Laufer 2015).

### 3.2- Résistances aux antipaludiques

Plusieurs facteurs sont à la base de la résistance aux antipaludiques. La manière dont les médicaments sont utilisés ainsi que les conditions sociales et économiques dans lesquelles ils sont utilisés ont accéléré la résistance antipaludique (Packard 2014). Les processus impliqués dans la résistance sont: (i) la vitesse à laquelle des mutations de novo conférant une résistance apparaissent et sont sélectionnées par l'utilisation de médicaments chez un individu; et (ii) la propagation de ces allèles résistants à d'autres individus (Klein 2013). Les médicaments antipaludiques ciblent principalement les cycles répétés d'invasion et de réplication dans les érythrocytes de l'hôte afin de

réduire la charge parasitaire chez l'hôte et à supprimer la recrudescence (Miguel-Blanco et al. 2021). Mais, malheureusement aujourd'hui, des souches résistantes existent pour presque tous les médicaments disponibles (Tang et al. 2020). Et pour de nombreux médicaments, l'étendue de la résistance est incertaine et les mécanismes de résistance sont inconnus (Cui et al. 2015).

Des mécanismes de souches résistantes aux antipaludiques ont été relevés :

➤ **Résistance médiée par des mutations de transporteur**

L'émergence d'une souche résistante de *Plasmodium* à la chloroquine est due à la pression médicamenteuse. Cette résistance est causée par des mutations au sein du *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr*t) (Takala-Harrison and Laufer 2015). La mutation est entre la lysine en thréonine en position 76 (Antony and Parija 2016) et fait partie d'une série complexe de neuf substitutions d'acides aminés conférant ainsi le phénotype résistant à la chloroquine (Takala-Harrison and Laufer 2015). La présence de parasites résistants à la chloroquine est restée fixée à près de 100 % dans certains pays mais quelques années après le retrait dans d'autres pays, le retour spectaculaire de l'efficacité de la chloroquine est observé (Frosch et al. 2014; Takala-Harrison and Laufer 2015). Cela peut s'expliquer par la propagation d'un génotype sensible hautement adapté, tout comme la propagation de la résistance à la chloroquine ; une rétro mutation en position *Pfcr*t 76 pour restaurer la sensibilité à la chloroquine; ou la ré-expansion de divers parasites sensibles à la chloroquine qui ont survécu à une période de pression médicamenteuse à base de chloroquine et dont la fréquence a augmenté après le retrait du médicament (Takala-Harrison and Laufer 2015). La résistance à la quinine quant à elle, est due au polymorphisme SNP de plusieurs transporteurs tels que les polymorphismes chez *Pfcr*t, chez *P. falciparum* multidrug resistance-1 (*pfmdr*1), qui code pour l'homologue de la glycoprotéine P, chez *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein-1 (*Pfmr*p1) qui est un membre de la superfamille des transporteurs ABC. Les mutations de ces transporteurs entraînent une diminution de la sensibilité à la quinine (Cui et al. 2015).

➤ **Résistance aux antifoliques**

La pyriméthamine en association avec la sulfadoxine connaissent une résistance suite l'accumulation progressive de mutations dans les gènes codant pour les enzymes la dihydrofolate réductase (*Pfdhfr*) et la dihydroptéroate synthase (*Pfdhps*) (Cui et al. 2015), notamment aux codons 51, 59, 108 et 164 et aux codons 437, 540 et 581 respectivement. L'intensité de la résistance

conférée au parasite est corrélée à la fréquence des mutations dans ces gènes (Takala-Harrison and Laufer 2015). Aujourd'hui, l'utilisation de la sulfadoxine/pyriméthamine est en combinaison avec les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA) dans certains pays pour le traitement préventif chez les femmes enceintes bien qu'une résistance généralisée limite ces interventions (Cui et al. 2015).

#### ➤ **Résistance aux médicaments de la famille de l'artémisinine**

Malgré l'efficacité de l'artémisinine et ses dérivés avec des combinaisons à d'autres antipaludiques recommandés par l'OMS comme traitement de première ligne pour *P. falciparum* dans le monde, une résistance à l'artémisinine est signalée dans plusieurs pays et se manifeste par un retardement de l'élimination de la parasitémie après traitement. Cette résistance est liée à des mutations sur le domaine  $\beta$ -propeller de la protéine Kelch-13 de *P. falciparum* (Takala-Harrison and Laufer 2015). Cependant, une élimination rapide des parasites après traitement à l'artémisinine et ses dérivés a été observée en Afrique malgré des mutations de l'hélice K13 à de faibles niveaux dans les parasites (Cowell and Winzeler 2019). Cela suggère donc que toutes les mutations de l'hélice K13 ne sont pas associées à la résistance, que des loci secondaires sont impliqués dans la résistance ou que la résistance phénotypique est masquée par des niveaux élevés d'immunité antipaludique (Takala-Harrison and Laufer 2015). La protéine est essentielle au développement intra-érythrocytaire du parasite. Elle est localisée dans les cytoplastes à la périphérie du parasite ainsi que dans les vésicules intracellulaires qui s'associent à l'endocytose ou au trafic vésiculaire d'antigènes, y compris le transport de protéines médié par PfEMP1 (Wicht, Mok, and Fidock 2020). Par ailleurs, la protéine K13 modifie le cycle cellulaire en conférant une période prolongée de développement du stade anneau à trophozoïte, ce qui pourrait également expliquer l'activation réduite du médicament médiée par Fe (II) PPIX (Cowell and Winzeler 2019; Wicht, Mok, and Fidock 2020).

#### **II- Trafic intracellulaire des protéines des organites sécrétoires apicaux chez *T. gondii***

L'organisation générale du système endomembranaire chez les eucaryotes a connu des changements spécifiques aux phylums se traduisant par la perte ou l'expansion de facteurs de trafic (Schlacht et al. 2014 ; Woo et al. 2015) (Elias et Klimes, 2012), ce qui a conduit à des adaptations uniques. Ces adaptations englobent aussi bien la perte que le développement d'organites exclusifs qui ne sont retrouvés que dans certains phylums (Jimenez-Ruiz et al. 2016). C'est le cas des rhoptries et des micronèmes chez les parasites *Apicomplexa*.

La machinerie moléculaire permettant la régulation du transport vésiculaire chez ces parasites est partiellement conservée. Des éléments impliqués dans le bourgeonnement, le transport et la fusion des vésicules ont été mis en évidence, notamment le NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor) (Chaturvedi et al. 1999), un ensemble réduit de protéines Rab (Kremer et al. 2013), les SNAREs (N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor proteins) (Jackson et al. 2013), les sous-unités du coatomer (Pflugger et al. 2005), les complexes adaptateurs de clathrine (Ngô et al. 2003) et les Vps (Vacuolar Protein Sorting) (Tomavo et al. 2013 a ; Tomavo et al 2014b ; Morlon-Guyot et al. 2015 ; Sangaré et al. 2016) (Venugopal et Marion 2018).

Les micronèmes libèrent une variété de protéines impliquées dans divers processus biologiques tels que: l'échappement de la vacuole parasitophore, l'adhésion, la motilité, la sécrétion des rhoptries et l'invasion de la cellule hôte (Dubois et Soldati-Favre 2019). Dans ce large éventail de protéines, les adhésines qui représentent la classe dominante et peuvent être classées en fonction de leurs domaines adhésifs répétés. Ces domaines assurent la liaison à divers antigènes de surface des cellules hôtes comprenant des protéines et des hydrates de carbone, tels que le collagène et l'acide sialique (Tomley et Soldati 2001). Ce type de protéines joue un rôle crucial dans l'attachement à la cellule hôte, la motilité et l'invasion. Chez *T. gondii* où elles sont appelées MICs, les protéines de micronèmes forment souvent des complexes constituant des unités fonctionnelles (M.-H. Huynh 2003; My-Hang Huynh et Carruthers 2006). MIC2 et M2AP (MIC2 Associated Protein) par exemple sont libérées sous forme de complexes à la surface parasitaire et contribuent à l'attachement et à la motilité par glissement (My-Hang Huynh et Carruthers 2006), donc sont essentielles à la virulence. L'assemblage de ces complexes dans les premiers compartiments de la voie sécrétoire, pendant le trafic permet le bon adressage de certaines sous-unités solubles (Harper et al. 2006 ; Reiss et al. 2001). Au moment de l'exocytose des protéines de micronèmes, les complexes d'adhésine sont largués à la surface parasitaire et s'amarrent à la membrane par le biais des protéines transmembranaires de ces complexes. L'interaction de la partie C-terminale avec le moteur actine-myosine permet la translocation vers l'arrière des complexes. Cette translocation provoque un mouvement vers l'avant favorable à la motilité par glissement et à l'invasion car elle permet au parasite de se propulser à l'intérieur de la cellule hôte par invagination de la membrane plasmique (Frénal et Soldati-Favre 2013). Par ailleurs, la libération de certaines protéines de rhoptries dépend de protéines de micronèmes telles que TgMIC8, Erythrocyte binding antigen-175 (PfEBA175). Cependant, les mécanismes biologiques qui en sont la cause aussi bien chez *T. gondii*

que chez *P. falciparum* restent inconnus (Kessler et al. 2008 ; Singh et al. 2010). Le complexe MIC3/MIC8 par exemple est indispensable à la sécrétion des rhoptries en contribuant à la formation de la jonction mobile lors de l'entrée du parasite (Kessler et al. 2008). L'assemblage de la protéine AMA1 (Apical Membrane Antigen 1), très conservée chez les *Apicomplexa* avec un complexe de protéines RONs est nécessaire pour former la jonction mobile. Le complexe formé rapproche le parasite de la membrane plasmique, créant ainsi un site propice pour son entrée dans la cellule hôte (Bargieri et al. 2013 ; Lamarque et al. 2014 ; Mital et al. 2005). Les micronèmes secrètent des protéases notamment des protéases à sérine (subtilisines) et des protéases rhomboïdes (sécrétion constitutive) qui agissent sur les adhésines. Les adhésines après avoir accompli leur fonction, sont alors clivées par ces protéases afin de libérer les récepteurs de la cellule hôte et de permettre la progression de l'invasion (Zhou et al. 2004; Baker, Wijetilaka, and Urban 2006; Dowse and Soldati 2004; Lagal et al. 2010; Shen et al. 2014). Les protéines de micronèmes de type perforine établissent des complexes qui portent atteinte à l'intégrité de la membrane de la vacuole parasitophore et de la cellule hôte afin de permettre la sortie des parasites. Ces protéines clés sont la plupart du temps conservées parmi les micronèmes et les organites de type micronème (Deligianni et al. 2013 ; Kafsack et al. 2009 ; Kafsack and Carruthers 2010).

Les différences dans les modes sécrétoires et les fonctions des protéines MICs sont liées à l'emprunt de voies de trafic différentes lors de leur biogenèse *de novo*. TgRab5A et TgRab5C sont des régulateurs clés de seulement un sous-ensemble de protéines MICs (Kremer et al. 2013). En absence de Rab5A, MIC3, MIC8 et MIC11 sont ré-acheminés dans la voie constitutive et libérés dans l'espace vacuolaire. Par contre, MIC2, AMA1 et M2AP sont dirigés vers les micronèmes. La détection de MIC2 et MIC3 dans deux sous-populations de micronèmes distinctes conforte l'idée que toutes les protéines de micronèmes ne forment pas un conglomérat mais proviennent de deux sous-populations à savoir les micronèmes proximales localisées tout du long de l'apex et les micronèmes distales qui sont plus proches du conoïde. Dès lors, ces dernières observations suggèrent des sécrétions différentes et également des fonctions différentes pour ces deux sous-populations de micronèmes (Kremer et al. 2013).

Dettmer et al., ont montré que selon le pH, la protéase vacuolaire, analogue à la Cathepsine L de *T. gondii* (TgCPL) localisée dans le compartiment VAC est requise pour la maturation des précurseurs des protéines de micronèmes proTgMIC3 et proTgM2AP (Dettmer et al. 2006). Les micronèmes

seraient générés à partir du système endocytique et du VAC, lieu de traitement des protéines MICs (Parussini et al. 2010). Les complexes d'attache HOPS (Homotypic fusion and vacuole protein sorting) et CORVET (Class C core vacuole / endosome tethering) retrouvés chez la levure et les mammifères sont partiellement retrouvés chez *T. gondii* (Jimenez-Ruiz et al. 2016 ; Morlon-Guyot et al. 2015).

Les complexes protéiques HOPS et CORVET sont tous les deux construits autour d'un noyau de quatre sous-unités, le noyau Vps C constitué de quatre sous-unités : Vps11, Vps16, Vps18 et Vps33. Deux sous-unités supplémentaires spécifiques à chacun des complexes sont rajoutées (Ostrowicz et al. 2010 ; Solinger and Spang 2013). HOPS renferme les sous-unités supplémentaires Vps39 et Vps41, interagit avec Rab7/Ypt7-GTP et contrôle le trafic des endosomes tardifs vers la vacuole lysosomale (Balderhaar and Ungermann 2013). Chez CORVET, les sous-unités supplémentaires Vps3 et Vps8 sont rajoutées au noyau et le complexe intervient au niveau des endosomes; il régule le trafic dans les endosomes tardifs et interagit avec Rab5/Vps21-GTP (Balderhaar and Ungermann 2013). Le knock-down conditionnel de TgVps11, protéine centrale et indispensable pour l'assemblage des deux complexes délocalise TgRab7 et empêche la biogenèse des granules denses, des rhoptries et des micronèmes (Morlon-Guyot et al. 2015).

Les complexes formés par les protéines de micronèmes pour leur transport contiennent en général une protéine transmembranaire associée à une ou plusieurs protéines solubles (Gaji, Flammer, and Carruthers 2011). Ainsi, la protéine transmembranaire MIC6 sert d'escorte pour les adhésines solubles MIC1 et MIC4 qu'elle fixe par le biais d'un domaine caractéristique de type EGF (Epidermal Growth Factor) présent dans sa partie N-terminale (Reiss et al. 2001). En outre, il a été prouvé que MIC8 assure le transport de MIC3 vers les micronèmes (Meissner et al. 2002). Synthétisées sous forme immature, les protéines MIC subissent diverses transformations aussi bien pendant le transport dans la voie sécrétoire qu'après la libération. Ces transformations mettent en jeu des protéases distinctes. MIC2 fournit au complexe qu'elle forme avec M2AP un signal d'adressage (motif à base de tyrosine) pour naviguer à travers les organites sécrétoires précoces, y compris le RE et l'appareil de Golgi (Di Cristina et al., 2000 ; Huynh et al., 2003). Le propeptide de M2AP à son tour conduit alors le complexe à travers les endosomes précoces et tardifs pour finalement atteindre les micronèmes (Harper et al., 2006). Privée de propeptide, le trajet de M2AP s'arrête aux endosomes tardifs (El Hajj et al., 2008). De plus, un mutant de TgM2AP résistant à la

maturation a montré une capacité à s'associer de manière stable avec TgMIC2 ; ce qui a conduit à une sécrétion inefficace des deux protéines et une baisse du pouvoir invasif du parasite (Harper et al., 2006). Toutes les protéines des complexes possèdent alors des signaux de tri distincts mais complémentaires qui permettent aux complexes de naviguer à travers la voie sécrétoire. En ce qui concerne les mutants du pro-peptide de MIC3, ils sont détournés vers la vacuole parasitophore (El Hajj et al., 2008). Les signaux de trafic du pro-peptide de MIC5 semblent être employés plus tôt dans le système sécrétoire par rapport au pro-peptide de M2AP car les mutants défectueux sont détournés avant d'atteindre les endosomes tardifs (Gaji et al., 2011). Il en ressort que les pro-peptides interviennent à différents sites du système sécrétoire mais agissent en synergie pour permettre le trafic intracellulaire des protéines MICs.

Le knock-out conditionnel de la sous-unité  $\mu$  du complexe TgAP1 (adaptor protein 1) perturbe l'adressage des protéines de micronèmes. MIC3 est libérée dans l'espace vacuolaire, MIC8 est retenue dans le TGN et faiblement dans la membrane plasmique. MIC2 et M2AP s'accumulent dans une sous-population apicale de micronèmes mais pas dans le TGN ni dans l'espace vacuolaire. Il en est de même que MIC6 et AMA1. Les observations semblent indiquer que TgAP1 n'est pas indispensable pour la sortie de MIC2 et M2AP du TGN mais il pourrait être requis pour la stabilisation des complexes MIC3/MIC8 et MIC1/MIC4/MIC6 dans le TGN avant qu'ils soient exportés (Venugopal et al., 2017).

Les dynamines sont de grandes GTPases qui interviennent dans divers processus cellulaires tels que le bourgeonnement des vésicules de transport, la division des organites, la cytokinèse et la résistance aux agents pathogènes. Les Drps (Dynamain-related proteins) jouent des rôles divers tels que la division des organites et le trafic vésiculaire (Praefcke et McMahon 2004). DrpB est localisée près du Golgi et des compartiments associés aux endosomes et joue un rôle primordial dans le trafic des protéines, aussi bien de rhoptries que de micronèmes chez *T. gondii*. Son ablation conditionnelle empêche la biogenèse des deux organites sécrétoires apicaux et bien que les mutants soient toujours capables de réplication, la sortie, la motilité par glissement et l'invasion leur sont impossibles (Breinich et al. 2009).

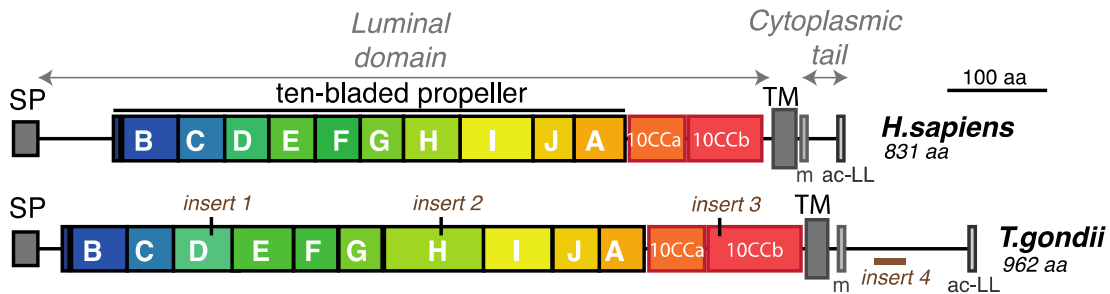
Des études antérieures de notre équipe ont révélé l'existence du récepteur TgSORT, agissant au cœur du trafic protéique. TgSORT est une protéine transmembranaire de 105 kDa localisée dans le post-Golgi/ELC et elle est aussi une homologue de la sortiline humaine. A l'image cet homologue, TgSORT possède un large domaine luminal constitué de 10 domaines  $\beta$ -propellers suivis de deux



domaines 10CC et d'une courte queue cytoplasmique (Figure 9). Le mutant knock-out inducible à l'AnhydroTétracycline (ATc) du récepteur a montré une délocalisation des protéines de micronèmes notamment MIC2, MIC3, MIC4 et M2AP ainsi que des protéines de rhoptries ROP1, ROP2, ROP4, ROP7 et RON1. Par contre aucun effet n'a été observé sur les protéines de granules denses. La microscopie électronique a également révélé l'absence de ces organites clés chez ce mutant. Cette absence occasionnée par l'ablation conditionnelle de *TgSORT* a des répercussions importantes sur le pouvoir infectieux du parasite car la motilité, l'entrée et la sortie de la cellule hôte sont rendues impossibles. Les souris infectées par le mutant et traitées à l'ATc survivent contrairement à celles infectées par le type sauvage. Des expériences de co-immunoprécipitation réalisées, il est ressorti que c'est le domaine N-terminal du récepteur se lie aux protéines des micronèmes et des rhoptries. En ce qui concerne la queue cytoplasmique, elle recrute des protéines de cargaison qui médient le trafic antérograde et rétrograde du Golgi-Endosome notamment les adaptines AP $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\mu$ 1, la clathrine, Sec 23/24 et 3 protéines de tri vésiculaire Vps9, Vps26 et Vps35 (Sloves et al. 2012). Ce rôle essentiel de cargo que joue *TgSORT* pour le transport des protéines des micronèmes et des rhoptries afin de permettre leur biogenèse fait du récepteur un déterminant de la survie chez *T. gondii*. De plus, le retromer Vps35-Vps29-Vps26 participe à cette fonction en assurant le retour de *TgSORT* au Golgi pour un autre cycle de tri, rôle crucial pour la biogenèse des organites sécrétoires et le maintien de la morphologie des parasites (Sangaré et al. 2016 ; McGovern and Carruthers 2016). *TgSORT* est également essentielle de manière indirecte à la réponse immune de l'hôte contre l'infection car l'absence du récepteur fait produire au parasite des protéines ROP et MIC immatures, donc mal structurées en plus d'une sécrétion anormale, ce qui a des conséquences importantes pour la reconnaissance par le système immunitaire (Sloves et al. 2015). En conséquence, l'absence de sécrétion des protéines des rhoptries entraîne un affaiblissement des réponses immunitaires innées se manifestant par la baisse de sécrétion des cellules NK-IFN- $\gamma$ , des réponses humorales médiées par les cellules T-helper 1 et 2 (baisse des IgG1 et IgG2 $\alpha$ ), des cytokines (IFN- $\gamma$  et IL-10) et de la réponse immunitaire à médiation cellulaire des lymphocytes T CD8/CD4-IFN- $\gamma$  (Sloves et al. 2015).

Dans les cellules eucaryotes, les protéines contenant le domaine Vps9 sont des facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF) qui permettent liaison à Rab5 par le GTP (Guanosine TriPhosphate) et son activation en stimulant la libération du GDP monomère qui lui était lié. Rab5 à son tour intervient dans la régulation du trafic des vésicules endosomiques. *TgVps9* remplit la même

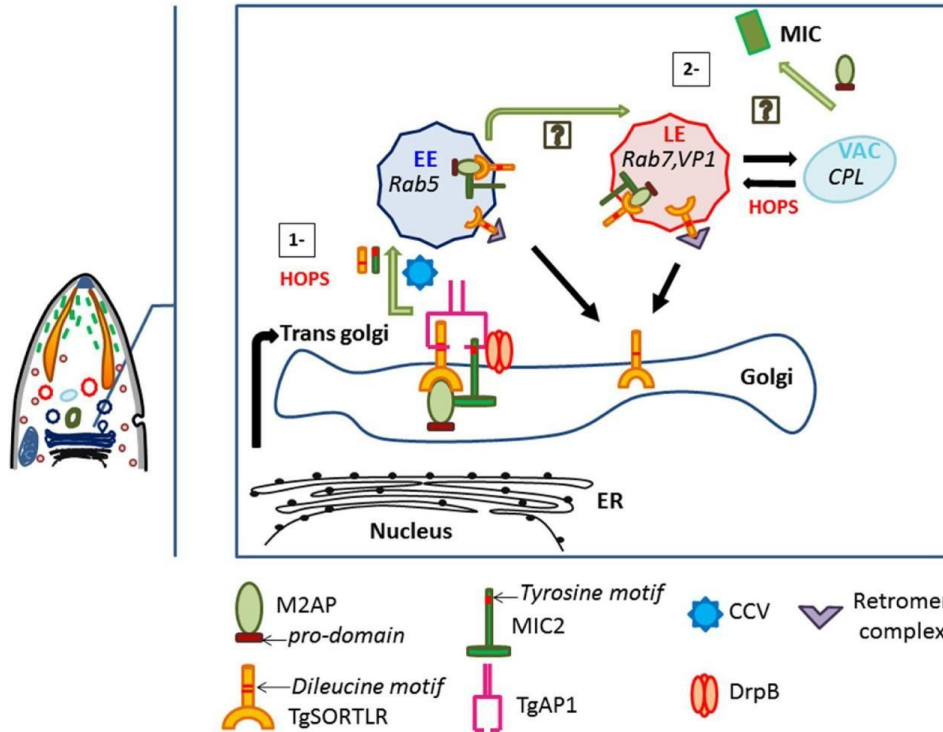
fonction, ce qui est crucial pour la maturation des protéines des rhoptries. Son absence réduit le nombre et la taille des rhoptries, entrave la biogenèse des micronèmes périphériques et la sécrétion des granules denses, ce qui affecte l'invasion des cellules hôtes (Sakura et al. 2016).



**Figure 9:** Représentation schématique de la sortiline humaine et de *TgSORT* (Sloves et al. 2012)

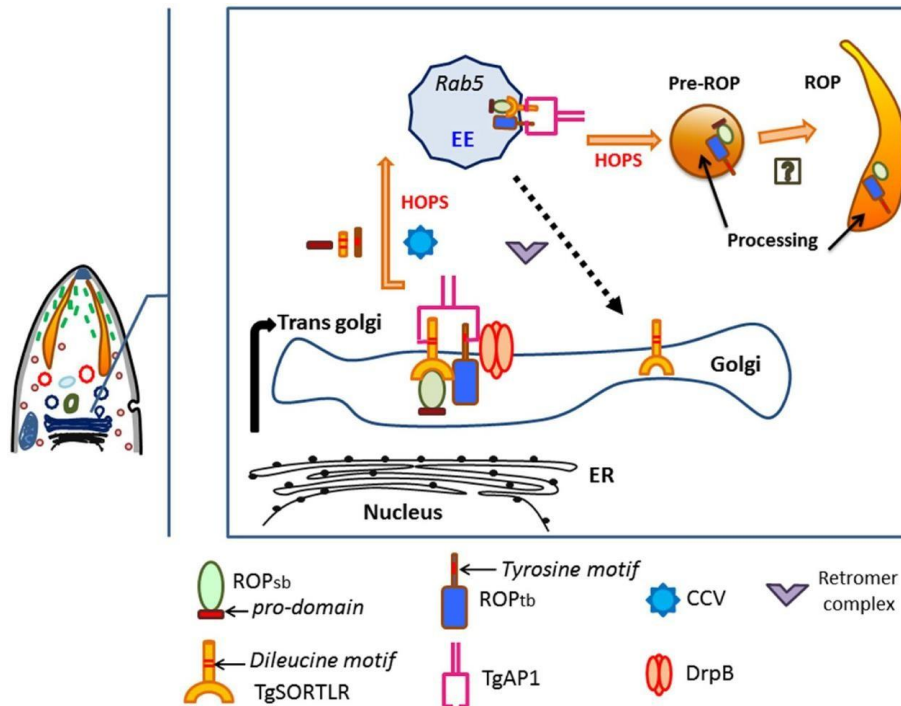
Chez *P. falciparum*, le knock-down de *PfSortilin* empêche la formation du complexe membranaire interne et bloque la formation de nouveaux mérozoïtes. Des perturbations sont dans un premier temps observées dans le trafic des protéines vers les rhoptries, les micronèmes et granules denses conduisant à l'accumulation de ces protéines dans le réticulum endoplasmique et la vacuole parasitophore (Hallée et al. 2018). Plus spécifiquement, il a été démontré que *PfSortilin* réside dans le cis-Golgi et sert d'escorte au complexe RAMA-RAP (Rhoptry-Associated Membrane Antigen-Rhoptry-Associated Protein) du Golgi aux rhoptries (Hallée et al., 2018).

Le rôle de la sortiline n'a pas été étudié chez les autres parasites *Apicomplexa* mais Sloves et al., 2012 reportent la présence de larges insertions de tailles variables le long de la protéine chez les parasites de ce phylum. Chez *T. gondii*, trois de ces insertions sont présentes sur le domaine luminal et une quatrième est retrouvée sur la région C-terminale.



**Figure 10:** Trafic intracellulaire vers les micronèmes (Venugopal et Marion 2018)

Les mécanismes impliqués dans le tri des protéines ROP sont très similaires à ceux décrits pour les protéines MICs. L'adressage des protéines vers les rhoptries nécessite un motif de tri tyrosine dépendant conservé au cours de l'évolution et qui interagit avec AP1. Deux membres de la famille ROP2, ROP2 et ROP4, contiennent respectivement un motif dileucine (LL) et un signal de tri basé sur la tyrosine (motif YXXΦ). Ces signaux sont reconnus par les complexes adaptines pour faciliter le tri (Hoppe et al., 2000 ; Ngo et al., 2003). La mutation de l'un ou l'autre de ces signaux empêche la livraison des protéines aux rhoptries matures, ce qui provoque leur accumulation dans de grandes vésicules semblables à des corps multivésiculaires (MVB), qui colocalisent avec le marqueur endosomal vacuolar protein sorting 4 (VPS4) (Ngo et al., 2003). En outre, l'activité de TgRab5A et TgRab5C régule la biogenèse des rhoptries, et la surexpression des formes dominant négatif empêche la formation de ces organites et les protéines ROPs sont larguées dans l'espace vacuolaire (Kremer et al., 2013). Par opposition, un mutant dominant-négatif de TgRab7 n'empêche pas la biogenèse des rhoptries, suggérant que la maturation et le trafic des protéines de rhoptries ne mettent pas en jeu le compartiment endosomal tardif. Il en ressort que l'adressage des protéines vers les rhoptries a lieu via la voie endocytique, plus précisément par les endosomes précoces, et est probablement régulé par l'activité de l'adaptine.



**Figure 11:** Trafic intracellulaire vers les rhotries (Venugopal and Marion 2018)

### III- Famille des récepteurs à domaine Vps10p-D chez les mammifères

#### A- Origine et description

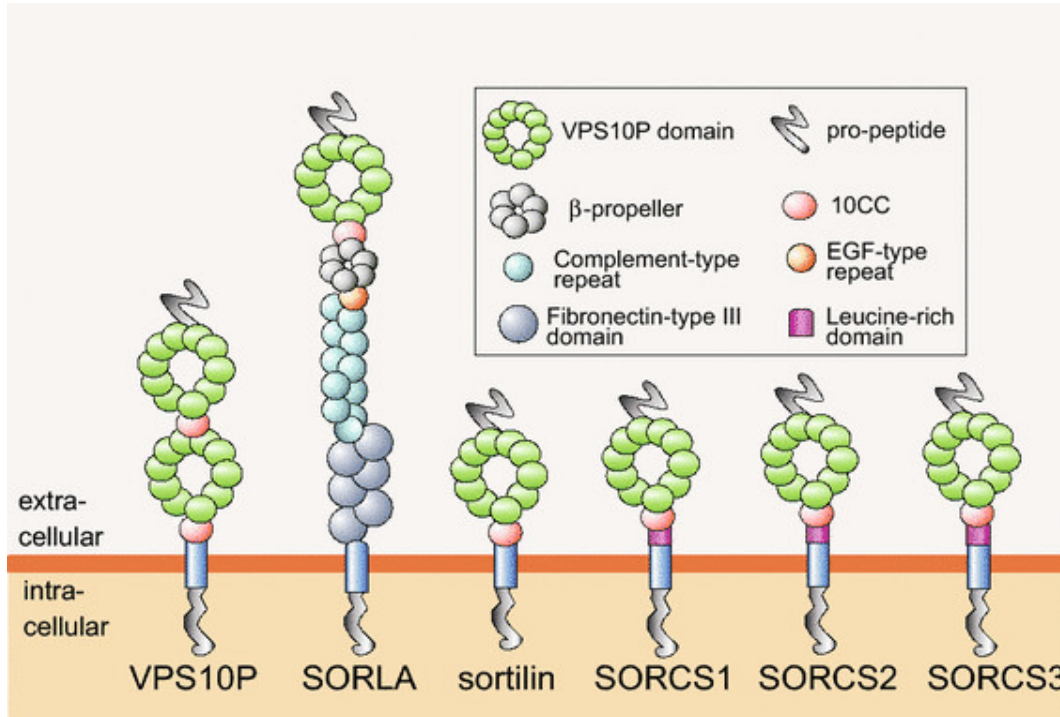
Les récepteurs à domaine Vps10p-D désignent des protéines transmembranaires de type I ayant comme attribut la présence d'un domaine N-terminal Vps10p-D. Ils doivent ce nom à leur similitude avec la protéine de tri Vps10p (Vacuolar protein sorting defective) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hermey 2009).

Au cours du trafic cellulaire, les protéines hydrolytiques néosynthétisées parcourent les premières étapes de la voie de sécrétion au même moment que les autres protéines produites. Dans la majorité des types cellulaires de mammifères, ces protéines lysosomales possèdent un signal de tri constitué de résidus de mannose-6-phosphate (M6P) reliés à leurs chaînes latérales glucidiques. Arrivées au trans-Golgi, elles sont sélectionnées pour être transportées vers les lysosomes. Elles sont alors reconnues par les récepteurs transmembranaires de mannose-6-phosphate et les complexes formés sont emballés dans les vésicules recouvertes de clathrine qui les acheminent vers les endosomes acides, compartiment pré-lysosomal acide. La liaison avec les récepteurs est alors rompue, les hydrolases continuent le chemin vers les lysosomes et les récepteurs du M6P sont recyclés vers le réseau trans golgien pour un autre cycle de tri (Marcusson et al. 1994) . En dehors de cette voie

sécrétoire, une voie indépendante du mannose-6-phosphate a été décrite car chez les patients atteints de mucopolysaccharidose II, les protéines lysosomales solubles sont bien adressées malgré l'absence de la phosphotransférase qui s'ajoute normalement au signal de tri du M6P (Braulke et Bonifacio, 2008). Chez *S. cerevisiae*, la vacuole est l'analogue des lysosomes et Vps10p, l'équivalent des récepteurs aux M6P transporte le précurseur des hydrolases vacuolaires (exemple de la carboxypeptidase Y) du trans-Golgi vers les compartiments pré-vacuolaires via les endosomes. Vps10p est ensuite recyclé vers le réseau trans golgien (Marcusson et al. 1994 ; Cooper et Stevens, 1996 ; Deloche et al. 2001).

Vps10p est un récepteur transmembranaire de type I présentant une longue partie lumineuse N-terminale et une courte queue C-terminale. La partie lumineuse est constituée de deux régions homologues se terminant chacune par un motif 10 CC (motif de 10 résidus de cystéine) (Marcusson et al. 1994) soit deux domaines Vps10p-D.

Chez les mammifères, cette famille regroupe 5 membres: Sortilin, SorCS1, SorCS2, SorCS3 et SorLA (Hermey et al. 1999; Jacobsen et al. 1996; Kikuno 1999; Petersen et al. 1997; Rezgaoui et al. 2001). En dehors de la sortiline dont la partie N-terminale est constituée exclusivement du domaine Vps10p-D, les autres membres possèdent des domaines additionnels (Hermey 2009), ce qui leur confère des fonctions différentes (Figure 12).



**Figure 12:** Représentation schématique de Vps10p et des membres de la famille des récepteurs à domaine Vps10p-D

### B- Localisation

Les récepteurs Vps10p-D ont été largement étudiés chez l'homme et la souris. Ces récepteurs sont tous fortement exprimés dans le système nerveux chez l'adulte mais on les retrouve également dans d'autres tissus et organes (Hermey et al. 1999; Jacobsen et al. 1996; Petersen et al. 1997; Yamazaki et al. 1996; Hermey et al. 2004; Riedel, Hermans-Borgmeyer, and Hübner 2002 ; Sarret et al. 2003; Rezgaoui et al. 2001). La sortiline est également très abondante dans le poumon de l'embryon et SorLA, en plus d'être très présente dans le poumon et le rein embryonnaires est aussi retrouvée dans un grand nombre de glandes en développement tel que la glande thyroïde. En dehors du système nerveux chez l'adulte, SorLA abonde dans le foie, les testicules et les reins, et Sortilin dans les testicules et les muscles squelettiques. SorCS1 est retrouvée dans le foie, les reins et le cœur de l'adulte, SorCS2 dans le poumon et le testicule de l'adulte. SorCS3 est faiblement exprimée dans les tissus en développement et adultes autres que le système nerveux. SorCS1, SorCS2 et SorCS3 sont exprimées de manière prédominante dans le cerveau et un schéma d'expression complémentaire est souvent observé. Par ailleurs, SorCS1 est parfois co-exprimée avec l'un des deux autres récepteurs. SorCS1 et SorCS3 sont exprimées dans l'hippocampe suite à l'activité

neuronale. Contrairement à SorCS3, l'induction de la transcription de SorCS1 requiert une synthèse protéique (Hermey et al. 2004).

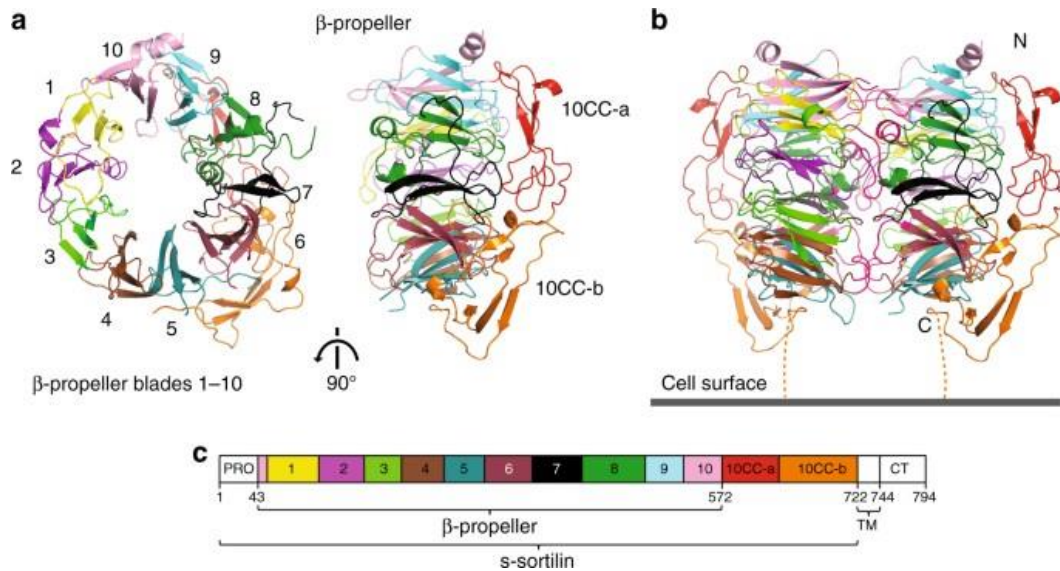
### **C- Structure et Fonction**

Également appelée neurotensin receptor-3 (NTS3), Sortilin est considéré comme l'archétype des membres de la famille des récepteurs à domaine Vps10p-D car sa partie luminale est composée d'un domaine Vps10 unique, sans domaines additionnels et lie les facteurs neurotrophiques et les neuropeptides. La partie luminale de Sortilin contient un propeptide N-terminal et un segment C-terminal de dix cystéines conservées (10CC) qui jouent des rôles clés dans la fonction du récepteur. Le propeptide empêche la liaison prématurée de ligands et facilite le transport du récepteur dans les premiers compartiments de Golgi. Le segment de 10CC est une région de liaison aux ligands (Westergaard et al. 2004a). Sortilin mature se lie à divers partenaires notamment son propre propeptide (Munck Petersen et al. 1999), la neurotensine (Mazella et al. 1998), les proformes du nerve growth factor- $\beta$  (NGF) (Nykjaer et al. 2004), le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Teng et al. 2005), la lipoprotéine lipase (LpL) (Nielsen et al. 1999), l'apolipoprotéine AV14 et le receptor-associated protein (RAP) (Petersen et al. 1997). La liaison de ces différents ligands est compétitive. Elle est inhibée par celles du propeptide et du tridécapeptide de la neurotensine (Westergaard et al. 2004a).

Sortilin intervient dans l'endocytose, le tri intracellulaire (Teng et al. 2005 ; Maeda et al. 2002 ; Nielsen et al. 2001 *Embo J*) et la signalisation en déclenchant l'apoptose neuronale par formation d'un complexe trimérique avec les proneutrophines et le récepteur neurotrophique p75 (p75NTR) (Rezgaoui et al. 2001 ; Teng et al. 2005 ; Hermey et al. 2004 ; Jansen et al. 2007).

Vps10p-D est composé de trois domaines structuraux : un large domaine N-terminal (résidus 45-576) constitué de 10 domaines  $\beta$ -propellers, suivi de deux petits modules 10CC (10CC-a et 10CC-b allant des résidus 577 à 633 et 634 à 716 respectivement). Les  $\beta$ -propellers sont organisés en une forme ovale formant au centre un tunnel légèrement conique qui se rétrécit vers la face d'interaction avec le module 10CC. Des glycosylations se trouvent à l'extrémité du brin un de la lame 7 (Asn373) et sur la face d'interaction avec le 10 CC de l'hélice (Asn579). Le tunnel sert de site pour la liaison de divers ligands. La résolution de la structure de Sortilin a révélé que la partie C-terminale de la neurotensine se lie dans le tunnel formé par les 10 domaines  $\beta$ -propellers sur le brin 1 du sixième domaine  $\beta$ -propeller (Quistgaard et al. 2009a). Par ailleurs, des études ont montré que ce domaine

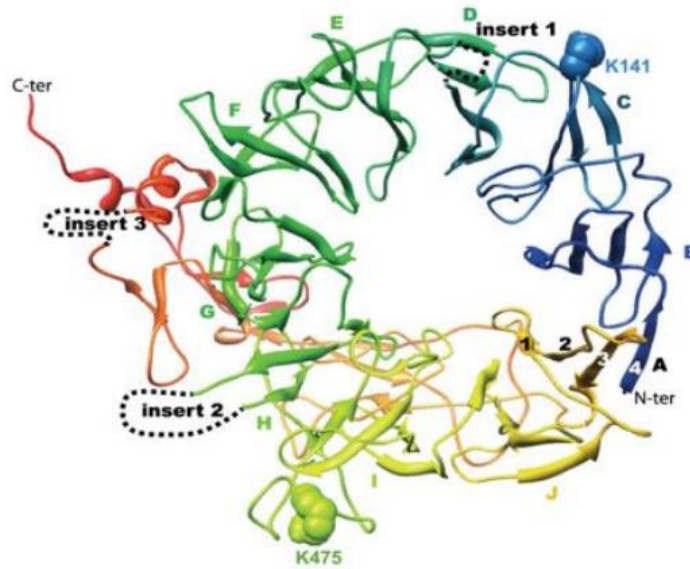
subit un changement de conformation et se dimérise à pH acide; ce qui protège la large interface et rapproche les domaines C-terminaux. Cependant, certains ligands comme les (pro) neurotrophines et la neurotensine se lient préférentiellement au monomère. La dimérisation et le changement de conformation pourraient donc permettre la décharge des ligands de Sortilin et le recyclage du récepteur pour un autre cycle de tri protéique (Leloup et al. 2017).



**Figure 13:** Structure de l'ectodomaine de Sortilin montrant une dimérisation à pH acide (Leloup et al. 2017)

En 2012, Sloves et al., ont également prédit la structure 3D de TgSORT montrant la grande similitude avec Sortilin, mais avec comme différence la présence des insertions (Figure 14).





**Figure 14:** Structure 3D prédictive du domaine luminal de *TgSORT* (Sloves *et al.* 2012)

Tandis que Sortilin agit comme un récepteur multifonctionnel qui lie une variété de ligands absents chez *T. gondii*, les expériences de cross linking et de co-immunoprécipitation suivies de l'analyse des échantillons par spectrométrie de masse ont révélé que *TgSORT* fixe spécifiquement les protéines des micronèmes et des rhoptries. En outre, le cross-linking a montré une modification des lysines K141 et K475 de *TgSORT* et de la lysine K235 de ROP5 traduisant une étroite proximité entre *TgSORT* et ROP5.

Ma thèse de doctorat est basée sur la compréhension du mécanisme d'interaction entre *TgSORT* et ses ligands.

## PROBLEMATIQUE

Les *Apicomplexa* constituent un phylum de plus de 5000 espèces de parasites protozoaires responsables de graves pathologies d'importance aussi bien médicale que vétérinaire. *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum*, les agents pathogènes de la toxoplasmose et du paludisme respectivement figurent parmi les espèces les plus connues. La toxoplasmose et le paludisme provoquent des atteintes sévères pouvant être mortelles chez l'homme.

Intracellulaires obligatoires, l'entrée dans une cellule hôte est déterminante pour la multiplication et la survie des parasites *Apicomplexa*. A cet effet, ils disposent d'un assortiment d'organites sécrétoires essentiels et exclusifs au phylum : les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Ces organites libèrent des facteurs de virulence qui orchestrent et établissent l'infection en intervenant dans des processus clés. Ce sont notamment : la motilité des parasites, l'attachement à la cellule hôte suivie de l'entrée, le contournement de la défense immunitaire, la formation d'une vacuole parasitophore de protection pour la réplication et la sortie des parasites néoformés. *T. gondii* qui est le modèle d'étude de l'équipe, représente un excellent prototype pour la compréhension de l'organisation des parasites du phylum.

Des travaux précédents de l'équipe ont abouti à l'identification de *TgSORT*, un récepteur cargo situé au cœur du trafic. A l'image de ses homologues chez la levure, les mammifères et aussi *P. falciparum*, ce récepteur de tri effectue la navette entre le post-Golgi et l'endosome-like compartiment (ELC) transportant les protéines des micronèmes et des rhoptries vers l'ELC afin de permettre la biogenèse de ces organites sécrétoires. Ceci le rend indispensable à la motilité, l'invasion et la sortie des cellules hôtes et par ricochet à la survie du parasite parce que ces organites sont impliqués dans ces fonctions cellulaires vitales pour le parasite. Cependant le mécanisme par lequel *TgSORT* discrimine et fixe ces différentes protéines demeure inconnu. Son élucidation pourrait faire du récepteur une excellente cible thérapeutique contre la toxoplasmose et éventuellement le paludisme ou d'autres pathologies causées par des parasites *Apicomplexa*.

Le but de ma thèse de doctorat a été d'étudier les mécanismes d'interaction entre *TgSORT* et les facteurs de virulence ROPs et MICs puis de contribuer au développement d'un test de criblage qui permettra à long terme l'identification d'inhibiteurs l'ayant pour cible.

# MATERIELS ET METHODES

## **MATERIELS ET METHODES**

### **I- Culture cellulaire**

#### **A- Culture de *T. gondii***

##### **1- Culture des fibroblastes humains**

Une lignée primaire de fibroblastes humains (HFF ou Human Foreskine Fibroblast) est mise en culture dans un milieu complet constitué de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 10 000 unités/ml de pénicilline-streptomycine et 2 mM de L-Glutamine. Arrivée à confluence, des passages sont réalisés par décollage du tapis cellulaire à l'aide d'une solution trypsique (0,05% trypsine ; 0,1% EDTA). La culture est incubée à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>.

##### **2- Entretien des parasites *T. gondii***

Une monocouche de cellules HFF confluentes est infectée avec les parasites et le milieu de culture est changé 4 heures post infection. Les parasites sont maintenus par infection tous les 2 ou 3 jours de nouvelles cellules HFF. Les souches utilisées sont : la souche RH $\beta$ -Gal contenant le gène LacZ d'*Escherichia coli* en tant que gène rapporteur pour l'expression de la  $\beta$ -Galactosidase sous le contrôle du promoteur SAG1 (Seeber et Boothroyd, 1996), le mutant iKOTgSORT, parasite knock-out inductible à l'AnhydroTétracycline (ATc) pour le gène *TgSORT* (Sloves et al. 2012) et également la souche parent RH $\Delta$ KU80TaTi (Sheiner et al. 2011).

La souche RH $\beta$ -Gal a servi à l'évaluation in vitro de l'activité d'inhibiteurs obtenus à l'issue de criblage par microscopie à fluorescence. Le mutant iKOTgSORT a été créé à partir de la souche parentale RH $\Delta$ KU80TaTi (souche permettant une induction à l'ATc et ayant une forte capacité de recombinaison homologue). Il a été utilisé afin d'effectuer une complémentation fonctionnelle avec le gène *TgSORT* présentant des délétions des insertions 1, 2 et 3 situées sur la partie N-terminale.

##### **3- Purification des parasites *T. gondii***

Lorsque la lyse des cellules HFF est entamée, le tapis cellulaire est raclé. Le contenu des boîtes est ensuite passé à travers une seringue ou à l'homogénéisateur de Dounce pour les grandes cultures, permettant ainsi la lyse totale des cellules. Puis, la culture est filtrée à l'aide d'une membrane de

polycarbonate de 3  $\mu\text{m}$  et les parasites sont énumérés sur une lame de Malassez. Le filtrat est centrifugé à 2200 rpm pendant 12 minutes et les parasites purifiés sont utilisés pour différentes expériences.

### **B- Culture de *P. falciparum***

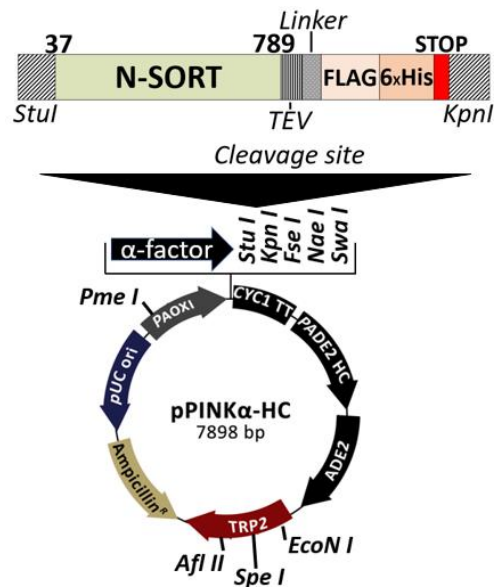
Le milieu de culture est composé de RPMI 1640, albumax 0,8%, HEPES 25 mM, hypoxanthine 0,4 mM, L-Glutamine 2 mM et gentamicine 0,05 mg/ml. Des érythrocytes de groupe O+ provenant de donneurs adultes non infectés par *P. falciparum* ont servi à la culture du parasite. Les globules rouges sains sont lavés 2 fois dans du PBS1X et une dernière fois dans du milieu de culture puis conservés à 4°C à un hémocrite de 50% pendant une semaine. Les parasites de la souche 3D7 chloroquino-sensible sont utilisés. Ils sont cultivés à 5% d'hématocrite, 37°C sous atmosphère humide avec 94% de N<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> et 1% de O<sub>2</sub>. Le milieu de culture est renouvelé chaque jour. Des frottis minces sont également effectués quotidiennement et observés au microscope optique. Des dilutions fréquentes des cultures parasitaires sont effectuées afin de monitorer la parasitémie.

## **II- Biologie moléculaire**

### **A- Construction des plasmides d'expression des protéines recombinantes N-SORT, N-SORT tronquée, ROP16, ROP18, MIC5**

La séquence codant pour *TgSORT*, de numéro d'accèsion TGME49\_290160 a été recherchée dans la base de données ToxoDB. La portion allant de l'acide aminé 37 à l'acide aminé 789 correspondant à N-SORT a été construite avec des étiquettes Flag puis 6xHistidine ajoutées à l'extrémité C-terminale. Le site de coupure de la protéase Tobacco Etch Virus (TEV) ainsi qu'un linker de 30 paires de base ont été rajoutés entre N-SORT et les étiquettes. La synthèse et le clonage dans le vecteur pPINK $\alpha$ -HC ont été réalisés par la firme Genscript sur la base du codon usage de la levure *Pichia pastoris*. Le gène était précédé par le promoteur inductible au méthanol Alcool Oxydase 1 (AOX1) et le peptide signal  $\alpha$ -factor de *Saccharomyces cerevisiae*, tous deux contenus dans pPINK $\alpha$ HC (Figure 15).

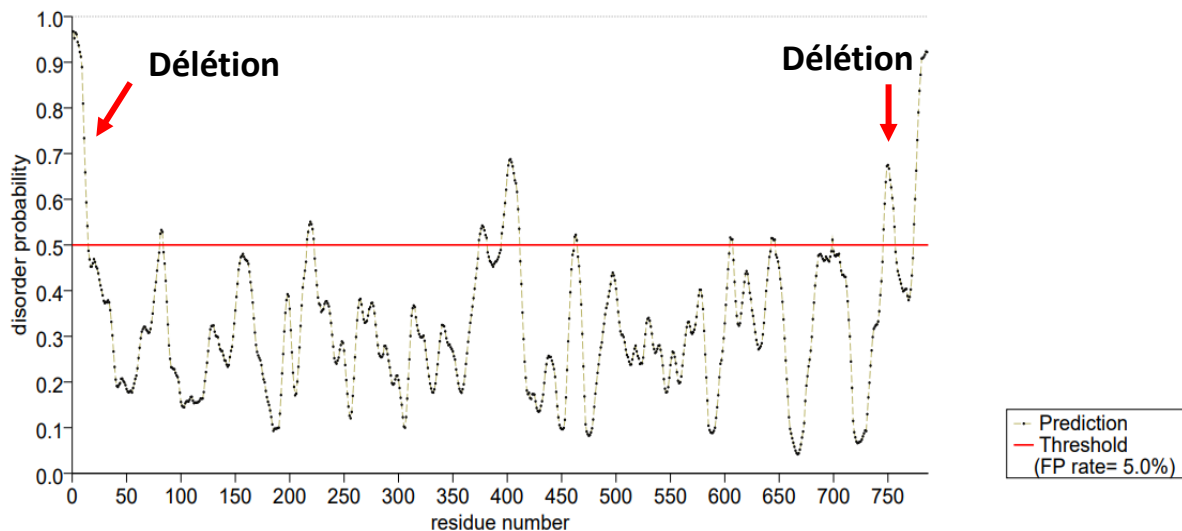
Les séquences codant pour MIC5 (TGME49\_277080), ROP16 (TGME49\_262730) et ROP18 (TGGT1\_205250) ont été synthétisées de façon similaire et clonées dans pPINK $\alpha$ -HC avec remplacement de l'épitope Flag par c-Myc pour MIC5 et HA pour les protéines des rhoptries. Les peptides signaux de ROP16 et ROP18 correspondant respectivement aux 24 et 48 premiers acides aminés ont été omis.



**Figure 15 :** Construction du plasmide N-SORT-pPINK $\alpha$ -HC pour l'expression de protéine recombinante dans *P. pastoris*

L'analyse de la propension au désordre de N-SORT construite avec les différentes étiquettes a été faite grâce au logiciel PrDos et a révélé la présence de régions flexibles. Deux de ces régions étaient situées aux extrémités de la séquence codant pour N-SORT (Figure 16). Nous avons effectué sur le plasmide N-SORT-pPINK $\alpha$ -HC, une première amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de la portion de la séquence située entre ces deux extrémités désordonnées puis cloné le fragment amplifié dans pPINK $\alpha$ -HC. Par la suite, nous avons réalisé une seconde PCR sur le fragment cloné pour rajouter les étiquettes Flag et 6xHistidine. Ce dernier amplicon a enfin été cloné dans pPINK $\alpha$ -HC ; ce qui nous a permis d'obtenir également une N-SORT tronquée (acides aminés 54-781) pour les expressions de protéines recombinantes.

1	<b>RPSEDAQKRE</b>	<b>SSVL</b> VANAAS	YANKKVSVSE	VSFDSHIEDI	QWCGTDHRTI	50
51	LLKTRR <b>GR</b> LY	RSQDGGKSWT	EITDLLKSSE	<b>AAT</b> GTVAVDS	IIVSPVDKRV	100
101	VLIVGSKRNH	FISEDSAATF	RRLKYKNTIH	NFHFPTRPK	YAILSTWTDA	150
151	CYSGSGTASR	AQSQQDCNHQ	LFYTRDLGRS	FKLVADYVVQ	FSWGDKKLG	200
201	TDHIFFTQHR	GRSGD <b>QPRYG</b>	<b>GW</b> SKNVDLMY	TPDFGATITR	LVYRGNKFLL	250
251	SNGYFFVAKV	KDAAKQTVSL	LVSTDGGKSF	QMAKLPVEIE	ERSYTVLDTS	300
301	EDAIMLHVNH	GHDNKGDTGN	VYISDAKGV	YLSLPLNNIR	TSTGECEFDK	350
351	VLSLEGVYLA	NFKDSVDSSA	SVD <b>GGQQGDL</b>	<b>EKLEEE</b> IEEE	AEGV <b>QVDLEK</b>	400
401	<b>KHKSVATRSR</b>	<b>QEEV</b> IRTVIS	FDKGGVWSYL	KAPKVDSRGQ	KIDCPPDRCW	450
451	LHLNGITRFS	<b>DFA</b> PFYSVEN	AVGIIMGTGN	VGSYLRPEKD	EANTYLSRDG	500
501	GVSWEIAHKG	AFIYEMGDHG	GLLMADDTK	KTNQVVFVSWN	EGQSWYDFEL	550
551	GAAPLFVDNI	VIEPNASSVE	FLLYGKREQD	SAGVLFHLDF	NALNQOQCKG	600
601	IWAAD <b>SV</b> SSD	YETWSPSDGR	AGGERCILGK	HITYTRRKQT	<b>SECF</b> NGRDFD	650
651	RPKVSKVCPC	TMEDYECEFG	FTRAIGSTQC	VATDAAAAAA	ATATGLA <b>QFA</b>	700
701	DES <b>D</b> AAAAAA	CTSSSFFYTS	AYRKVPGDVC	EGGWMPEKVA	VE <b>CPA</b> HSPVS	750
751	<b>RGGKT</b> GENLY	FQGTGQQMGR	DL <b>DYK</b> DDDDK	<b>HHHHHH</b>		



**Figure 16:** Analyse de la propension au désordre de N-SORT en utilisant PrDOs

### B- Transformation des souches *P. pastoris*

La transformation des souches a été faite suivant le protocole de Thermofischer modifié avec celui décrit par Wu et Letchworth en 2004 (Wu et Letchworth 2004). Toutes les cultures ont été réalisées à 27°C, 300 rpm et les centrifugations à 1500g pendant 5 minutes. Les différentes souches de *P. pastoris* ont été cultivées sur gélose YPD pendant 24 heures. Les cultures de départ ont été réalisées en incubant une colonie isolée dans 10 ml de bouillon YPD pendant 24 heures. Des cultures de 100

ml ont été réalisées à partir d'une DO<sub>600</sub> de 0,2 jusqu'à atteindre une DO<sub>600</sub> comprise entre 1,3 et 1,5. Le culot est récupéré, lavé deux fois dans de l'eau stérile, puis dans du sorbitol 1M gardés à 4°C ou dans la glace. Les cellules ont été perméabilisées pendant 30 minutes à température ambiante en utilisant un tampon constitué de : 100 mM d'acétate de lithium, 10 mM DTT, 0.6 M sorbitol, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.5. Trois lavages ont été effectués avec du sorbitol 1M froid puis le culot a été resuspendu dans 480 µl de sorbitol 1M et conservé sur la glace jusqu'à utilisation. 80 µl de ces cellules électrocompétentes ont été transférées dans une cuve d'électroporation de 0.2 cm ; 1 µg de plasmid linéarisé par SpeI a été ajouté et la suspension a été conservée sur la glace pendant 5 minutes. La transformation a été effectuée à 1500 V, 186 Ω et 25 µF à l'aide d'un électroporateur BTX Electro Cell Manipulator 600. Un millilitre (1 ml) de milieu YPDS conservé sur la glace a été immédiatement ajouté et le mélange a été conservé pendant 2h à 27°C sans agitation puis 10µl et 100 µl ont été étalés sur gélose PAD (milieu de sélection dépourvu d'adénine) et incubés à 27°C pendant 24 à 48 heures. Quatre (4) souches (S1, S2, S3 et S4) auxotrophes à l'adénine, de génotypes respectifs *ade2*, *ade2 pep4*, *ade2 prb1* et *ade2 pep4 prb1* ont été transformées. S1 est une souche sauvage et les 3 autres sont des souches knock-out pour la protéinase A (S2), pour un précurseur de la protéinase B (S3) et double knock-out pour les deux protéases (S4). L'intérêt d'utiliser ces souches mutantes est de minimiser la protéolyse de notre protéine d'intérêt par les protéases de la levure avant et/ou après sa sécrétion. Les colonies positives sont repiquées et analysées par PCR afin de vérifier la présence des gènes d'intérêt.

### **C- Criblage des transformants *P. pastoris* par PCR**

L'ADN génomique des transformants est extrait selon le protocole proposé par Thermofischer scientific. Une colonie est resuspendue dans 1 ml d'eau stérile. La suspension est centrifugée à vitesse maximale pendant 10 secondes et le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu puis lysé au vortex avec 0,3 g de billes de verre dans 200 µl de tampon (1% SDS ; 2% Triton X-100 ; 0,1 M NaCl ; 1 mM EDTA ; 0,01 M Tris pH 8) et 200 µl de phénol : chloroforme : alcool isoamylique. 200 µl de tampon Tris-EDTA (TE) sont ajoutés, le mélange est homogénéisé au vortex, centrifugé à vitesse maximale pendant 5 minutes et le surnageant est récupéré. Un ml d'éthanol 100% froid est ajouté pour faire précipiter les acides nucléiques, le mélange est centrifugé pendant 15 minutes comme précédemment et le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 400 µl de TE et 1 µl de RNase A puis incubé à 37°C pendant 5 minutes. Un microlitre (1µl)



de 4 M NaCl, 10 µl de protéinase K et 20 µl de SDS 10% sont ajoutés avant une nouvelle incubation à 37°C pendant 5 minutes. Après addition de 400 µl de phénol : chloroforme : alcool isoamylique, homogénéisation au vortex et centrifugation pendant 5 minutes, le surnageant est recouvré. 40 µl d'acétate de sodium 3M et 100 µl d'éthanol 100% froid sont complétés et une centrifugation de 15 minutes est effectuée. L'ADN est rincé à l'éthanol 70% et séché à 37°C pendant 10 minutes avant d'être resuspendu dans du tampon Tris-EDTA (TE) puis 50 ng sont prélevés pour les PCR en utilisant la Taq'ozyme Purple Mix 2. Les amorces sens et anti-sens utilisées (F\_N-SORT, R\_N-SORT, F\_MIC5, R\_MIC5) ont été construites pour amplifier les régions codant pour les gènes d'intérêt (Voir tableau 2).

#### **D- Complémentation fonctionnelle par CRISPR-Cas9 de TgSORT dans le mutant iKO-TgSORT**

Le gène Uracil PhosphoRibosylTransférase code pour une enzyme du même nom, qui est non essentielle au parasite (Donald et Roos, 1995). Cette enzyme intervient dans la voie de récupération des nucléotides à partir de la cellule hôte. Le parasite étant capable de synthétiser de novo ses propres métabolites, la suppression de ce gène ne lui est pas préjudiciable et sert de cible pour la complémentation fonctionnelle. La suppression du gène UPRT confère une résistance au 5'-fluoro-2'-deoxyuridine (sélection négative).

#### **Délétion des insertions 1, 2, 3 et 123 par mutagenèse dirigée**

Afin de déterminer le rôle des boucles présentes chez *TgSORT* et les sortilines des autres parasites *Apicomplexa*, nous avons entrepris d'effectuer des délétions individuelles et une triple délétion des trois insertions situées sur le domaine N-terminal et de compléter le mutant iKOTgSORT avec les différentes constructions. Le plasmide pUPRTTgSORT-HA a été utilisé pour réaliser les délétions. C'est un plasmide contenant les régions 5' et 3' UTR (Untranslated regions) du gène UPRT encadrant le gène *TgSORT* précédé de son promoteur et tagué avec un épitope HA puis suivi de la région 3'UTR du gène SAG1. Des amorces sens et anti-sens encadrant les régions à supprimer ont été construites (Voir tableau 2) et les mutagenèses ont été effectuées en 3 étapes en utilisant le kit Q5 Site-Directed Mutagenesis de New England Biolabs.

**1<sup>ère</sup> étape :** amplification exponentielle du plasmide en utilisant les amorces spécifiques à chaque insertion

Le milieu réactionnel est constitué de : 5  $\mu$ L de Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 0,5  $\mu$ M de chaque amorce sens, 10 ng de plasmide pUPRTTgSORT-HA et de l'eau milli Q pour atteindre un volume final de 10  $\mu$ L. Les conditions de PCR sont :

98°C pendant 30 secondes (a)

98°C pendant 10 secondes (b)

50-70°C pendant 30 secondes (c)

72°C pendant 6 minutes (d)

72°C pendant 2 minutes (e)

4-10°C (f)

25 cycles ont été effectués (b à d)

**2<sup>ème</sup> étape :** Traitement à la Kinase, Ligase, Dpn I (KLD)

Le milieu réactionnel était composé de : 1  $\mu$ L de produit de PCR, 5  $\mu$ L de tampon 2X KLD réaction, 1  $\mu$ L de 10X KLD enzyme et de l'eau milli Q pour atteindre un volume de 10  $\mu$ L.

La réaction a été incubée à température ambiante pendant 5 minutes

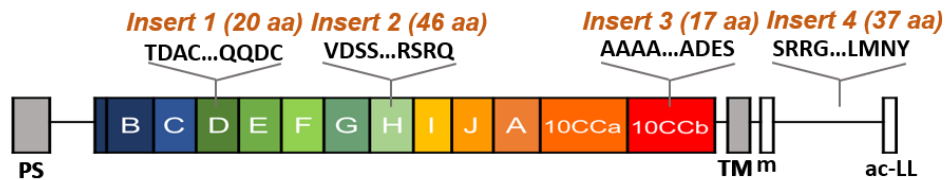
**3<sup>ème</sup> étape :** Transformation des bactéries *E. coli* et production des plasmides

Les délétions ont été confirmées par séquençage en utilisant les primers listés dans le tableau 2.

### **Transfection**

Les différents plasmides pUPRT- TgSORT $\Delta$ Loop1, 2, 3 et 123 sont linéarisés avec l'enzyme de restriction BamHI et extraits au phénol chloroforme. Les tachyzoïtes iKOTgSORT purifiés sont resuspendus dans du tampon cytomix et transformés par électroporation (T= 1,5 KV, C= 24  $\mu$ F, R= 24  $\Omega$ ) avec 30  $\mu$ g de chaque plasmide pUPRT- TgSORT $\Delta$ Loop1, 2, 3 ou 123 linéaire et 3  $\mu$ g de pSAG1::Cas9-U6::sgUPRT (plasmide contenant un ARN guide ciblant le gène UPRT. Vingt-quatre heures après incubation, la sélection des transformants positifs débute par ajout de 5  $\mu$ M de 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5'FUDR) (Sigma Aldrich) et dure 6 à 8 jours. Cette population résistante au 5' FUDR est clonée dans des plaques de 96 puits et les clones sont analysés par immunofluorescence indirecte. Le mutant iKO TgSORT complémenté par le plasmide pUPRT- TgSORT non muté a servi de contrôle négatif.

**Cytomix :** 120 mM KCl, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,6), 25 mM HEPES pH 7,6, 2 mM EGTA (pH 7,6), 5 mM MgCl<sub>2</sub> supplémenté de 2 mM ATP (pH 7,6) et 5 mM Glutathione



**Figure 17:** Schéma de TgSORT montrant les délimitations des différentes insertions

### III- Biochimie

#### A- Expression de protéines recombinantes N-SORT, MIC5, ROP16 et ROP18

Les incubations sont effectuées à 27°C et 250 rpm. Des expériences pilotes sont au préalable réalisées à partir de 10 ml de culture afin de déterminer les conditions optimales (concentration de méthanol et temps) d'expression des protéines recombinantes. Un clone *P. pastoris* transformé avec le vecteur pPINK $\alpha$ HC vide a été mis en culture en parallèle afin de servir de contrôle négatif.

Lorsque l'expression est confirmée, des productions à grande échelle sont effectuées. Un litre de milieu de culture BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium) estensemencé par 25 ml d'une préculture de 24 heures du transformant. Lorsque la DO atteint entre 2 et 6, la culture est centrifugée et le culot est remis en suspension dans 200 ml de milieu d'induction BMMY (Buffered Methanol-complex Medium) et remis sous incubation. Vingt-quatre heures l'incubation, l'induction au méthanol débute et est effectuée toutes les 24 heures pendant 4 jours au maximum. Les surnageants sont analysés par SDS-PAGE et western blot. L'expression de Nt-SORT est confirmée par spectrométrie de masse.

#### B- Chromatographie d'affinité et gel filtration ou chromatographie d'exclusion stérique

Les surnageants des cultures sont concentrés environ 40 fois à l'aide de filtres à centrifuger. Le concentré est dilué au 1/10<sup>ème</sup> avec un tampon de fixation (50 mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl et 5% Glycérol) puis incubé sur des billes de nickel pendant 4 heures à 4°C avec 1 mM PMSF et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Ceci permet la fixation par affinité des étiquettes 6xHis des protéines recombinantes sur la colonne de nickel afin de les isoler du milieu. 3 lavages sont effectués dans un tampon 50 mM Tris pH 7,5, 1M NaCl et 5% Glycérol et 3 autres dans 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl et 5% Glycérol. Les protéines recombinantes sont éluées 2 fois avec 250 mM d'imidazole et concentrées à 1 ml dans du PBS 1X, 5% Glycérol.

L'éluat concentré de N-SORT est finalement purifié par gel filtration sur une colonne Superose 6 Increase de 24 ml dans un tampon composé de 50mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl et 1mM EDTA. Les protéines contenues dans le tampon sont éluées de la colonne en fonction de leur volume hydrodynamique et récupérées dans plusieurs fractions. Les protéines de grand poids moléculaire sont éluées en premier (exclues) tandis-que les protéines de faible poids moléculaire sont plus tardivement car elles traversent les pores des billes formant la colonne.

### **C- Electrophorèse en gel de polyacrylamide et Western blot**

5 µl de tampon Laemmli 5X sont ajoutés à 16 µl de surnageant de culture et le mélange est chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont déposés dans un gel de polyacrylamide de 12% et migrés à 30V jusqu'au gel de séparation puis à 70V et à 120V. Le gel est coloré au bleu de Coomassie. En ce qui concerne le western blot, les protéines sont transférées à 80V pendant 1 heure sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont bloquées pendant 30 minutes dans du lait écrémé dilué à 5% dans du TNT (15 mM Tris HCl pH 8 ; 140 mM NaCl ; 0,05% de tween-20). Les bandes sont révélées en utilisant la solution de révélation GE Healthcare, qui cible la peroxydase conjuguée aux différents anticorps secondaires utilisés.

### **D- Test de l'activité anti-toxoplasmique d'inhibiteurs : dosage de la bêta-galactosidase**

Des plaques de 24 puits contenant des cellules HFF confluentes ont été infectées avec 100 000 parasites RHβ-Gal/puit. Après 4 heures à 37°C, les cellules infectées ont été lavées une fois avec le milieu de culture et incubées avec différentes concentrations finales de composés (10 µM, 25 µM, 50 µM et 100 µM) pendant 48 heures. Un contrôle négatif (sans inhibiteur) a été effectué en parallèle. Le tapis cellulaire est récupéré par grattage et centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est ensuite lavé au PBS1X et lysé pendant 1 heure à 50°C dans 150 µl d'un tampon constitué de 1% de Triton X-100, 5 mM de DTT, 1 mM de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 100 mM d'HEPES comme décrit par Seeber et Boothroyd, 1996 et McFadden et al., 1997. 50 µl du surnageant sont dilués à moitié dans le tampon de lyse. 100 µl de chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG) dilués à 2 mM dans le tampon de lyse sont ajoutés. Le mélange est incubé à 30°C over-night et la densité optique est mesurée à 570 nm.

## **IV- Biologie cellulaire**

### **A- Immunofluorescence indirecte sur *T. gondii***

Des cellules HFF confluentes cultivées sur des lamelles de verre sont infectées avec les parasites pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde (PAF) 4% pendant 30 minutes à température ambiante. Après 3 lavages au PBS1X, elles sont perméabilisées pendant 30 minutes au PBS1X, 0,2 % Triton X-100 et 0,1M glycine. Un blocage de 30 minutes est ensuite effectué en PBS1X supplémenté de 0,1 % Triton X-100 et 10% SVF. Les incubations avec les anticorps primaires HA (1/250) puis secondaires (Sigma Aldrich Alexa Fluor 488, 568 ou 594) sont réalisées chacune pendant 1 heure dans un tampon constitué de PBS1X, 0,1% Triton X-100, 5% SVF. Les anticorps secondaires Alexa fluor 594 et 488 utilisés ont été incubés en présence de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pour le marquage du noyau et du bleu d'Evans pour éliminer les bruits de fond. Toutes les incubations sont faites à 37°C. Les lamelles sont montées avec du mowiol, mises à sécher à 37°C pendant au moins 30 minutes et observées au microscope à fluorescence Zeiss.

### **B- Test de l'activité antipaludique des inhibiteurs : cytométrie en flux**

La culture de *P. falciparum* est synchronisée au sorbitol 5% pendant 15 minutes à température ambiante afin d'éliminer les formes matures et de sélectionner les rings. 48 heures plus tard, une nouvelle synchronisation est effectuée pour éliminer les formes matures persistantes. Les composés sont ensuite testés dans des microplaques de 96 puits à un hématoците de 5% et une parasitémie en rings initiale de 1% dans 250 µl de milieu de culture. Tous les composés sont testés à une gamme de concentration de : 5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM et 150 µM. Les tests sont effectués en quadruple et l'expérience est répétée trois fois. Le contrôle négatif est constitué de milieu de culture sans inhibiteur et le contrôle positif de chloroquine à des concentrations de 0,005 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM et 150 µM. Les plaques sont incubées pendant 48 heures à 37°C dans une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub> et 94% N<sub>2</sub>.

Les globules rouges parasités (2,5 µl) sont prélevés dans chaque puit et incubés à 37°C pendant 1 heure dans un mélange Hoechst (marqueur d'ADN) -Thiazole Orange (marqueur d'acides nucléiques) (HO-TO) à des concentrations finales de 0,001 mg/ml et 0,005 mg/ml respectivement. Les échantillons sont fixés au PAF % et analysés au cytomètre en flux BD FACSCanto. Le logiciel FlowJO a servi au traitement des données.

## V- Analyses statistiques

Les résultats des tests des inhibiteurs sur *T. gondii* et *P. falciparum* sont analysés par ANOVA à deux variables suivi du test de comparaisons multiples de Tukey. Le logiciel GraphPad Prism version 8.3.0 (GraphPad Software, San Diego, Californie, États-Unis) est utilisé. La moyenne du pourcentage de croissance du parasite  $\pm$  l'écart-type en fonction du logarithme de la concentration d'inhibiteur est présenté. Les différences sont considérées comme significatives lorsque p est inférieur à 0,05.

**Tableau 2** : Liste des amorces utilisées

	Désignations	Séquences
1	F_N-SORT	TCTGAAGATGCTCAAAAGAGAGAGTCT
2	R_N-SORT	ACCAGTTTTACCACCTCTAGAAACAGG
3	F_MIC5	TTGAGACCTACTGTTAGAAGTTCC
4	R_MIC5	CCAGCCAACCTAACCTCAGAATCC
5	F_N-SORT tronquée	GCACAGGCCTTCTTACGCTAATAAGAAAG
6	R1_N-SORT tronquée	CATTGGTACCAGGAGAATGAGCAGGACA
7	R2_N-SORT tronquée	CATTGGTACCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTTAT CATCATCATCCTTGTAATCCAAATCTCTACCCATTT GTTGACCAGTACCTTGAAAGTACAAATTTTCACCA GGAGAATGAGCAGGACA
8	Forward_ΔLoop1	AACCACCAGCTCTTCTACACGCGGGA
9	Reverse_ΔLoop1	CCAGGTCGACAGAATCGCGTACTTGGGC
10	Forward_ΔLoop2	GAAGAGGTGATTCGCACAGTGATCTCCT
11	Reverse_ΔLoop2	TGAGTCCTTGAAGTTCGCCAAGTACACA
12	Forward_ΔLoop3	GACGCCGACGCCGCCGCAT
13	Reverse_ΔLoop3	TGCTGCGTCGGTCGCCACGCAC
14	FOR_Δ_pUPRTSORT1 (Séquençage)	GCTCAAGTACAAGAACACG
15	FOR_Δ_pUPRTSORT2 (Séquençage)	GGAAGCATATCACGTACAC
16	REV_Δ_pUPRTSORT1 (Séquençage)	CATCTCCCGGAACCTTTC

17	REV_Δ_pUPRTSORT2 (Séquençage)	CTTTCGGAGCCTTCAGATA
----	----------------------------------	---------------------

**Tableau 3** : Liste des anticorps primaires utilisés

<b>Noms des anticorps</b>	<b>Espèces</b>	<b>Dilution (blot)</b>	<b>Sources</b>
Anti <i>TgSORT</i>	Rat	1/1000	Lab Stanislas Tomavo
Anti HA	Rat	1/1000	Cell Signaling
Anti HA	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Anti Flag	Lapin	1/1000	Sigma Aldrich
Anti c-Myc	Souris	1/1000	Cell Signaling
Anti MIC5	Souris	1/1000	Carruthers Lab

# RESULTATS



## RESULTATS

### I) Expression optimisée de TgN-SORT et ses partenaires dans la levure méthylothrophique *P. pastoris*

Les expériences antérieures de l'équipe ont mis en lumière le rôle essentiel de TgSORT dans la biogenèse des organites sécrétoires apicaux et dans la survie de *T. gondii* (Sloves et al. 2012). Ainsi, le domaine N-terminal du récepteur fixe les protéines MIC et ROP, qu'il achemine depuis le Golgi vers l'ELC avant d'être recyclé par le retromer composé de TgVps35, TgVps26 et TgVps29 (Sangaré et al. 2016) afin de transporter d'autres protéines de micronèmes et de rhoptries.

Dans le but d'exprimer la partie luminale N-terminale de TgSORT longue de 752 acides aminés et l'obtenir de manière soluble comme cela a été fait pour la sortiline humaine pour déterminer sa structure tridimensionnelle (Quistgaard et al. 2009b), nous avons décidé d'utiliser la levure *Pichia pastoris*. *P. pastoris* est une cellule eucaryote comme *T. gondii*, ce qui pourrait permettre non seulement que TgN-SORT soit sécrétée dans le milieu de culture mais également qu'elle ait un repliement correct dû au fait qu'elle traversera la voie de sécrétion depuis l'ER, le Golgi et le post-Golgi de la levure. Cette stratégie a été adoptée car jusqu'à présent toutes les tentatives précédentes du laboratoire pour exprimer et purifier TgN-SORT des bactéries *E. coli* n'ont abouti qu'à de la protéine recombinante insoluble et inexploitable pour des études structure-fonction. L'expression soluble de TgN-SORT constitue la première étape pour déterminer sa structure tridimensionnelle sous forme libre et sous forme complexée avec des protéines ROP ou MIC et d'identifier les motifs d'interaction. Afin d'atteindre ces objectifs, les séquences codant pour TgN-SORT (752 aa), MIC5 (181 aa) puis ROP16 (683 aa) et ROP18 (506 aa) sans propeptides taguées avec 6 histidines ont été optimisées, synthétisées et clonées par Genscript dans le plasmide pPINK $\alpha$ HC. Des étiquettes supplémentaires (Flag pour TgN-SORT, c-Myc pour MIC5 et HA pour ROP16 et ROP18 ont été ajoutées). Ces différentes séquences étaient précédées par le peptide signal  $\alpha$ -factor de *Saccharomyces cerevisiae* afin de permettre un largage extracellulaire des protéines recombinantes. Par ailleurs, l'expression était sous le contrôle du promoteur inductible au méthanol Alcohol oxidase 1 (AOX1). Au préalable, nous avons réalisé des expériences pilotes en vue de déterminer les conditions optimales d'expression des protéines notamment la souche, la concentration de méthanol et le temps d'induction nécessaires. La première expérience pilote d'expression de TgN-SORT a révélé aussi bien au bleu de Coomassie qu'en western blot la présence d'une bande intense à 100 kDa correspondant à la taille escomptée pour TgN-SORT en

incluant les étiquettes. Parmi les quatre (4) souches S1, S2, S3 et S4 auxotrophes pour l'adénine et de génotypes respectifs *ade2*, *ade2 pep4*, *ade2 prb1* et *ade2 pep4 prb1*, la S4, double mutante pour deux protéases de levure a montré une plus forte expression de TgN-SORT. En outre, une concentration en méthanol de 2% et un temps d'induction de 72h sont requis pour une bonne expression des protéines recombinantes. Après avoir trouvé les meilleures conditions de production, nous avons procédé à une purification à petite échelle par chromatographie d'affinité et l'expression de TgN-SORT a été confirmée par spectrométrie de masse. Nous avons alors réalisé des productions et purifications à grande échelle de la protéine. Une production de trois (3) litres en milieu minimal supplémenté d'1% d'acides casaminés nous a permis d'obtenir un rendement de 2 mg. Après purification par chromatographie d'exclusion stérique, une coloration négative a été effectuée à l'aide d'un microscope électronique de 120 keV à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC). Des images ont ensuite été acquises à l'Institut Pasteur de Paris et traitées à l'aide du logiciel Cryospark. Les analyses ont montré que TgN-SORT se présente globalement sous la même forme que la sortiline humaine avec une structure circulaire formée par 10 beta propellers et un tunnel en plein milieu. Toutefois, la petite taille de la protéine à savoir autour de 100 kDa n'a pas permis l'obtention d'une structure 3D à très haute résolution afin de pouvoir déterminer le repliement ou structuration des insertions peptiques spécifiques du parasite. Des essais de cristallographie ont alors été tentés au laboratoire HTX de Grenoble mais il semble que les insertions peptidiques spécifiques introduisent trop de flexibilités dans la structure générale de TgN-SORT, ce qui a empêché sa cristallisation. Nous avons alors procédé à l'utilisation des programmes bioinformatiques puissants tels que Modeller et Alphafold2 pour prédire une structure 3D plausible de TgN-SORT, ce qui a permis de déterminer que ces trois insertions peptidiques sont organisées sous la forme de 3 boucles flexibles dans le domaine bêta-propeller D, H et le domaine 10CCb, respectivement. A l'étape actuelle des recherches, ces trois boucles ou insertions 1, 2 et 3 sont retrouvées exclusivement dans les sortilines des *Apicomplexa*. L'incapacité de ces domaines à se replier aurait pu empêcher la formation des cristaux. En parallèle, nous avons exprimé avec succès les protéines partenaires MIC5, ROP18 et ROP16 dans la levure et des expériences préliminaires de co-immunoprécipitation N-SORT-MIC5 et N-SORT-ROP18 ont suggéré une liaison directe entre MIC5 et TgN-SORT d'une part alors qu'aucune liaison évidente n'est apparue pour ROP18 (résultats non présentés). Cela pourrait être lié au fait que MIC5 a été exprimée entière, avec son propeptide tandis que ROP18 était dépourvu du sien. Comme mentionné ci-dessus, des

études détaillées d'analyses par le logiciel récent de prédiction puissante appelé Alphafold 2 (Jumper et al. 2021) nous ont non seulement prédit finalement une structure 3D de la sortiline entière de *T. gondii* mais aussi les interactions plausibles avec les protéines ROP. En effet, Alphafold 2 prédit que TgN-SORT se lierait par le biais de résidus conservés à des motifs précis de protéines ROP (Voir article). Il demeure donc que nous devrions confirmer par des expériences tous ces nouveaux résultats de prédiction Alphafold 2 mais également les travaux préliminaires d'interactions entre TgN-SORT et MIC5 ou TgN-SORT-ROP avec ce dernier possédant son prodomaine peptidique N-terminal.

Parallèlement, aux travaux indiqués ci-dessus et dans l'optique de comprendre le rôle biologique des insertions peptidiques spécifiques des sortilines des parasites *Apicomplexa*, nous avons effectué des délétions uniques puis une triple délétion des insertions 1, 2 et 3 afin de réaliser une complémentation fonctionnelle du mutant iKOTgSORT. L'analyse des phénotypes des mutants font l'objet d'études en cours de réalisation après la fin de ma thèse dans le laboratoire.

Le protocole d'expression des protéines dans *P. pastoris* et les analyses structurales renforcées par les prédictions Alphafold 2 ont fait l'objet de l'écriture d'un article déposé sur la plateforme BioRxiv sous le titre de "Structural analysis of *Toxoplasma gondii* Sortilin" et publié dans le journal *Frontiers in Parasitology*.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Mark C. Field,  
University of Dundee, United Kingdom

## REVIEWED BY

Erica S. Martins-Duarte,  
Federal University of Minas Gerais, Brazil  
Joel Bryan Dacks,  
University of Alberta, Canada

## \*CORRESPONDENCE

Stanislas Tomavo  
✉ stanislas.tomavo@i2bc.paris-saclay.fr

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Molecular Cellular Parasitology,  
a section of the journal  
Frontiers in Parasitology

RECEIVED 21 November 2022

ACCEPTED 17 January 2023

PUBLISHED 30 January 2023

## CITATION

Honfozo A, Ghouil R, Alayi TD, Ouldali M, Arteni A-A, Atindehou CM, Fanou LA, Hathout Y, Zinn-Justin S and Tomavo S (2023) The luminal domain of *Toxoplasma gondii* sortilin adopts a ring-shaped structure exhibiting motifs specific to apicomplexan parasites. *Front. Parasitol.* 2:1103772. doi: 10.3389/fpara.2023.1103772

## COPYRIGHT

© 2023 Honfozo, Ghouil, Alayi, Ouldali, Arteni, Atindehou, Fanou, Hathout, Zinn-Justin and Tomavo. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# The luminal domain of *Toxoplasma gondii* sortilin adopts a ring-shaped structure exhibiting motifs specific to apicomplexan parasites

Ariane Honfozo<sup>1</sup>, Rania Ghouil<sup>1</sup>, Tchilabalo Dilezitoko Alayi<sup>2</sup>, Malika Ouldali<sup>1</sup>, Ana-Andreea Arteni<sup>1</sup>, Cynthia Menonve Atindehou<sup>3</sup>, Lucie Ayi Fanou<sup>3</sup>, Yetrib Hathout<sup>2</sup>, Sophie Zinn-Justin<sup>1</sup> and Stanislas Tomavo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Saclay, CNRS UMR 9198-CEA, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif sur Yvette, France, <sup>2</sup>School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Binghamton University, Binghamton, NY, United States, <sup>3</sup>Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Technologies, Université d'Abomey Calavi, Cotonou, Benin

Rhoptries and micronemes are essential for host cell invasion and survival of all apicomplexan parasites, which are composed of numerous obligate intracellular protozoan pathogens including *Plasmodium falciparum* (malaria) and *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis) that infect humans and animals causing severe diseases. We identified *Toxoplasma gondii* TgSORT as an essential cargo receptor, which drives the transport of rhoptry (ROP) and microneme (MIC) proteins to ensure the biogenesis of these secretory organelles. The luminal domain of 752 amino acid long situated at the N-terminus end of TgSORT has been described to bind to MIC and ROP proteins. Here, we present an optimized protocol for expression of the entire luminal N-terminus of TgSORT (Tg-NSORT) in the yeast *Pichia pastoris*. Optimization of its coding sequence, cloning and transformation of the yeast *P. pastoris* allowed the secretion of Tg-NSORT. The protein was purified and further analyzed by negative staining electron microscopy. In addition, molecular modeling using AlphaFold identified key differences between the human and the *T. gondii* sortilin. The structural features that are only present in *T. gondii* and other apicomplexan parasites were highlighted. Elucidating the roles of these specific structural features may be useful for designing new therapeutic agents against apicomplexan parasites

## KEYWORDS

*Toxoplasma gondii*, sortilin, *Pichia pastoris*, AlphaFold, 3D-models



## Introduction

*Toxoplasma gondii* is a single-celled obligate intracellular parasite responsible for toxoplasmosis. It is the leading cause of congenital neurological abnormalities and severe opportunistic infection in immunocompromised individuals (Pappas et al., 2009). This parasite belongs to the large phylum of *Apicomplexa*, which includes protozoan pathogens such as *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora* and *Plasmodium* (Kim and Weiss, 2004). Apicomplexan parasites possess various but similar morphological features that constitute the hallmark of the phylum (Morrisette and Sibley, 2002). Among these different structures, the most remarkable is the presence of an apical complex composed of polar ring, conoid and unique secretory organelles named rhoptries and micronemes. During the invasion, micronemes (MICs) release their contents that are required for motility, host cell attachment and egress (Dubois and Soldati-Favre, 2019). MIC proteins (adhesins and escorts) form complexes that link host cell receptors to the glideosome (Opitz and Soldati, 2002). These complexes required for invasion are translocated backwards, allowing the parasite to propel itself into the host cell by membrane invagination. Subsequent proteolysis of these proteins is essential for cell invasion progression by enabling parasite migration into host cell (Brydges et al., 2006). MIC5 was the first microneme protein identified as not possessing an adhesive domain (Brydges et al., 2000). It acts as a regulator of the activity of the parasitic surface protease MPP2 (Brydges et al., 2006). Rhoptries (ROP) proteins are also involved in host cell entry and in the subversion of other host functions such as the control of nuclear transcription and immune responses (Boothroyd and Dubremetz, 2008). Among these proteins, ROP18 phosphorylates and inactivates a family of host immunity related GTPases (IRGs), preserving the parasite from lysis (Fentress and Sibley, 2011). ROP16 interferes with signal transduction in the host nucleus through phosphorylation of the activator STAT3/6 (Butcher et al., 2011). The key roles of rhoptries and micronemes make these organelles the pillars of the parasite survival. However, the formation of these vital secretory organelles depends on the presence of *T. gondii* Sortilin-like receptor (TgSORTLR), which is a type I transmembrane cargo transporter located in the post-Golgi and endosome related compartments. TgSORTLR is essential to the biogenesis of secretory organelles and in turn to motility, invasion and egress (Sloves et al., 2012). Furthermore, TgSORTLR is required for efficient host immune responses against infection (Sloves et al., 2015). The luminal domain of the receptor binds ROP and MIC proteins (Sloves et al., 2012) while the cytosolic tail recruits partners to enable anterograde and retrograde receptor transport (Sangaré et al., 2016), in a manner similar to sortilins of humans (Nielsen et al., 2001). Therefore, we now named this receptor TgSORT. Furthermore, homologues of TgSORT is present in all apicomplexan parasites whose genomes have been sequenced (VEuPathDB). For example, in the malaria *P. falciparum*, PfSORT determines transport of proteins to form rhoptries (Hallée et al., 2018a; Hallée et al., 2018b).

In humans, sortilins are multifunctional receptors whose structures are defined by the backbone of yeast VPS10 composed of ten  $\beta$ -propeller domains, two cysteine bound domains, one transmembrane domain and C-terminus tail (Quistgaard et al., 2009). These sortilins function in a mannose-6-phosphate independent manner for the sorting of numerous enzymes from the endosomal system to the lysosomes. Expressed in a number of vertebrate tissues, notably brain, spinal cord, testis, and skeletal

muscle, sortilins also function as a surface coreceptor for induction of neural apoptosis in the brain (Kim and Hempstead, 2009) and are linked to type 2 diabetes (Clee et al., 2006) and Alzheimer's disease (Rogaeva et al., 2007). However, mice or yeast deficient in sortilin/VPS10 are viable and show relatively mild phenotypes (Marcusson et al., 1994; Jansen et al., 2007). In contrast, as demonstrated for *T. gondii* and *P. falciparum*, this receptor is an essential factor that allows apicomplexan parasites to build the complex apical structure composed of the functional conoid containing rhoptries and micronemes (Sloves et al., 2012; Sakura et al., 2016; Sangaré et al., 2016; Hallée et al., 2018a; Hallée et al., 2018b). However, the percentage of identity between *T. gondii* sortilin and its human counterparts is only about 27%. Interestingly, four peptide insertions are present in the  $\beta$ -propeller domains B, H, 10CCb and the C-terminus tail in all apicomplexan parasite's sortilins identified up-to-date (Sloves et al., 2012). The presence of conserved specific peptide insertions exclusively in sortilins of apicomplexan parasites suggests that they may have peculiar 3-D structures compared to the classical VPS10 backbone that can be exploited for future therapeutic interventions. In the present study, we established optimal conditions for expression of a secreted soluble N-terminus luminal end of TgSORT in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for structural analysis including a powerful computational predictive program AlphaFold to propose a 3D-model of TgSORT.

## Materials and methods

### Strains, vectors and reagents

Pichiapink secreted protein kit (ThermoFisher scientific) containing one, pPINK $\alpha$ HC vector, 5' $\alpha$ -factor primer, 3'*CYCI* primer was used in this study. PichiaPink expression strains composed of 4 adenine auxotrophic *Pichia pastoris* strains were as follows: PichiaPink strain 1, a wild strain of genotype *ade2*, PichiaPink strain 2 (*ade2*, *pep4*), PichiaPink strain 3 (*ade2*, *prb1*) and PichiaPink strain 4 (*ade2*, *pep4*, *prb1*). Pichia Pink Media kit (Dextrose, Pichia Adenine Dropout Agar, yeast extract peptone dextrose, yeast extract peptone dextrose sorbitol, yeast extract peptone dextrose). Additional reagents included yeast Nitrogen Base (ThermoFischer scientific), methanol (Millipore), biotin and sorbitol (Sigma Aldrich), glycerol, 1M potassium phosphate buffer. Rabbit anti-Flag antibodies (Sigma Aldrich) and rat anti-Tg-NSORT antibodies were produced in the laboratory as previously described (Sloves et al., 2012). The following media were also prepared and included YPD broth, YPD agar, YPDS yeast extract peptone dextrose sorbitol, PAD agar (Pichia Adenine Dropout Agar), BMGY and BMMY.

### *Pichia pastoris* expression vector

The N-terminus luminal coding region of TgSORT (named here Tg-NSORT) from amino acid 37 to 789 (*TgSORTLR* ToxoDB accession Number TGME49\_290160) was designed with Flag and 6xHistidine epitopes added to the C-terminus end. The synthesis and cloning of this Flag and 6xHis tagged TgSORT coding nucleotide



sequence in pPINK $\alpha$ HC were performed by Genscript based on *P. pastoris* codon usage. This vector contained the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -factor signal peptide added upstream to Tg-NSORT (N-terminus) to allow the traffic of expressed protein to the secretory pathway. The expression was under the control of the methanol-inducible promoter AOX1.

## Transformation of *P. pastoris*

Strains transformation was made according to Thermofisher scientific recommendations, which are based on modified protocols previously described (Wu and Letchworth, 2004). All cultures were carried out at 27°C, 300 rpm and centrifugations at 1500xg for 5 minutes. The different strains of *Pichia pastoris* were grown on YPD agar plates for 24 hours. Starter cultures were performed by incubating an isolated colony in 10 ml of YPD medium for 24 hours. Hundred ml of cultures were made from an OD<sub>600</sub> of 0.2 to OD<sub>600</sub> between 1.3 and 1.5. Pellet was recovered, washed twice in cold sterile water and then in ice-cold 1M sorbitol. Cells were permeabilized for 30 minutes at room temperature using a buffer composed of 100 mM lithium acetate, 10 mM DTT, 0.6 M sorbitol and 10 mM Tris-HCl pH 7.5. Three washes were performed with ice-cold 1M sorbitol and electro-competent yeast strains were transferred to 0.2-cm electroporation cuvette and 1  $\mu$ g of linearized recombinant plasmid was added, and kept on ice for 5 minutes. Transfection was performed at 1500 V, 186  $\Omega$  and 25  $\mu$ F using the BTX Electro Cell Manipulator 600. One ml of ice cold YPDS medium was immediately added and the mixture was kept for 2 hours at 27°C without shaking. Ten  $\mu$ l and 100  $\mu$ l were spread on PAD plates and incubated at 27°C for 24-48 hours until formation of colonies. Positive clones were isolated and cultured for protein expression and purification as described below.

## Recombinant Tg-NSORT protein expression

Protein expression was achieved according to the manufacturer's protocol. All incubations were performed at 27°C under 250 rpm shaking. Pilot experiments were first performed to determine the optimal expression conditions. 10 ml of culture were carried out in BMGY for 24 hours in a 250 ml flask. Cultures were centrifuged at 1500 g for 5 minutes at room temperature and the pellet was resuspended in 1 ml of BMMY. Cells were again incubated overnight before starting the inductions. The four different strains have been tested as well as at range of concentrations of 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% and induction times of 6, 24, 48, 72 and 96 hours. At the end of induction periods, all supernatants were recovered by centrifugation for 10 minutes, analyzed by SDS-PAGE and Western blot using the rat anti Tg-NSORT antibodies. *P. pastoris* strain transformed with empty vector served as negative control.

After determining the best conditions for expression, a large-scale production was performed. Briefly, one liter of BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium) culture medium was seeded by 25 ml of the 24-hour pre-culture of positive clones isolated above. When the OD reached between 2 and 6, the culture was centrifuged and the pellet was resuspended in 200 ml BMMY (Buffered Methanol-

complex Medium) induction medium. After one day of incubation, inductions were performed every 24 hours. Supernatants were analyzed by SDS-PAGE and Western blots. We have also isolated Tg-NSORT from 3 liter of cultures.

## Affinity column purification of Tg-NSORT

Two hundred ml of supernatant containing recombinant Tg-NSORT was concentrated to 5 ml using 30-kDa cutoff Millipore centrifugal filters. The concentrated sample was diluted 1:10 with 1X binding buffer (50 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl and 5% glycerol) and then incubated on Nickel-NTA beads for 4 hours at 4°C with 1 mM PMSF and inhibitor cocktail. Three washes were performed with 50 mM Tris.HCl pH 7.5, 1 M NaCl and 5% glycerol buffer and three additional washes were done using 50 mM Tris.HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 5% glycerol. Recombinant Tg-NSORT was eluted twice with 200 mM of imidazole and eluates were concentrated in 1X PBS, 5% glycerol before size exclusion chromatography as described below.

## SDS-PAGE

Sixteen  $\mu$ l of supernatant were mixed with 4  $\mu$ l of 5X Laemmli buffer and heated at 100°C for five minutes. SDS-PAGE was performed in 12% gel under reducing conditions by sample migration at 30 V until its reached running gel then at 70 V and 120 V. Gels were stained with BIO-RAD Coomassie brilliant blue R-250 staining solution. The protein bands of interest were excised and processed for mass spectrometry.

## In-gel digestion of protein and LC-MS/MS analysis

The protein bands corresponding to Tg-NSORT expressed and purified from culture supernatants of *P. pastoris* were washed three times with 120  $\mu$ l solution of 25 mM ammonium bicarbonate (NH<sub>5</sub>CO<sub>3</sub>)/acetonitrile (50/50, v/v) for 10 min. Then, in-gel reduction and alkylation of protein disulfide bonds was performed with 100  $\mu$ l of 10 mM of DTT for 50 min at 50°C 199  $\mu$ l of 50 mM iododacetamid was added and incubated for another 30 min at room temperature. After a washing step with 120  $\mu$ l of 25 mM NH<sub>5</sub>CO<sub>3</sub> and the dehydration step with 100  $\mu$ l acetonitrile for 5 min, an in-gel digestion was performed on each sample with 0.07  $\mu$ g of sequencing grade porcine trypsin (Promega, Madison, WI) for 16 h at 37°C. The peptides were extracted from gel using a mixture of acetonitrile/25 mM of NH<sub>5</sub>CO<sub>3</sub> (v/v) (60/40, v/v) containing 0.1% formic acid. The extracted peptides were then dried with vacuum centrifuge (Uniequip GmbH, Munich, Germany) and resuspended in 10  $\mu$ l of water containing 0.1% formic acid. Aliquots of 3  $\mu$ l from each sample was injected into the Ultimate 3,000 RSLC nano- System (Dionex, Thermo Scientific) connected to a Q-HF orbitrap mass spectrometer using a nano column (Acclaim PepMap RSLC, 15 cm  $\times$  75  $\mu$ m inner diameter, C18, 2  $\mu$ m, 100 Å; Dionex, Sunnyvale, CA). The elution was carried out by applying mixture of solvent A (HPLC grade water with 0.1% formic acid) and solvent B (HPLC grade acetonitrile with 0.1%



formic acid) at the flow rate of 300 nL per min by applying a linear gradient from 2 to 40% solvent B over 38 min. After a washing step for 5 min with 70% solvent B, an equilibration step for 11 min with 2% solvent B were done. For ionization, a nanospray Flex Ion Source was used with a voltage set at 1.9 kV, and a capillary temperature at 275 °C. Full MS scans were acquired in the Orbitrap mass analyzer over an  $m/z$  range of 300–3,500 and a resolution of 70,000 at  $m/z$  200. The target automatic gain control value of  $1 \times 10^6$  was used with a maximum allowed injection time (Maximum IT) of 250 ms. For MS/MS, an isolation window of 2  $m/z$  was utilized. Peptide fragmentation was performed using high-energy collision induced dissociation with a normalized collision energy set at 35. The tandem mass spectra were acquired over  $m/z$  200–2,000 range at a resolution of 35,000 at  $m/z$  200 and an automatic gain control of  $2 \times 10^5$ . The ion intensity selection threshold was  $6.7 \times 10^4$ , and the maximum injection time was 150 ms. All these systems were fully controlled by Thermo Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific). All data files (\*.raw) collected were processed with a specific workflow designed in Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific). MS/MS data was interpreted using two search engine Mascot (version 2.4.1, Matrix Science, London, UK) and Sequest HT (Thermo Fisher Scientific). Searches were performed against *T. gondii* (TGVEG, TGME49 and TGGT1 strains) protein sequences downloaded from [www.toxodb.org](http://www.toxodb.org). The Mascot ion score were >20 and Sequest HT XCorr >1.5. The decoy database search allowed us to control and to estimate the false positive identification rate.

## Western blots

After SDS-PAGE, proteins were transferred on nitrocellulose membrane at 80 V for 1 hour. Membranes were blocked for 30 minutes at room temperature in 5% skim milk prepared in TNT (15 mM Tris-HCl pH8, 140 mM NaCl, 0.05% Tween-20). Incubation with antibodies was done for 1 hour at room temperatures with 10 minutes washes for three times with TNT. Blotting membranes were developed with standard chemiluminescent solution (GE healthcare) and scanned using Vilber fusion FX 6.0 apparatus (France).

## Size-exclusion chromatography of Tg-NSORT

Size-Exclusion Chromatography (SEC) using a 24 ml Superose 6 Increase 10/300 GL column in a buffer composed of 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA, was used to purify the concentrated eluate of Tg-NSORT. A single peak corresponding to Tg-NSORT was observed at 17.5 ml by monitoring elution at 280 nm.

## Negative staining of TgN-SORT

Samples were analyzed by conventional electron microscopy using the negative staining method. Three  $\mu$ L suspension ( $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were deposited on an airglow-discharged carbon-coated grid. Excess liquid was blotted, and the grid rinsed with 2% w/v aqueous uranyl acetate. The grids were visualized at 100 kV with a TECNAI

Spirit (FEI) transmission electron microscope (ThermoFisher, New York NY, USA) equipped with a K2 Base 4k  $\times$  4k camera (Gatan, Pleasanton CA, USA). Final magnification was at 34,500 x, corresponding to a pixel size at the level of the specimen of 0.14 nm. Data were recorded under low-dose conditions (dose rate  $20 \text{ e} \text{ \AA}^{-2}$ ).

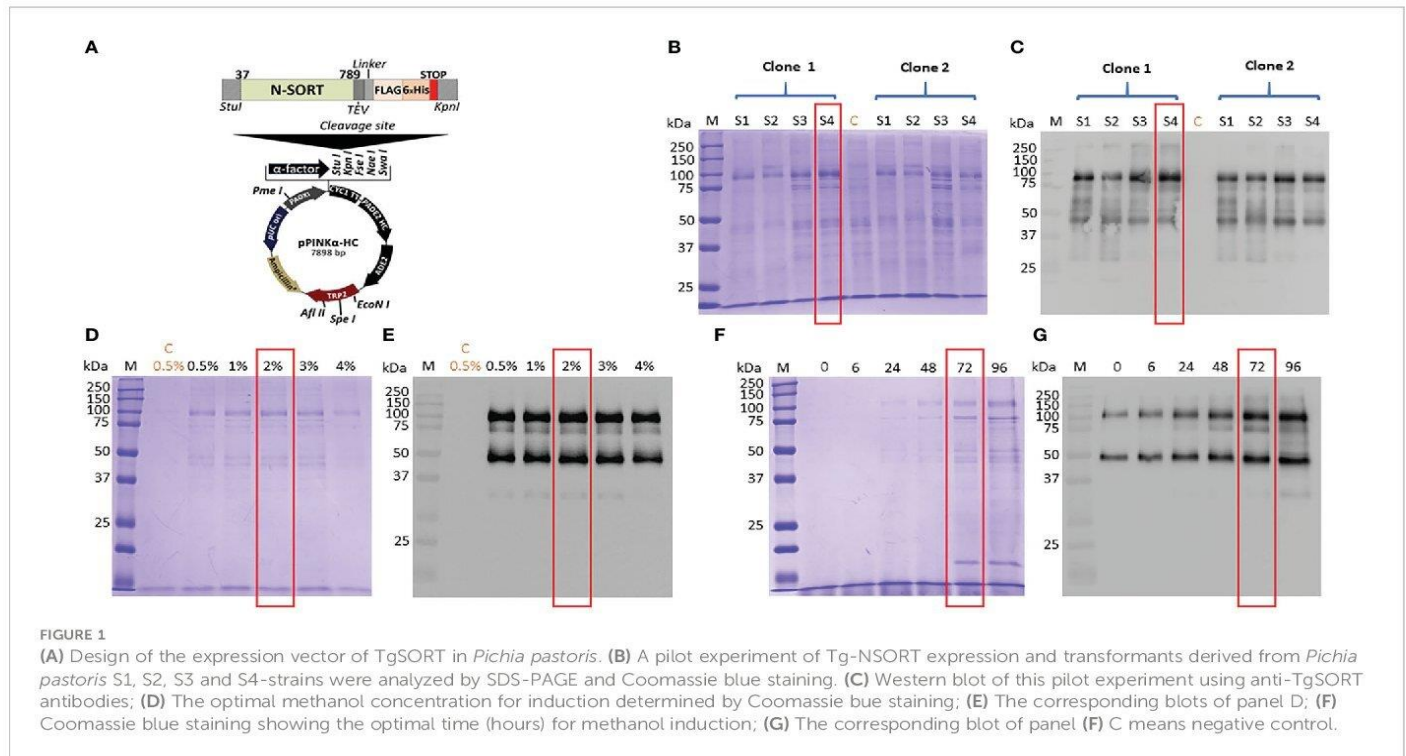
## Results

### Optimizing conditions for Tg-NSORT expression

We have used four distinct yeast *Pichia pastoris*, which were mutants lacking respectively either one gene coding a first protease, a second protease or a double mutant lacking both proteases and wild type strains. The use of these mutants allows us to minimize the rate of degradation of the recombinant protein expressed in the yeast and to achieve an optimal expression in one of these four *P. pastoris* strains. **Figure 1A** depicted the plasmid that contains the coding DNA sequence of Tg-NSORT tagged to FLAG and 6XHis epitopes and used to transform these yeasts. Transformation of these *P. pastoris* strains resulted in good integration of the plasmids into the genome. Two positive colonies of each strain were shown to express a protein migrating at about 100 kDa band that corresponds to the expected size of Tg-NSORT (**Figure 1B**). However, different amounts of the 100-kDa protein were observed after Coomassie blue staining plus few additional smaller bands with one predominant band around 50 kDa (**Figure 1B**). We showed that the specific anti-TgSORT antibodies recognized this 50-kDa protein, suggesting it as a proteolytic cleavage product of the apparently intact and much stronger TgN-SORT band of 100-kDa size (**Figure 1C**). Based on the level and intactness of TgN-SORT, we selected clone 1 of *Pichia pastoris* mutant strain 4 for our studies (**Figures 1B, C**, see the red box). Using this Tg-NSORT clone 1, we established that the same level of the 100-kDa band was expressed regardless of the methanol concentrations, except that a slight decreased in intensity was observed at 4% methanol (**Figures 1D, E**). In addition, the amount of TgN-SORT produced in this clone also increased with time (**Figures 1F, G**). For our purposes, we picked out 2% of methanol induction for 72 hours as the optimal conditions at 27°C under constant shaking for efficient expression of Tg-NSORT in *Pichia pastoris*.

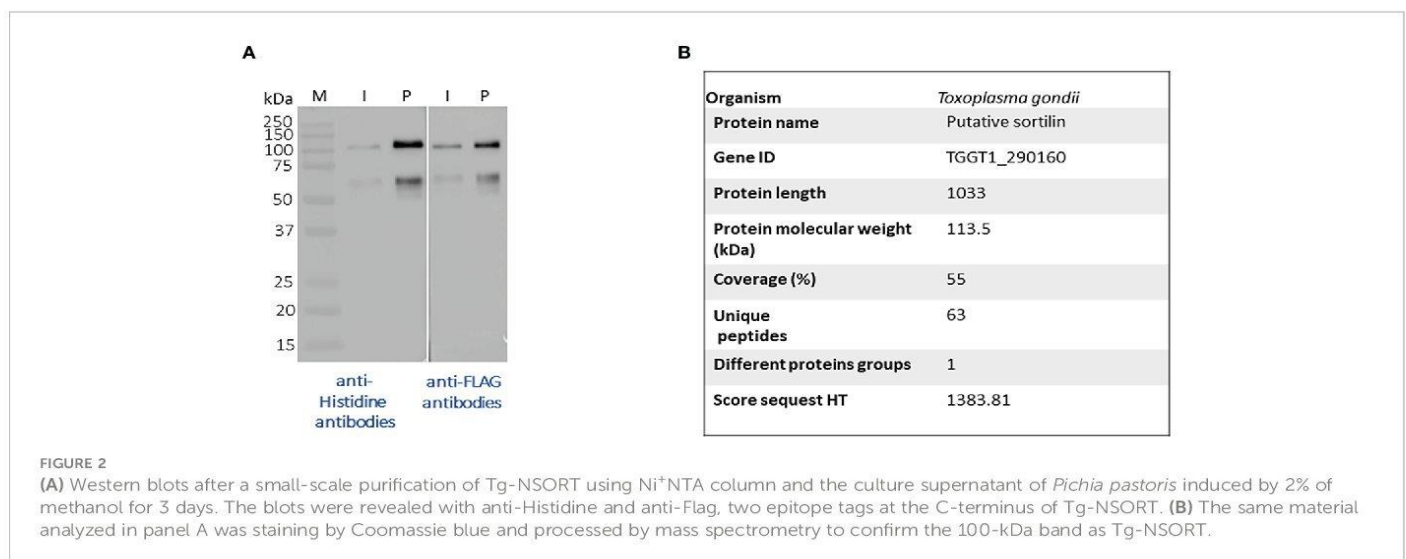
### Purification of secreted Tg-NSORT from *Pichia pastoris*

After, a small-scale purification of Tg-NSORT using Ni-NTA resin, we checked that the 100 kDa and 50 kDa bands were recognized by Western blots using anti-His and anti-Flag antibodies corresponding to the two-epitope tags placed at the C-terminus of Tg-NSORT (**Figure 2A**). The same bands stained by Coomassie blue after polyacrylamide gel electrophoresis were excised and processed for LC-MS/MS analysis. Sixty-three peptides covering 55% of the length of TgSORT were identified in the 100-kDa protein, indicating it is a genuine ectodomain of Tg-NSORT expressed and secreted from

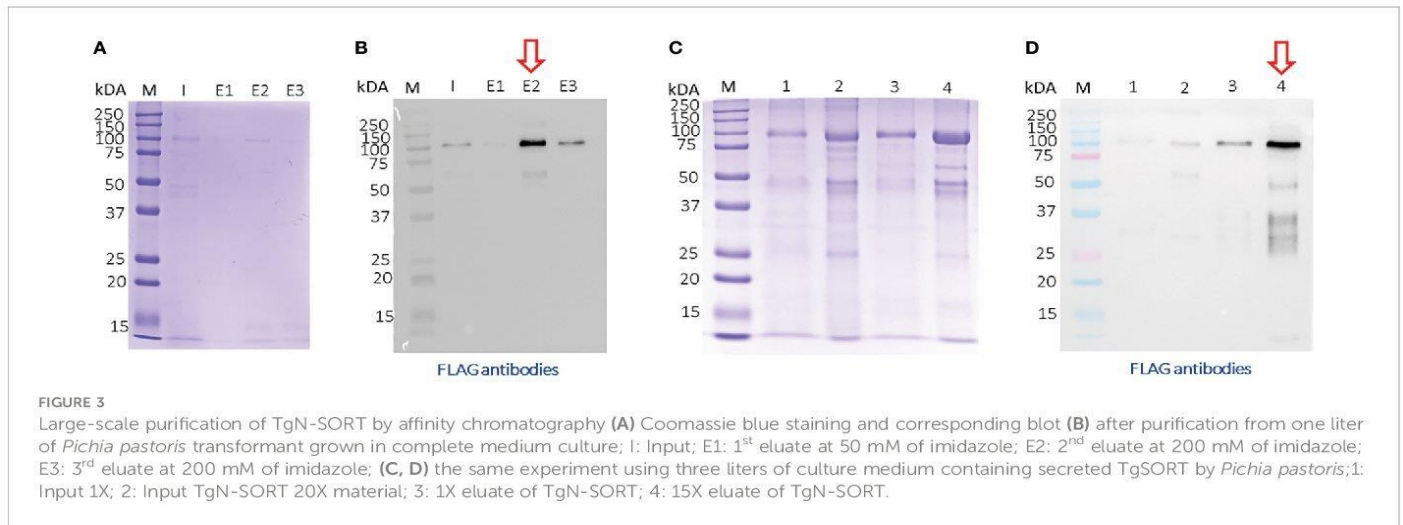


*P. pastoris* (Figure 2B). The nature of these peptides is described in Table 1, which also shows the sequence of 46 peptides detected by mass spectrometry in the 50-kDa region, suggesting it as a fragment product of Tg-NSORT. Altogether, these data demonstrate that Tg-NSORT was expressed and secreted by *P. pastoris*. After this verification, we embarked on a large-scale production and purification of Tg-NSORT. Figure 3 shows the quality of Tg-NSORT secreted by *P. pastoris* in one liter of culture medium, which was used to purify the protein by Ni<sup>+</sup>-NTA beads (Figures 3A, B). The highest amount of protein was obtained after 200 mM of imidazole elution (see E2) and this yielded to 0.5 mg of total Tg-NSORT protein with fewer degradation (Figures 3A, B). The

increase of the volume of *P. pastoris* culture to three liters resulted in a higher quantity of protein that reached 2 mg of purified protein (Figures 3C, D). Next, we decided to improve the purity of Tg-NSORT by removing the smaller degradation products seen in Figure 3 by size exclusion chromatography. In these gel filtration conditions, Tg-NSORT was eluted at 17.5 ml, which corresponds to a molecular mass between 44 and 158 kDa on this column (Figure 4A). SDS-PAGE revealed Tg-NSORT at about 100 kDa, but the proteolytic cleavage product of 50 kDa was still present after size exclusion chromatography, suggesting that may bind to the 100 kDa protein (Figure 4B). It is known that sortilins can dimerize and it is possible that this 50 kDa may strongly interact with the full-length







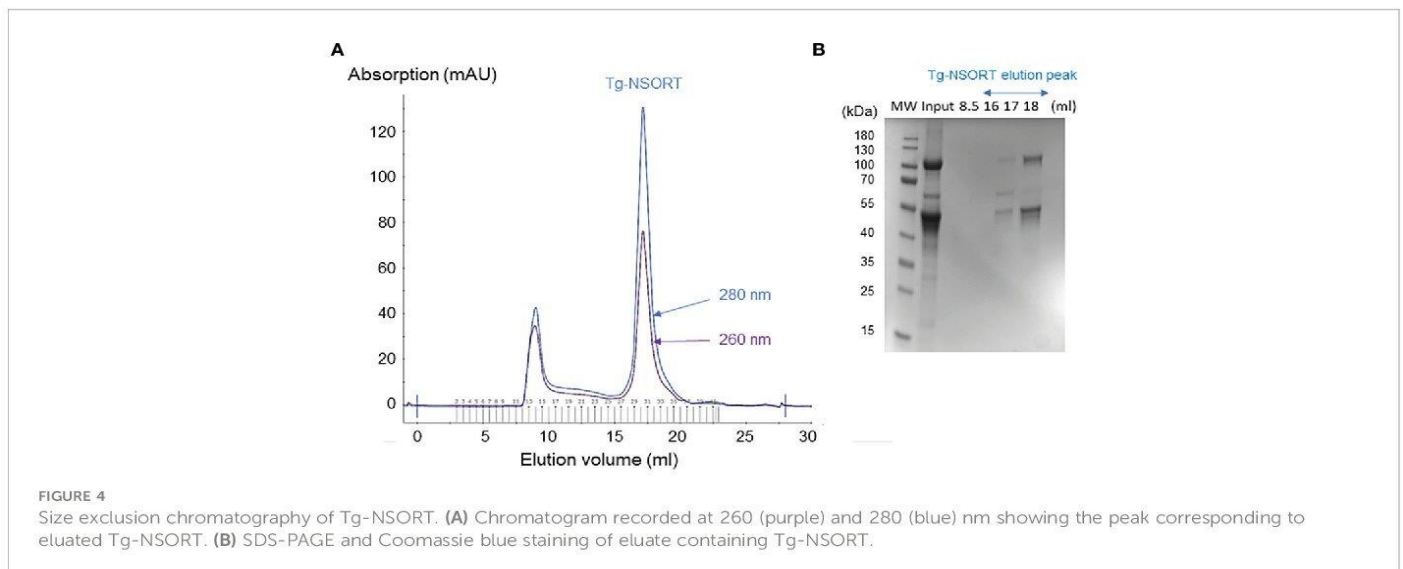
ectodomain of 100 kDa, therefore it cannot be removed by size exclusion chromatography.

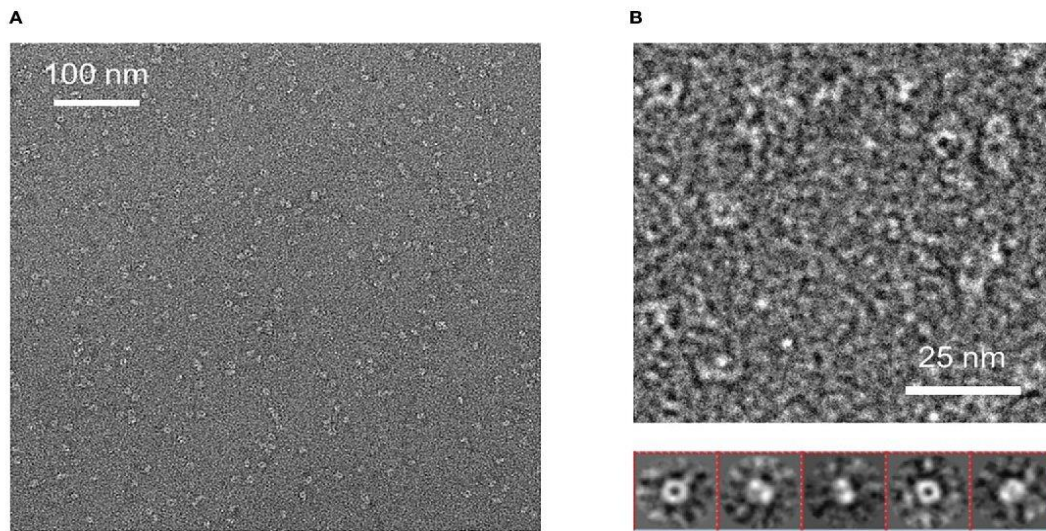
### Negative staining electron microscopy

We diluted the purified material from size chromatography down to 0.05 mg/ml concentration to analyze it by conventional Electron Microscopy (EM) using the negative staining method. We obtained EM micrographs showing homogeneous and well-dispersed particles, suggesting that a protein having a single conformation was present in our gel filtration samples (Figure 5A). Analysis of these micrographs revealed a ring-shaped protein structure with a diameter of about 8 nm that resembles that previously shown for human sortilin (Figure 5B). However, further attempts to crystallize Tg-NSORT or to analyze it by cryo-electron microscopy failed. Therefore, we used the recent AlphaFold2 program (Jumper et al., 2021) to calculate a model of Tg-NSORT.

### AlphaFold analyses

We provided as an input for AlphaFold2 the sequence of Tg-NSORT. Using this recent program, we obtained a three-dimensional model of Tg-NSORT (Figure 6A), and in particular of the four parasite's specific peptide insertions, which are organized as loops within TgNSORT (Figures 6A, C). We also attempted to model the 3D structure of Tg-NSORT bound to its partners. AlphaFold2 predicted with a reasonable significant score (IDDT values for the residues of the disordered binding partners larger than 0.7) that Tg-NSORT interacts with different ROP proteins (ROP1, ROP5, ROP16) through specific motifs located in intrinsically disordered regions (IDRs) of ROPs proteins (see the model of Tg-NSORT bound to ROP1 in Figure 7A). The motif PPNAQELLPP of this IDR binds to the tunnel formed by the ten  $\beta$ -propeller domains of TgN-SORT. These motifs are found in the pro-peptide of the N-terminus of all ROP proteins. They all bind to the same site in Tg-NSORT within the inner tunnel of the protein. Such binding mode was already observed for neurotensin binding to human sortilin (Figure 7B; Quistgaard et al., 2009).



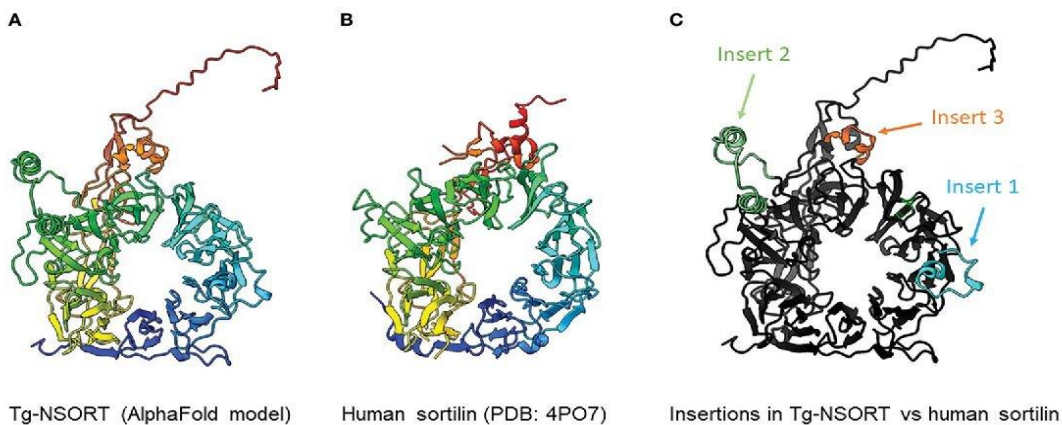


**FIGURE 5** (A) Negative staining electron micrograph of Tg-NSORT purified by gel filtration. (B) Zoom on a micrograph and 2D classification of the particles picked on the micrographs.

## Discussion

*Pichia pastoris* system has a good record of accomplishment in expressing proteins from both prokaryotes and eukaryotes for the most part difficult to express in *E. coli*. Human Coagulation Factor XIIIa, which was insoluble after its complicated expression in *E. coli* (Nikolajsen et al., 2014) was successfully produced by Chang et al., (2011) using *P. pastoris*. As used in the present study, these authors also employed the methanol inducible AOX1 promoter to efficiently express the protein for which they evaluated different biological activities (Cheng et al., 2021). The same AOX1 promoter controls the expression of the human camel chymosin in *P. pastoris* (Wang et al., 2015). Proteins expression in *P. pastoris* depends on different parameters including pH of the culture medium, inducing agent and

temperature. As for human coagulation factor XIIIa, the ectodomain of *T. gondii* TgSORT composed of the ten  $\beta$ -propeller and double 10 C-C bound domains is insoluble because it is completely directed into inclusion bodies when expressed in *E. coli*. Now, we have been quite successful in expressing the ectodomain of TgSORT, which is transported through the secretory pathway and can be recovered in the culture supernatant as several milligrams of proteins using *P. pastoris*. As this yeast is a eukaryotic model system; we assume that the parasite TgSORT will be well folded in addition to some post-translational modifications that may be necessary for future functional investigations. It should be noticed that, for example, *T. gondii* ROP2 protein has been already expressed in *P. pastoris* and the protein has been used for diagnosis (Chang et al., 2011). However, the level of ROP2 in *P. pastoris* appears weaker than what we have



**FIGURE 6** (A) 3D model of Tg-NSORT calculated using AlphaFold2. (B) Crystal structure of human sortilin. (C) Representation of the Tg-NSORT model, with the insertions specific to *Apicomplexa* colored in cyan (insert or loop 1), green (insert or loop 2) and orange (insert or loop 3). In panels (A) and (B), proteins are colored from blue (N-terminus) to red (C-terminus).



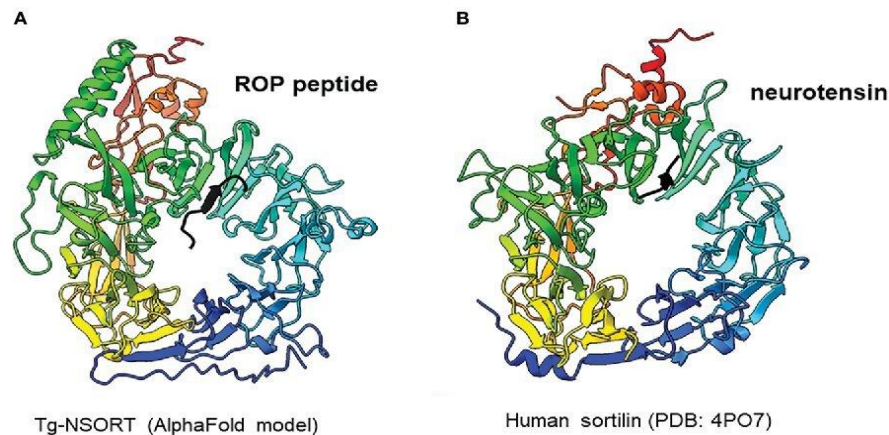


FIGURE 7

(A) Interaction between Tg-NSORT (from blue to red) and the intrinsically disordered region (IDR) of ROP1 (in black), as determined by AlphaFold2. The motif PPNAQELLPP of this IDR binds to the tunnel formed by the ten  $\beta$ -propeller domains of sortilin. (B) Interaction between human sortilin and the neurotensin peptide, as observed in the crystal structure referenced as 4PO7 in the PDB.

achieved in this study. After 72 hours of induction with 2% of methanol, we were able to obtain several milligrams of pure recombinant TgSORT. It is known that the experimental conditions are important for protein expression in this yeast. Unlike Cheng et al. (2021) who achieved expression of human coagulation factor XIIIa at 30°C with 1% methanol every 24h for 120h, Wang et al. (2015) induced expression of camel chymosin at pH 4.07 and even at lower temperature of 28°C after 8h. After evaluation of the different parameters, expression of human serum albumin was performed at 28°C for 24 hours in an acidic pH of 5.75 and the methanol concentration was set between 0.5 and 2% and for every 2 hours (Lau et al., 2012). In addition, of these conditions defined for human proteins expression in *P. pastoris*, other *T. gondii* proteins whose expression was difficult in *E. coli* were also produced in this yeast. TgGRA2 was expressed in *P. pastoris* at 28°C for 5 days under 0.5% final methanol every 24 hours (Zhou et al., 2007; Thiruvengadam et al., 2011; Lau et al., 2010a). GRA4 was also expressed under the same conditions but for 3 days (Lau et al., 2010b). In addition to these *T. gondii* cytosolic proteins, membrane proteins such as SAG1 and SAG2 were also expressed in *P. pastoris* at 30°C for 4 days under continuous 24 hours of induction using 0.5-1% methanol concentrations (Zhou et al., 2007; Lau and Fong, 2008; Thiruvengadam et al., 2011; Lau et al., 2010a). Methanol concentration generally varies between 0.5% and 2% and even very low amount can stimulate induction in a short time of culture as it represents an important source of carbon for the yeast. Its continuous addition in the culture favors a good yield of protein expression. We also noticed that even a minimal expression environment could be achieved if good aeration conditions of the cultures were established. Using *P. pastoris*, we obtained enough quantity of purified TgNSORT that was analyzed by negative-staining electron microscopy. The purified protein was homogenous, and we observed ring-shaped particles with a diameter of about 8 nm, reminiscent of the crystal structure of human sortilin (Figure 5B;

Figures 6A, B) (Quistgaard et al., 2009). We were to obtain a higher atomic resolution structure of the luminal domain of TgNSORT. However, we were not able to obtain crystals of this parasite protein domain. Alternatively, we used the AlphaFold program for predicting the structure of TgNSORT. We observed that the resulting model exhibits a very large and poorly structured insertion when compared to human sortilin (insert 2; see Figure 6C). We concluded that the presence of this parasite's specific loop hinders crystallization of TgNSORT. Our analysis also revealed the possible molecular bases of the interactions between TgSORT and ROP proteins. It indicated that the pro-peptide domain of ROP could bind to the tunnel of TgSORT in a manner similar to neurotensin with human sortilin. The specific motifs of ROP proteins are located in some intrinsically disordered regions (IDR) with all IDR tested binding to the same site of TgSORT. These IDR corresponds to the pro-peptide situated at the N-terminus of all ROP proteins, and it is normally cleaved off during the maturation of ROP proteins before they reached their destination (Bradley and Boothroyd, 1999; Bradley and Boothroyd, 2001; Hajagos et al., 2012).

In conclusion, *Pichia pastoris* represents a good organism for *T. gondii* protein expression. This expression system combines the advantages of prokaryotic system with those of eukaryotic model for use of minimal and inexpensive culture medium, fast and high growth rate, high productivity, extracellular expression, folding and post-translational modifications (Karbalei et al., 2020). Large-scale production in improved conditions can lead to high amounts of well-folded proteins that can be used for various applications. Collectively, our data provides the foundation of future and deeper structure-function studies of TgSORT, the key receptor required for host infection of apicomplexan parasites. The expression of large amount of soluble ectodomain of TgSORT provides an avenue for conducting detailed mechanistic studies with biochemical and chemical approaches to identify new and parasite-specific inhibitors.



## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Author contributions

The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: SZ-J and ST. Performed the experiments: AH, RG, TA, A-AA, MO, and SZ-J. Contributed reagents/materials/analysis tools: SZ-J, YH, and ST. Performed data analysis: AH, CA, LF, and SZ-J. Wrote the paper: AH, SZ-J, and ST. YH provided mass spectrometry access and revised the proteomics data and the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

Financial support for this work was provided by the Agence Nationale de la Recherche grants N°ANR-19-CE44-0006. AH was supported by the International Campus France and African UEMOA fellowships. This work benefited from the CryoEM platform of I2BC, supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) [ANR-10-INSB-05-05].

## References

- Boothroyd, J. C., and Dubremetz, J.-F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 79–88. doi: 10.1038/nrmicro1800
- Bradley, P. J., and Boothroyd, J. C. (1999). Identification of the pro-mature processing site of *Toxoplasma* ROP1 by mass spectrometry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100, 103–109. doi: 10.1016/S0166-6851(99)00035-3
- Bradley, P. J., and Boothroyd, J. C. (2001). The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal. *Intern. J. Parasitol.* 31, 1177–1186. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00242-9
- Brydges, S. D., Sherman, G. D., Nockemann, S., Loyens, A., Däubener, W., Dubremetz, J.-F., et al. (2000). Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 51–66. doi: 10.1016/S0166-6851(00)00296-6
- Brydges, S. D., Zhou, X. W., Huynh, M.-H., Harper, J. M., Mital, J., Adjogble, K. D. Z., et al. (2006). Targeted deletion of MIC5 enhances trimming proteolysis of *Toxoplasma* invasion proteins. *Eukaryot Cell* 5, 2174–2183. doi: 10.1128/EC.00163-06
- Butcher, B. A., Fox, B. A., Rommereim, L. M., Kim, S. G., Maurer, K. J., Yarovinsky, F., et al. (2011). *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS Pathog.* 7, e1002236. doi: 10.1371/journal.ppat.1002236
- Chang, P. Y., Fong, M. Y., Nissapatorn, V., and Lau, Y. L. (2011). Evaluation of *Pichia pastoris*-expressed recombinant rhoptry protein 2 of *Toxoplasma gondii* for its application in diagnosis of toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 485–489. doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0351
- Cheng, L., Zhang, T., Fei, Y., Shen, H., Huang, H., Chen, J., et al. (2021). Expression, purification and characterization of recombinant human coagulation factor XIIIa in *pichia pastoris*. *Protein Pept. Lett.* 28, 55–62. doi: 10.2174/0929866527666200625203240
- Clee, S. M., Yandell, B. S., Schueler, K. M., Rabaglia, M. E., Richards, O. C., Raines, S. M., et al. (2006). Positional cloning of Sorcs1, a type 2 diabetes quantitative trait locus. *Nat. Genet.* 38, 688–693. doi: 10.1038/ng1796
- Dubois, D. J., and Soldati-Favre, D. (2019). Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* 21, e13018. doi: 10.1111/cmi.13018
- Fentress, S. J., and Sibley, L. D. (2011). The secreted kinase ROP18 defends *Toxoplasma*'s border. *BioEssays* 33, 693–700. doi: 10.1002/bies.201100054

## Acknowledgments

We thank Dr. P. Legrand (Synchrotron Soleil) for the AlphaFold2 calculations.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

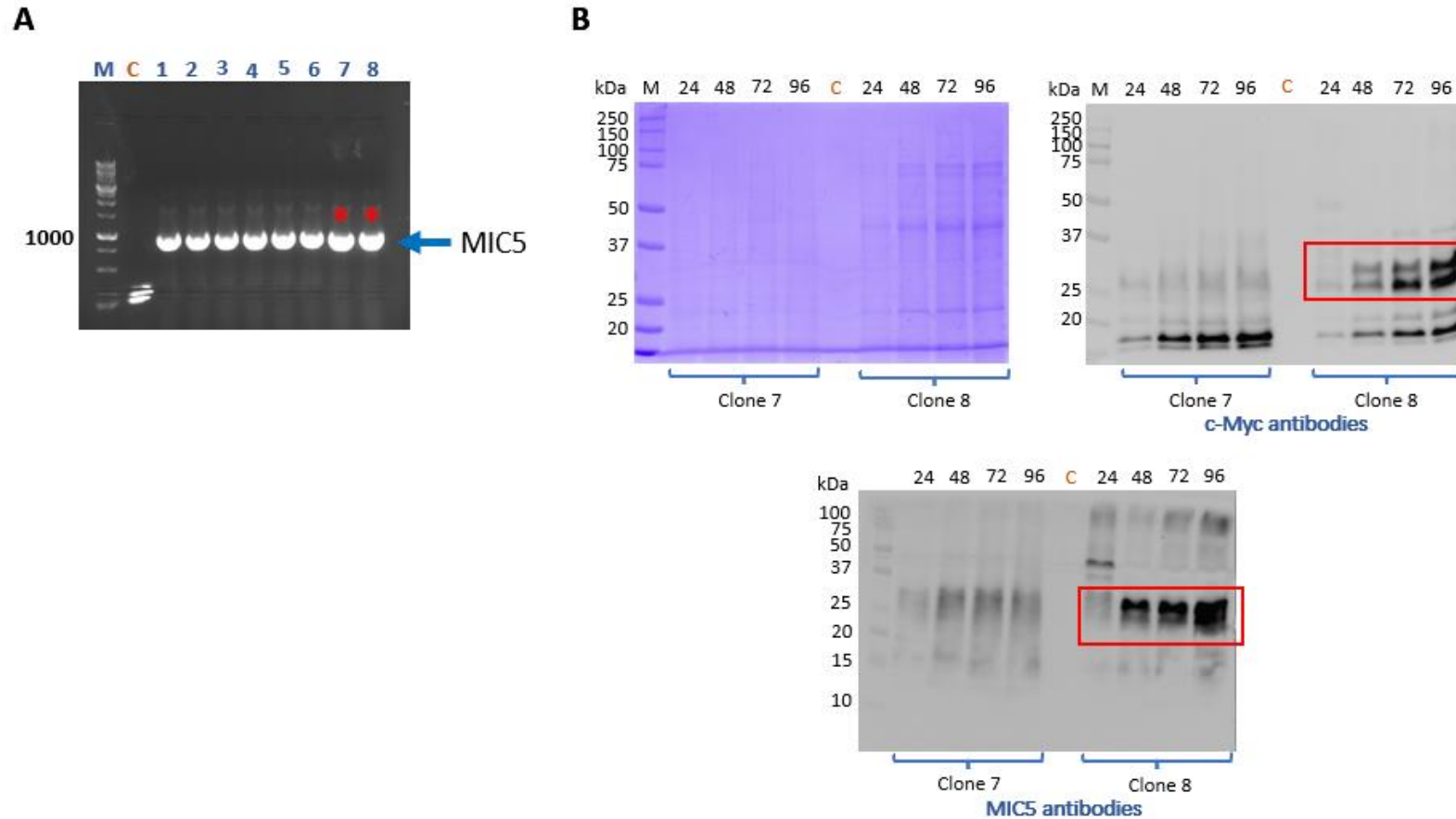
## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpara.2023.1103772/full#supplementary-material>

- Hajagos, B. E., Turetzky, J. M., Peng, E. D., Cheng, S. J., Ryan, C. M., Souda, P., et al. (2012). Molecular dissection of novel trafficking and processing of the *Toxoplasma gondii* rhoptry metalloprotease toxolysin-1. *Traffic* 13, 292–304. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01308
- Hallée, S., Boddey, J. A., Cowman, A. F., and Richard, D. (2018a). Evidence that the plasmodium falciparum protein sortilin potentially acts as an escorter for the trafficking of the rhoptry-associated membrane antigen to the rhoptries. *mSphere* 3, e00551–e00517. doi: 10.1128/mSphere.00551-17
- Hallée, S., Counihan, N. A., Matthews, K., de Koning-Ward, T. F., and Richard, D. (2018b). The malaria parasite plasmodium falciparum sortilin is essential for merozoite formation and apical complex biogenesis. *Cell Microbiol.* 20, e12844.
- Jansen, P., Giehl, K., Nyengaard, J. R., Teng, K., Lioubinski, O., Sjoegaard, S. S., et al. (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat. Neurosci.* 10, 1449–1457. doi: 10.1038/nn2000
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2
- Karbalei, M., Rezaee, S. A., and Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous protein. *J. Cell Physiol.* 235, 5867–5881. doi: 10.1002/jcp.29583
- Kim, T., and Hempstead, B. L. (2009). NRH2 is a trafficking switch to regulate sortilin localization and permit proneurotrophin-induced cell death. *EMBO J.* 28, 1612–1623. doi: 10.1038/emboj.2009.118
- Kim, K., and Weiss, L. M. (2004). *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. *Int. J. Parasitol.* 34, 423–432. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.12.009
- Lau, Y. L., and Fong, M. Y. (2008). *Toxoplasma gondii*: Serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Exp. parasitology.* 119, 373–378. doi: 10.1016/j.exppara.2008.03.016
- Lau, Y. L., Fong, M. Y., Idris, M. M., and Ching, X. T. (2012). Cloning and expression of *toxoplasma gondii* dense granular protein 2 (GRA2) gene by *pichia pastoris*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 43, 10–16.
- Lau, Y. L., Hassan, M. T., Thiruvengadam, G., Idris, M. M., and Init, I. (2010b). Cloning and expression of *toxoplasma gondii* dense granular protein 4 (GRA4) in *pichia pastoris*. *Trop. Biomedicine* 27 (3), 525–533.

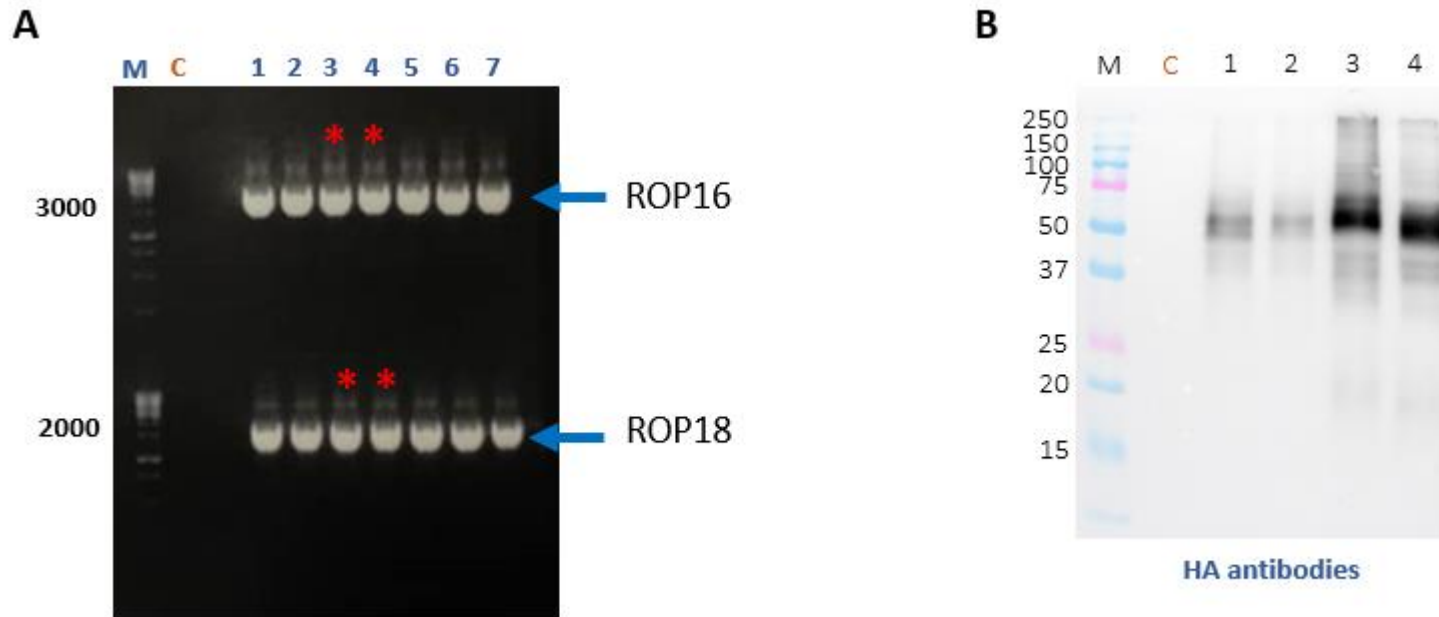
- Lau, Y. L., Init, I., and Fong, M. Y. (2010a). Optimization for high-level expression in *Pichia pastoris* and purification of truncated and full length recombinant SAG2 of *Toxoplasma gondii* for diagnostic use. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 41, 507–513.
- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E., and Emr, S. D. (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase  $\gamma$  is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 77, 579–586. doi: 10.1016/0092-8674(94)90219-4
- Morrisette, N. S., and Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 21–38. doi: 10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002
- Nielsen, M. S., Madsen, P., Christensen, E. L., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., et al. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20, 2180–2190. doi: 10.1093/emboj/20.9.2180
- Nikolajsen, C. L., Dyrlund, T. F., Poulsen, E. T., Enghild, J. J., and Scavenius, C. (2014). Coagulation factor XIIIa substrates in human plasma. *J. Biol. Chem.* 289, 6526–6534. doi: 10.1074/jbc.M113.517904
- Opitz, C., and Soldati, D. (2002). "The glideosome": a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 45, 597–604. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03056.x
- Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots. global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39, 1385–1394. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003
- Quistgaard, E. M., Madsen, P., Groftehaug, M. K., Nissen, P., Petersen, C. M., and Thirup, S. S. (2009). Ligands bind to sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 96–98. doi: 10.1038/nsmb.1543
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 39, 168–177. doi: 10.1038/ng1943
- Sakura, T., Sindikubwabo, F., Oesterlin, L. K., Bousquet, H., Slomianny, C., Hakimi, M.-A., et al. (2016). A critical role for *Toxoplasma gondii* vacuolar protein sorting VpS9 in secretory organelles biogenesis and host infection. *Sci. Rep.* 6, 38842. doi: 10.1038/srep38842
- Sangaré, L. O., Alayi, T. D., Hovasse, A., Westermann, B., Sindikubwabo, F., Callebaut, I., et al. (2016). Unconventional endosome-like compartment and retromer complex in *Toxoplasma gondii* govern parasite integrity and host infection. *Nat. Commun.* 7, 10191. doi: 10.1038/ncomms11191
- Sloves, P.-J., Delhay, S., Mouveaux, T., Werkmeister, E., Slomianny, C., Hovasse, A., et al. (2012). *Toxoplasma* sortilin-like receptor regulates protein transport and is essential for apical secretory organelle biogenesis and host infection. *Cell Host Microbe* 11, 515–527. doi: 10.1016/j.chom.2012.03.006
- Sloves, P.-J., Mouveaux, T., Ait-Yahia, S., Vorng, H., Everaere, L., Sangare, L. O., et al. (2015). Apical organelle secretion by *Toxoplasma* controls innate and adaptive immunity and mediates long-term protection. *J. Infect. Dis.* 212, 1449–1458. doi: 10.1093/infdis/jiv250
- Thiruvengadam, G., Init, I., Fong, M. Y., and Lau, Y. L. (2011). Optimization of the expression of surface antigen SAG1/2 of *Toxoplasma gondii* in the yeast *Pichia pastoris*. *Trop. Biomed.* 28, 506–513.
- Wang, N., Wang, K. Y., Li, G., Guo, W., and Liu, D. (2015). Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 111, 75–81. doi: 10.1016/j.pep.2015.03.012
- Wu, S., and Letchworth, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques* 36, 152–154. doi: 10.2144/04361DD02
- Zhou, H., Gu, Q., Zhao, Q., Zhang, J., Cong, H., Li, Y., et al. (2007). *Toxoplasma gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and SAG2 in *Pichia pastoris*. *Parasitol. Res.* 100, 829–835. doi: 10.1007/s00436-006-0341-6

Nous présentons ci-dessous, les résultats des expériences pilotes d'expression des protéines MIC5 (Figure 18), ROP16 et ROP18 (Figure 19).



**Figure 18:** Expériences pilotes d'expression de MIC5 (23kDa)

C = contrôle négatif ; (A) PCR d'intégration de MIC5- pPINK $\alpha$ HC, les clones 7 et 8 ont été sélectionnés et cultivés ; (B) Clones 7 et 8 exprimant MIC5 ; l'induction a été effectuée pendant 4 jours



**Figure 19:** Expériences pilotes d'expression de ROP16 et ROP18

C=contrôle négatif ; (A) PCR d'intégration des plasmides, les clones 3 et 4 ont été sélectionnés et cultivés ; (B) Clones 3 et 4 exprimant ROP16 et ROP18



## II) Evaluation des activités anti-toxoplasmique et anti-paludique de composés

Afin de mieux comprendre le fonctionnement de *TgSORT*, l'équipe a entrepris d'effectuer une étude faisant intervenir le criblage d'une banque de composés sur une souche transgénique de *T. gondii*. La première étape a consisté à créer le parasite transgénique dont le gène *TgSORT* était tagué GFP par complémentation et disruption du gène *UPRTet* le gène *ROP1* mCherry par knock-in. Par la suite, une librairie de 1121 composés a été criblée de manière automatique par microscopie à fluorescence sur cette souche transgénique. La mort parasitaire sous l'effet des drogues se traduisait par la présence d'un signal jaune correspondant à un mélange des signaux vert et rouge dans les puits. Ce screening a permis de retenir 12 drogues (inhibiteurs de kinase, de P38 MAP kinase, de pompe calcique et de prostaglandine) qui ont été testées en premier lieu sur une souche de *T. gondii* RH $\beta$ Gal. Cette souche transgénique contenait le gène *LacZ* d'*E. coli* en tant que gène rapporteur pour indiquer la survie des parasites par dosage au spectrophotomètre. Des mélanges de 3 drogues ont également été testés. Les activités de huit de ces inhibiteurs ont été par la suite vérifiées par cytométrie en flux sur des parasites au stade ring de la souche de référence *P. falciparum* 3D7. Chacune des concentrations a été testée en quadruple et l'expérience a été reprise 3 fois. Les pourcentages de croissance parasitaire en fonction des logarithmes des différentes concentrations testées ont été présentés. Les analyses statistiques ont révélé une différence hautement significative entre la croissance parasitaire en absence et en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs ( $p < 0.0001$ ). Ce qui traduit un effet des drogues sur les différents parasites. Par ailleurs, la croissance parasitaire variait de manière hautement significative selon le type d'inhibiteur testé ( $p < 0.0001$ ).

Ces travaux ont donné lieu à la publication d'un article dans *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.





## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Dave Richard,  
Laval University, Canada

## REVIEWED BY

Zhicheng Dou,  
Clemson University, United States  
Joseph Stone Doggett,  
Oregon Health and Science University,  
United States  
Andrew Hemphill,  
University of Bern, Switzerland  
Paul H. Davis,  
University of Nebraska Omaha,  
United States

## \*CORRESPONDENCE

Stanislas Tomavo

✉ stanislas.tomavo@i2bc.paris-saclay.fr

<sup>†</sup>These authors share senior authorship

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Parasite and Host,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and  
Infection Microbiology

RECEIVED 19 November 2022

ACCEPTED 10 February 2023

PUBLISHED 03 March 2023

## CITATION

Honfozo A, Houngue R, Vandeputte A,  
Dechavanne S, Nouatin O, Atindehou MC,  
Fanou LA, Massougbdji A, Dechavanne C,  
Brodin P and Tomavo S (2023) An image-  
based high-content screening for  
compounds targeting *Toxoplasma gondii*  
repurposed inhibitors effective against the  
malaria parasite *Plasmodium falciparum*.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13:1102551.  
doi: 10.3389/fcimb.2023.1102551

## COPYRIGHT

© 2023 Honfozo, Houngue, Vandeputte,  
Dechavanne, Nouatin, Atindehou, Fanou,  
Massougbdji, Dechavanne, Brodin and  
Tomavo. This is an open-access article  
distributed under the terms of the [Creative  
Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The  
use, distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original publication in  
this journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# An image-based high-content screening for compounds targeting *Toxoplasma gondii* repurposed inhibitors effective against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*

Ariane Honfozo<sup>1</sup>, Rodrigue Houngue<sup>1</sup>, Alexandre Vandeputte<sup>2</sup>,  
Sébastien Dechavanne<sup>3,4</sup>, Odilon Nouatin<sup>5</sup>,  
Ménonvè Cynthia Atindehou<sup>6</sup>, Lucie Ayi Fanou<sup>6</sup>,  
Achille Massougbdji<sup>5</sup>, Célia Dechavanne<sup>3,4</sup>,  
Priscille Brodin<sup>2†</sup> and Stanislas Tomavo<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Saclay, CNRS UMR 9198-CEA, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif sur Yvette, France, <sup>2</sup>Université de Lille, CNRS UMR 9017, INSERM U 1019, Institut Pasteur de Lille, US 41 – UAR 2014 – PLBS, CIIL – Center for Immunity and Infection of Lille, Lille, France, <sup>3</sup>Université de Paris Cité, IRD, MERIT, Paris, France, <sup>4</sup>CERPAGE, Cotonou, Benin, <sup>5</sup>Institut de Recherche Clinique du Bénin, Abomey-Calavi, Benin, <sup>6</sup>Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, FAST/UAC, Cotonou, Benin

*Apicomplexa* phylum includes numerous obligate intracellular protozoan parasites that are life threatening for humans and animals. In this context, *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* are of particular interest, as they are responsible for malaria and toxoplasmosis, respectively, for which efficient vaccines are presently lacking and therapies need to be improved. Apicomplexan parasites have a highly polarized morphology, with their apical end containing specific secretory organelles named rhoptries and micronemes, which depend on the unique receptor and transporter sortilin TgSORT for their biogenesis. In the present study, we took advantage of the subcellular polarity of the parasite to engineer a clonal transgenic *Toxoplasma* line that expresses simultaneously the green fluorescent protein TgSORT-GFP in the post-Golgi-endosome-like compartment and the red fluorescent protein rhoptry ROP1-mCherry near the apical end. We utilized this fluorescent transgenic *T. gondii* to develop a miniaturized image-based phenotype assay coupled to an automated image analysis. By applying this methodology to 1,120 compounds, we identified 12 that are capable of disrupting the *T. gondii* morphology and inhibiting intracellular replication. Analysis of the selected compounds confirmed that all

12 are kinase inhibitors and intramembrane pumps, with some exhibiting potent activity against *Plasmodium falciparum*. Our findings highlight the advantage of comparative and targeted phenotypic analysis involving two related parasite species as a means of identifying molecules with a conserved mode of action.

#### KEYWORDS

*Toxoplasma gondii*, TgSORT-GFP, ROP1-mCherry, image-based analysis, high-content screening, repurposing drugs, malaria parasite

## Introduction

The phylum *Apicomplexa* includes about 5,000 intracellular protozoan parasites that infect humans and animals, such as *Plasmodium falciparum* (the causative agent of human malaria), *Toxoplasma gondii* (an important opportunistic pathogen associated with AIDS and congenital birth defects. This phylum also contains harmful infections in animals, *Eimeria* (a causative agent of deadly coccidiosis in poultry) and *Cryptosporidium* (an opportunistic intestinal pathogen causing severe diarrhea). Malaria is an ancient vector-borne infectious disease primarily occurring in developing countries that is responsible for about 600,000 deaths per year, most of which occur in children (WHO, 2021). On the other hand, toxoplasmosis is less deadly, but *in utero* exposure can lead to devastating outcomes, including congenital malformations such as blindness, lack of normal development of intellectual capacities and hydrocephaly in newborns. In addition, in HIV-positive individuals, it causes severe opportunistic infections, which is of major public health concern as it results in physical and psychological disabilities (Montoya and Liesenfeld, 2004; Halonen and Weiss, 2013; Milne et al., 2020).

Toxoplasmosis is presently treated with a combination of drugs, such as pyrimethamine and sulfadiazine, and the affected individuals are typically prescribed folinic acid to prevent suppression of bone marrow formation *via* pyrimethamine (Hill and Dubey, 2002). However, these drugs have severe side effects, such as neutropenia, leucopenia, severe reduction in platelet count, and hypersensitivity (Porter and Sande, 1992; Rajapakse et al., 2013). Therefore, clindamycin may be used as an alternative. When patients are unable to tolerate either sulfonamides or clindamycin, atovaquone can be prescribed (Dunay et al., 2018), whereas spiramycin is recommended for pregnant women due to its bioavailability in the placenta. In seropositive AIDS patients, trimethoprim in combination with sulfamethoxazole has been shown to prevent cerebral toxoplasmosis. Nonetheless, most of these drugs are poorly tolerated and their long-term use results in cytotoxicity, or fails to deliver expected outcomes. Likewise, malaria is currently treated *via* an artemisinin-based combination therapy, which is increasingly ineffective as a result of the growing resistance of the malaria parasite *P. falciparum* to the available drugs (Balikagala et al., 2021).

*Apicomplexa* are complex single-celled eukaryotes containing classical nucleus, mitochondrion, endoplasmic reticulum and Golgi, as well as specific secretory organelles—rhoptries and micronemes

—that are located at the apical end of the parasites, whose contents are required for host cell attachment, invasion and virulence. Extant research indicates that many rhoptry proteins are kinases or pseudokinases capable of defining virulence factors that can be secreted in different compartments of the infected host cells, including the nucleus. For example, ROP16 can phosphorylate STAT3/6 and thus control the transcription level of numerous genes involved in the host's immune response (Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006; Saeij et al., 2007; Yamamoto et al., 2009; Ong et al., 2010; Butcher et al., 2011). In contrast, the microneme MIC proteins are defined as attachment factors required by the parasite to recognize the receptors on the host cell surface during entry (Huynh et al., 2003; Huynh and Carruthers, 2006). In addition, ROP and MIC proteins can act synergistically to form the moving junction necessary for the host cell invasion (Alexander et al., 2005; Lamarque et al., 2011). Available evidence further indicates that apicomplexan parasites, including *T. gondii*, are 10  $\mu\text{m}$  long eukaryotic organisms with a highly polarized secretory pathway. Several authors have also noted that proteins and probably lipids destined for the apical secretory organelles (i.e., rhoptries and micronemes) are synthesized in the ER and move to the Golgi apparatus before reaching the post-Golgi and endosomal-like compartment (Pelletier et al., 2002; He, 2007; Tomavo et al., 2013). ROP and MIC proteins are also synthesized as pro-proteins that are cleaved at the N-terminus during maturation, leading to properly folded and functionally active proteins (Bradley and Boothroyd, 2001; Harper et al., 2006; Brydges et al., 2008). In our earlier work, we demonstrated that the transport and maturation of ROP and MIC proteins required the presence of an essential sortilin homologue, which we denoted as *T. gondii* sortilin-like receptor (TgSORT) (Sloves et al., 2012). In addition, we showed that the rhoptry and microneme biogenesis depends on TgSORT. These findings were subsequently confirmed by Sangaré et al. (2016) who reported that the luminal domain of the receptor binds rhoptry and microneme proteins, while the cytosolic tail recruits partners to enable anterograde and retrograde receptor transport. This evidence indicates that TgSORT is a key receptor for the biogenesis of secretory organelles in *T. gondii* as well as *P. falciparum*, and its homologue PfSortilin in malaria was later found to control transport of proteins to form rhoptries (Hallée et al., 2018a, 2018b). Because the homologues of TgSortilin are present in all apicomplexan parasites whose genome has been sequenced (VEuPathDB), we hypothesize that this receptor is a key factor



that allows apicomplexan parasites to build the complex apical structure composed of a functional conoid containing rhoptries and micronemes. We further posit that protein trafficking is a critical parameter in parasite multiplication and dissemination. Therefore, identifying molecules that target this process could enrich the therapeutic arsenal. In the present study, we exploit the *T. gondii* cell polarity to engineer a clonal transgenic *Toxoplasma* line expressing TgSORT-GFP (green fluorescence) located in the post-Golgi/endosome-like compartment (ELC) and an apically located rhoptry ROP1-mCherry to develop an image-based high-content screening approach. The proposed method allowed us to identify twelve compounds that disrupt the parasite polarity and block intracellular replication of *T. gondii*. We further showed that four of these compounds were also potent inhibitors of *P. falciparum*.

## Materials and methods

### Parasite strains and reagents

The following *T. gondii* strains were used in this work: RH strain, RHΔKU80, and RH containing Lac Z (clone 2F1) expressing β-galactosidase, which were kindly provided by Prof. Vern Carruthers (University of Michigan, USA) and *P. falciparum* 3D7 strain procured from the Institut de Recherche et de Développement (IRD-Bénin). The following reagents were also used: DAPI, (D9542, Sigma-Aldrich), crystal violet (C0775, Sigma Aldrich), Kit RAL 555 (RAL Diagnostics, Labelians, Belgium), 5'-fluorodeoxyuridine (5'FUdR, Merck), pyrimethamine (Merck), mycophenolic acid (MPA, Calbiochem), Xanthine (XAN, Merck), chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG, Merck), Hoechst-Thiazole Orange (Sigma Aldrich) and Tocriscreen Total library (Cat. No. 2884, Tocris Biotechnique).

### Intracellular growth of *T. gondii*

The tachyzoites of *T. gondii* strains used in the present study were routinely cultured on a human fibroblast foreskin (HFF) monolayer in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, PAN Biotech, Dutscher, France) supplemented with heat-inactivated 10% fetal bovine serum (PAN Biotech, Dutscher, France), 2 mM of glutamine and 50 μg/mL of penicillin/streptomycin (PAN Biotech, Dutscher, France). After three hours, the infected cells were washed with culture medium and the intracellular parasites were allowed to grow at 37°C for 2–3 days to ensure complete lysis. Freshly lysed tachyzoites were purified using 0.33 μm filter (Millipore) to remove cell debris before counting, and the obtained parasites were used for transfection or for drug assays.

### Plasmid constructs and generation of transgenic *T. gondii*

Transgenic ROP1-mCherry parasites were obtained *via* a knock-in strategy using a 2283 bp DNA fragment as well as KI-ROPI

forward primer (TAC TTC CAA TCC AAT TTA ATG CTG GGC TCG CAC CAA TAG CAC) and KI-ROPI reverse primer (TCC TCC ACT TCC AAT TTT AGC TTG CGA TCC ATC ATC CTG CTC). This DNA fragment was cloned into the pLIC-mCherry-HXGPRT (hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase selectable marker) plasmid (Huynh and Carruthers, 2009), and was linearized using BstBI restriction enzyme. Tachyzoites ( $5 \times 10^6$  parasites) of the RHΔKu80 strain were transfected with 25 μg of linearized plasmids. After two selections with 25 μg/mL MPA and 50 μg/mL XAN, stable parasites were cloned and positive clones were screened by indirect immunofluorescence assay (IFA), whereby three individual clones were selected for further confocal imaging. One of the positive clones was then knocked out for the uracil phosphoribosyl transferase (UPRT) gene using a second plasmid containing TgSORT-GFP as previously described Sloves et al. (2015), whereby the plasmid containing the HA tag was replaced by GFP. All aforementioned plasmids were checked for accuracy by full DNA sequencing before use. Transgenic tachyzoites ( $5 \times 10^6$ ) expressing rhoptry ROP1-mCherry were transfected with 25 μg of linearized promSORT-TgSORT-GFP plasmid and were subsequently transferred to the monolayer HFF for 4h, and were washed with culture medium. This was followed by a 24-hour growth, after which 5 μM of 5'FUdR was added. After three days, selection was repeated twice before cloning the emerging resistant parasites. After screening by IFA, one positive clone was selected for drug screening using the Tocris library as described below.

### *Toxoplasma* strains and cell infection for the miniaturized high-throughput assay

*T. gondii* RH-ΔKu80 expressing ROP1-mCherry/TgSORT-GFP (clone D6) tachyzoites were maintained by growth on HFF cell monolayers as previously described, whereby HFF cells at 12 sub-cultured dilution cycles kept in liquid nitrogen prior to their use, and were cultivated in complete DMEM medium after thawing in a 75-cm<sup>2</sup> flask. Three days later, the cells were trypsinized, resuspended to complete the DMEM medium, and transferred to a 175-cm<sup>2</sup> flask until confluency had been attained. Prior to infection, the culture medium was removed and HFF cells were washed twice with sterile phosphate buffered saline (PBS) after which 3 mL of trypsin-EDTA was added and the sample was incubated for 4 minutes at 37°C. After verifying cell detachment by microscope, 25 mL of growth medium was added and HFF cells were then counted using a TALI Cytometer (Invitrogen) and were infected at MOI (multiplicity of infection) 2.5 with freshly lysed sourced from a 25-cm<sup>2</sup> flask containing infected HFF cells and filtered through 3 μm membrane (polycarbonate, Whatman). After parasite counting using Malassez hematocytometer, the infected cells were grown for 4 hours at 37°C, and the HFF cell monolayer was washed with PBS, trypsinized, and resuspended with complete culture medium before counting. The contents were diluted to obtain a final concentration of  $3.25 \times 10^5$  cells per mL and these infected cells were immediately used for drug library screening.



## Compound screening and image acquisition

Tested compounds were obtained from the Tocriscreen Total library (Cat. No. 2884, Tocris), which contains 1,120 biologically active compounds solubilized in pure DMSO at 10 mM. Compound solutions were stored in specific plates to allow Acoustic Droplet Emission transfers ([Supplementary Figure 1](#)), which were performed using an Echo550<sup>®</sup> (Labcyte), allowing us to dispense 40 nL of each compound to reach a 10  $\mu$ M concentration in the 40  $\mu$ L volume used for the test, with DMSO serving as negative control (1% final concentration in the assay). Initially, assays were performed using pyrimethamine (Pyr) as a positive control (at 0.6  $\mu$ M and 10  $\mu$ M concentrations), as this drug is known to efficiently and rapidly kill *T. gondii* at very low concentrations. After the initial identification, SB 203580 (Cpd1) and SB 208 (Cpd3) were used as positive controls. For compound screening, 40  $\mu$ L (corresponding to  $1.3 \times 10^5$  cells) of infected-cell suspension was dispensed in each well of 384-well plates containing compounds, which were prepared and kept for a few minutes at room temperature before use. These plates were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity atmosphere for 24 hours before further processing.

## Sample fixation and staining

After 24-hour of incubation, infected cells were subjected to drug effects, and the cell culture media and drugs were removed, after which 20  $\mu$ L of PBS was added to each well using a washer-dispenser device (EI406<sup>®</sup> from Biotek), whereby 20  $\mu$ L of 10% formalin solution was placed on top of the PBS. Plates were kept at room temperature for 20 minutes and were washed once with PBS before staining with DAPI prepared at a 2  $\mu$ g/mL concentration in PBS containing 0.1% of Triton X-100, 100 mM of glycine and 5% fetal bovine serum (FBS). After incubating at room temperature for 20 minutes, plates were washed with 50  $\mu$ L of PBS, and 40  $\mu$ L of PBS containing 1% FBS was added to each well, after which the plate was sealed and stored at 4°C until required for image acquisition, performed using an InCell Analyzer 6000<sup>®</sup> (GE Healthcare). For this purpose, six fields per well were acquired from the A1 well and were placed in the P24 well in a horizontal serpentine mode of acquisition with the 60 $\times$  objective and the exposure parameters were indicated in [Table 1](#).

Images from all three channels (hereafter denoted as blue, green and red, respectively) were captured in confocal mode, using the closed aperture option in order to reduce background noise.

TABLE 1 Exposure parameters of image acquisition using the InCell Analyzer.

Laser wavelength (in nm)	Emission Filter (in nm)	Exposition time (in ms)
405	455	200
488	525	500
561	605	200

## Image analysis

Images captured by the InCell Analyzer 6000<sup>®</sup> were analyzed using Columbus software. Both cell- and parasite-based analyses were performed, and were supplemented by vacuole structure and organization assessments in certain cases. First, a local maxima detection algorithm was applied to the DAPI channel to detect the nuclei, which were then thresholded by size, roundness and DAPI mean intensity to avoid any false detection (as parasite vacuoles could be misidentified as nuclei). Next, cytosols were detected based on the DAPI background signal in this region, after which a spot detection on the DAPI channel was processed to detect parasites in the entire cell layer. Based on this parameter, parasite count per field or per HFF cell monolayer was obtained. In parallel, as parasites were gathered in vacuoles, the vacuole population was split into positive and negative groups. Given that positive vacuoles were considered to express the expected mislocalisation phenotype, they were selected using a multiparameter threshold, including the ratio of ROP1-mCherry intensity between the center and the border of the vacuole and the mean mCherry intensity in the vacuole. To be labelled as positive, vacuoles had to fulfill the following two criteria: (1) the ratio of intensity between the center and the border of the vacuole must exceed 1.4, and (2) the mean intensity in the vacuole must be below 500, as explained in detail in [Supplementary Table 2](#). The percentage of positive vacuoles was thus used as a parameter that reflects the vacuole disruption phenotype. The data were normalized using Z-score.

## Indirect immunofluorescence using confocal microscopy

Intracellular parasites were fixed with 4% paraformaldehyde prepared in PBS for 30 minutes at room temperature, and were washed three times with PBS before staining with DAPI. Samples were observed with a Zeiss confocal microscope and the obtained images were processed using Image J software. When antibodies were utilized, the samples were permeabilized with 0.2% Triton X-100 prepared in PBS with 100 mM of glycine to block free aldehyde groups, incubations were done for 30 min at room temperature all along the experiment. After blocking with 10% of FBS in PBS containing 0.1% Triton X-100, monoclonal or polyclonal antibodies were added at 1:500 dilutions and incubated at 37°C for 30 min. After three washes, Alexa 488 nm or 560 nm secondary antibodies were added to the same buffer with DAPI and blue Evans, and after incubation at 37°C for 30 min, and three washes with PBS containing 0.1% of Triton X-100, the coverslips were mounted with Mowiol and dried at 37°C before confocal microscopy observations.

## $\beta$ -galactosidase assay

Purified tachyzoites ( $2 \times 10^5$  parasites) of the transgenic *T. gondii* RH (clone 2F1) strain were used to infect confluent HFF cell



monolayer in 24 cm<sup>2</sup>-well plates for 4 hours and, after washing once with culture medium, the infected cells were incubated with compounds at different concentrations for 48 hours. After recovery by scraping, materials were centrifuged at 5,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The pellets were washed once with PBS and lysed for 60 minutes at 50°C in 150 µL of a buffer containing of 1% Triton X-100, 5 mM DTT, 1 mM MgSO<sub>4</sub> and 100 mM HEPES as described previously (Seeber and Boothroyd, 1996; McFadden et al., 1997). After centrifugation at 10,000 rpm for 5 minutes at 4°C, 50 µL of the supernatant was diluted to 50% with lysis buffer. After adding 100 µL of 2 mM chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG), the resulting mixtures were incubated at 30°C overnight and the optical density was measured at  $\lambda = 570$  nm.

## Plaque formation

Plaque assays were performed using 24-well plates containing at least 5 day-confluent HFF cells infected with 10<sup>3</sup> parasites per well in media, with DMSO as negative control, or in DMSO combined with drugs at 25 µM or 50 µM concentration. Nine days post-infection, the controls and infected HFF cells were stained with crystal violet, as previously described (Sloves et al., 2012; Sangaré et al., 2016). Two independent experiments were performed with identical results.

## In vitro growth of *P. falciparum*

*P. falciparum* 3D7 strain was used at the Institut de Recherche et de Développement (IRD-Bénin) to obtain parasite cultures from group O+ red blood cells (RBCs) of healthy adult volunteers. RBCs were washed twice in PBS 1X and then in complete malaria culture medium (CMCM) composed of RPMI 1640 (PAN Biotech, Dutscher, France), 0.8% Albumax, 25 mM HEPES, 0.4 mM hypoxanthine, 0.05 mg/mL gentamicin and 2 mM L-glutamine before storage at 4°C. RBCs infected with *P. falciparum* 3D7 were grown at 5% hematocrit at 37°C in an atmosphere comprising 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub> and 94% N<sub>2</sub>. The culture medium was renewed daily and samples were checked for evidence of parasitemia. Prior to drug testing, the infected RBCs were synchronized with 5% sorbitol for 15 minutes at room temperature, and a second synchronization was performed after 48 hours to eliminate persistent mature forms. Compounds were then tested in 96-well flat-bottom plates at a hematocrit of 5% and an initial ring parasitemia of 1% in 250 µL of CMCM. The following concentrations were tested: 5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM and 150 µM drugs solubilized by DMSO and prepared in CMCM. The experiments were done in quadruplicate and DMSO was used as the negative control. Chloroquine, a well-known anti-plasmodial drug used at 0.005–150 µM served as the positive control. Plates were incubated for 48 hours at 37°C under the same conditions. Thin smears were created by spreading 6 µL of parasitized RBCs (pRBCs) on a glass slide, which was fixed and stained using the RAL 555 kit before using the AxioCam MRc (color) CCD Rev3 camera of ZEISS microscope at X63 to observe

and photograph the RBC smears and process the data using ImageJ software.

## Flow cytometry analysis

Both untreated and drug-treated infected RBCs (2.5 µL) were collected from each well and were incubated at 37°C for 60 minutes in a Hoechst 33258-Thiazole Orange mixture at 0.001 mg/mL and 0.005 mg/mL final concentrations, respectively (Grimberg et al., 2008). Samples were analyzed using BD FACS Canto flow cytometer, whereby FlowJO was used for data analysis and statistical analyses were conducted using GraphPad Prism.

## Statistical analyses

Statistical analyses involved two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test, which were performed using GraphPad Prism version 8.3.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA), with  $p < 0.05$  indicating statistical significance. The results are reported as mean of parasite growth percentage  $\pm$  SD as a function of the logarithm of inhibitor concentration.

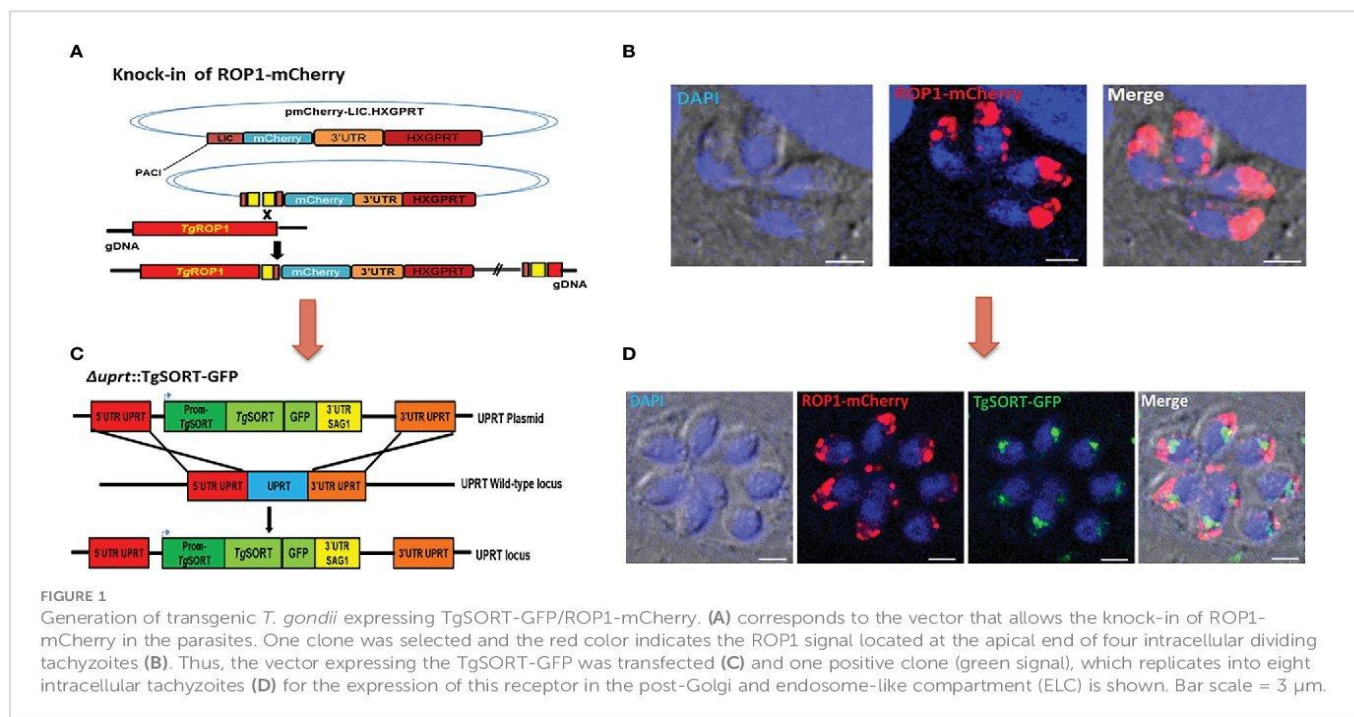
## Results

### Generation of transgenic *T. gondii* TgSORT-GFP/ROP1-mCherry

With the aim of screening small molecules on a large scale, we created a transgenic *T. gondii* strain that simultaneously expresses ROP1-mCherry (red fluorescent signal) and TgSORT-GFP (green fluorescent signal) as schematically depicted in Figures 1A, C. For this purpose, we chromosomally appended an encoded mCherry to the rhoptry protein 1 (ROP1) using the plasmid mCherry-LIC-HXGPRT (as explained in the Materials and Methods section and shown in Figure 1A). This knock-in strategy was adopted, as it ensures steady-state levels of epitope-tagged protein expression *via* homologous promoters. As indicated in Figure 1B, it resulted in a clonal *T. gondii* strain expressing ROP1-mCherry at the apical end of intracellular dividing tachyzoites. Next, we transfected a second vector that expresses TgSORT-GFP, thereby disrupting the uracil phosphoribosyl transferase (UPRT) gene by double homologous recombination and conferring the resistance to 5'FUDR (Figure 1C). The UPRT gene was chosen because it is non-essential and its knockout has no phenotypic consequences for the parasite, allowing it to salvage uracil from the infected host cells (Fox and Bzik, 2002).

As shown in Figure 1D, we also selected a positive clone for TgSORT-GFP (green signal) in the background of the transgenic *T. gondii* already expressing ROP1-mCherry (red signal). These intracellular parasites dividing transgenic tachyzoites of *T. gondii* simultaneously exhibited TgSORT-GFP in the post-Golgi/endosomal-like compartment and ROP1-mCherry at the apical end of the parasites. It is worth noting that these transgenic





parasites showed identical rate of multiplication to the parental or wild type parasites growing inside the human foreskin fibroblasts under our experimental *in vitro* conditions.

### Image-based miniaturized assay

For the assay, HFF cells were first infected with a pre-culture of *T. gondii* expressing both TgSORT-GFP and ROP1-mCherry, as shown in Figure 2 depicting assay workflow. The infected cells were subsequently harvested onto a compound containing 384-well plates and were incubated for 24 hours, after which the samples were fixed and stained with nuclear label-DAPI. Next, confocal images were acquired using an automated microscope and well-based analysis was performed using Columbus software (Supplementary Table 1; Figure 3). To establish the assay, the number of HFF cells, the multiplicity of infection (MOI), and the DMSO impact have to be determined to ensure a homogenous *T. gondii*-infected HFF layer in each well at read-out (Supplementary Figure 2). We have chosen pyrimethamine (Pyr) for this purpose, as this well-known drug is frequently used in toxoplasmosis treatment (Hill and Dubey, 2002; Halonen and Weiss, 2013; Dunay et al., 2018) and is an effective parasite growth inhibitor in assays (Supplementary Figure 2). A dose response of Pyr was determined and the number of parasites per field was quantified. For DMSO, 18 parasites were noted on average per field, declining to 5 parasites in the presence of 0.6 μM Pyr.

### Small molecule screen for identifying known compounds that inhibit *T. gondii* intracellular growth

As a part of the present study, a pre-screen optimization was also performed by filling two 384-well plates with two Pyr doses (0.6 μM and 10 μM) in a checkerboard style (Figure 4A). For the DMSO negative control, 20 parasites were noted on average per HFF cell, declining to about 2 parasites in cells containing 10 μM Pyr. Next, the first 384-well plate from the Tocris library in Supplementary Table 2 was analyzed under the conditions described above. For this purpose, we generated a data processing script utilizing the signal emitted by the ROP1-mCherry and correlating it with the mislocalisation of the rhoptry signal. We first tested 300 compounds of Tocris library and the initial results pertaining to the wells corresponding to a compound yielding positive results were visually validated to concur with the findings related to the rhoptry marker mislocalisation. For the DMSO negative control, the rhoptry fluorescence signal was in the apical form of very distinct spots, while it was largely diffuse for the SB 239063 (Cpd2) and SB 208 (Cpd3) compounds, which correlated with a disruption of the classical and apical pattern of rhoptries (Supplementary Figure 3). Cpd2 and Cpd3 were identified as p38-MAP kinase and TGF-β type I receptor inhibitors, which were reported to reduce *T. gondii* growth by several authors (Wei et al., 2002; Wiley et al., 2010), indicating that our screen is robust. Thus, Cpd2 and Cpd3 were used as positive controls for the automatic

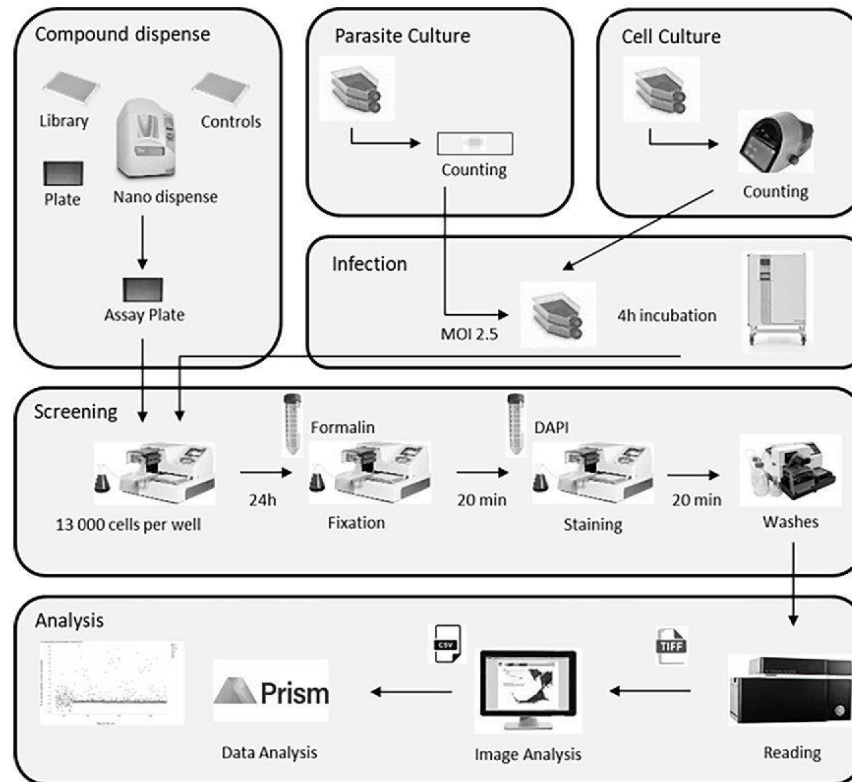


FIGURE 2

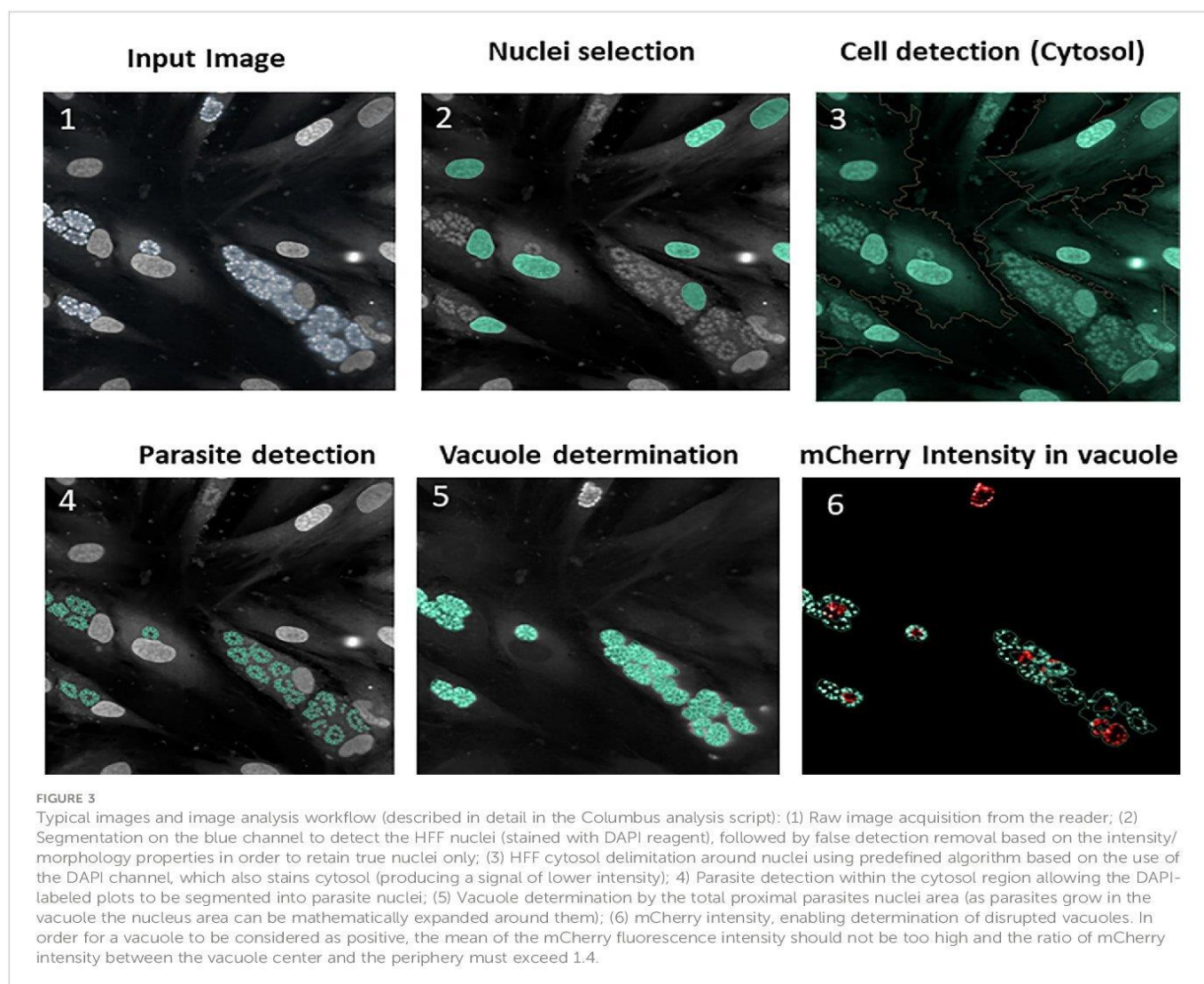
Assay workflow showing all steps of the library screening protocol, namely cell culture, parasite infection, sample processing and labeling, and image acquisition followed by automated image analysis. MOI, multiplicity of infection.

screening of the 900 remaining small molecules distributed in three additional 384-well plates, as shown in Figure 5. During the analysis script creation, the dual GFP and mCherry labelling approaches were tested but it appears that ROP1-mCherry signal was sufficient to determine the effect of drugs on the parasite morphology inside the parasitophorous vacuole. Indeed, the TgSORT-GFP fluorescence was concentrated and created puncta, whereas the ROP1-mCherry created larger structured area in which the vacuole disruption can be captured in a more visible manner. Therefore, the percentage of positive vacuoles that correlate with the disruption of rhoptry signal was chosen as the key parameter, and the corresponding data plot is shown in Figure 6. These automatic image-based screenings identified nine further compounds that exhibited the expected phenotypic disruption fluorescence, as demonstrated in Figure 7. Unlike the negative DMSO control showing viable well-shaped intracellular tachyzoites with distinct apical red signal corresponding to normal rhoptries, these drug-treated wells contained necrotized intracellular parasites. When our visual and automatic screening methods were combined, 12 such compounds were identified, and their chemical structures are shown in Figure 8, revealing inhibitors of one CB<sub>2</sub> receptor, two ATP-competitive TGF-βRI, one Ca<sub>v</sub>3.x pump and one estrogen receptor. The remaining seven compounds are kinase inhibitors, five of which inhibit p38-MAP kinase, and two inhibit ERK and Src family kinases, respectively (Table 2).

## Dose-dependent inhibitory effects of the small molecules on *T. gondii* growth

The inhibitory activity of the compounds identified through image-based screening was validated by another enzymatic method and the findings revealed a highly significant difference ( $p < 0.0001$ ) in parasite growth depending on the inhibitor presence and concentration used, reflecting an important effect of inhibitors on the intracellular replication of *T. gondii* using β-galactosidase assays (Figures 9A, B). As compound Cpd5 failed to produce inhibitory effect (Figure 9A), it was excluded from the validation process. When the positive compounds were placed in groups of three, their joint IC<sub>50</sub> decreased from 15–60 μM to 1.5–2.5 μM. The concentrations below the IC<sub>50</sub> of each individual compound was mostly chosen and these compounds were combined according to their ability to inhibit different putative targets or pathways (Figure 9C). Each compound of the combined drug mixtures was used at a range of concentrations between 1.0 to 3.0 μM. Nonetheless, the difference observed between the results obtained by applying inhibitor mixes to *T. gondii* and the untreated parasites was significant ( $p = 0.0024$ ), indicating beneficial synergistic effect. Moreover, when infected confluent HFF cells were subjected to drug inhibition for nine days to allow plaque formation, which corresponds to several rounds of invasion, egress and reinvasion, parasite growth was completely abolished for all six compounds





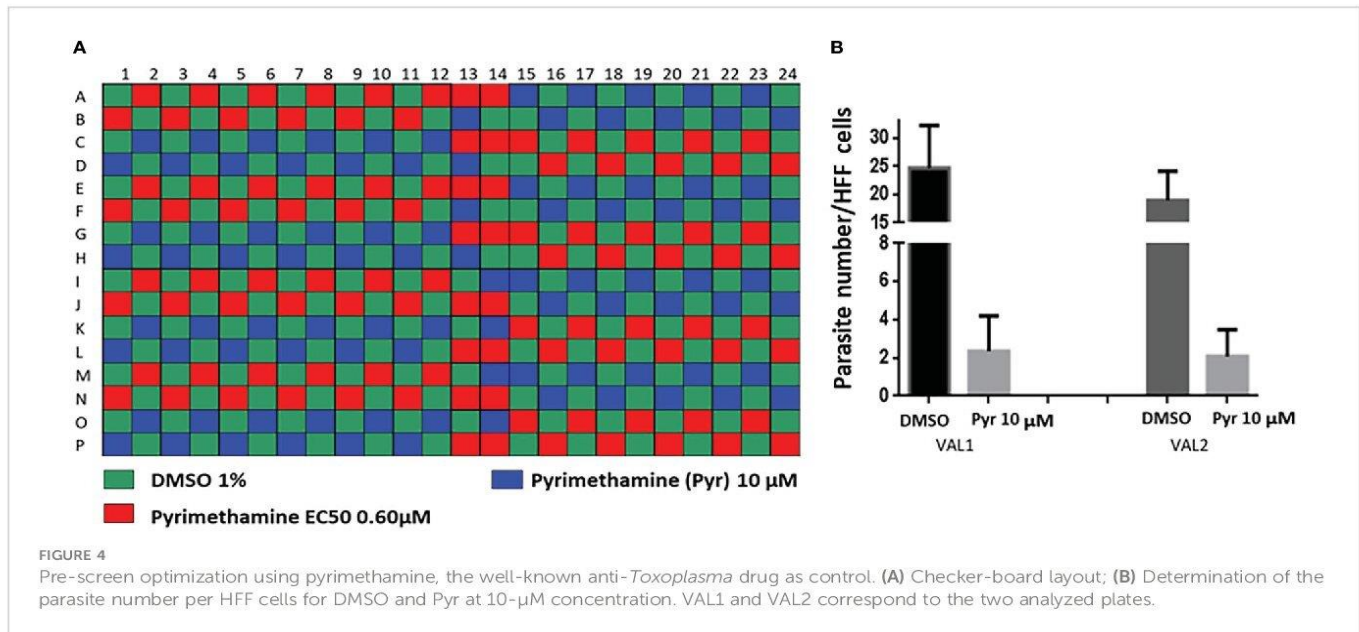
tested, i.e., Cpd2, Cpd3, Cpd4, Cpd7, Cpd10 and Cpd11 (Figure 9D). Even at high concentrations (25 and 50  $\mu\text{M}$ ), the confluent monolayer of HFF cells remained intact, as shown by homogenous crystal violet staining at these doses. Furthermore, we determined the effects of these drugs on the classical fluorescence patterns of few intracellular organelles of the parasites using specific antibodies and confocal imaging. Figure 9E showed that intracellular tachyzoites of parental RH strain treated with Cpd2, 3, 4, 10 and 11 led to detrimental effects on the apical signal of rhoptries with from more fragmented patterns until a total disappearance of the fluorescence signals in some parasites. These drugs also severely affected the apical pattern of micronemes except for Cpd 6 as compared to the four other drugs. The compounds Cpd2 and Cpd10 were less active on the pattern of secretion dense granule proteins into parasitophorous vacuoles (Figure 9E). The inner complex membranes of drug-treated parasites appears normal, except that the parasites were shorter in sizes compared to parasites treated with DMSO alone (Figure 9E). As expected, these parasites treated with DMSO alone showed typical

fluorescence signals in the apical end for rhoptries and micronemes. Altogether, these data confirms the detrimental effects observed on ROP1-mCherry containing rhoptries in the intracellular parasites during our automatic and miniaturized drug screening.

### Effect of the identified compounds on *P. falciparum*

To test the inhibitory effects of eight compounds identified during our image-based screen on *P. falciparum* growth, we used infected red blood cells (RBCs) synchronized twice with sorbitol and subjected them to flow cytometry analysis. The findings indicated that four compounds (Cpd3, Cpd4, Cpd10 and Cpd11) were active against *P. falciparum* and the infected RBC cultures were cleared of ring stages (Figure 10A). We estimated the  $\text{IC}_{50}$  of these drugs between 1.0 to 5.0  $\mu\text{M}$ . Moreover, increasing inhibitor concentrations resulted in a significant ( $p < 0.0001$ ) decrease in *P.*



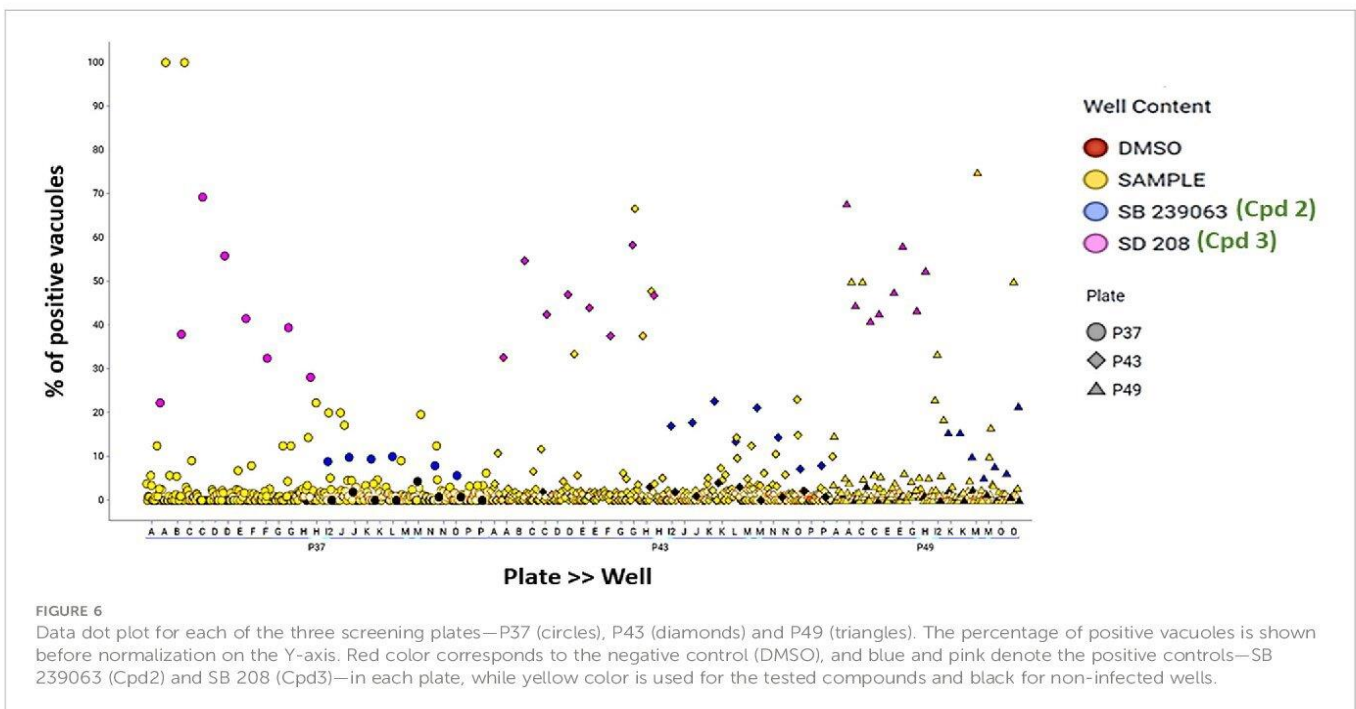
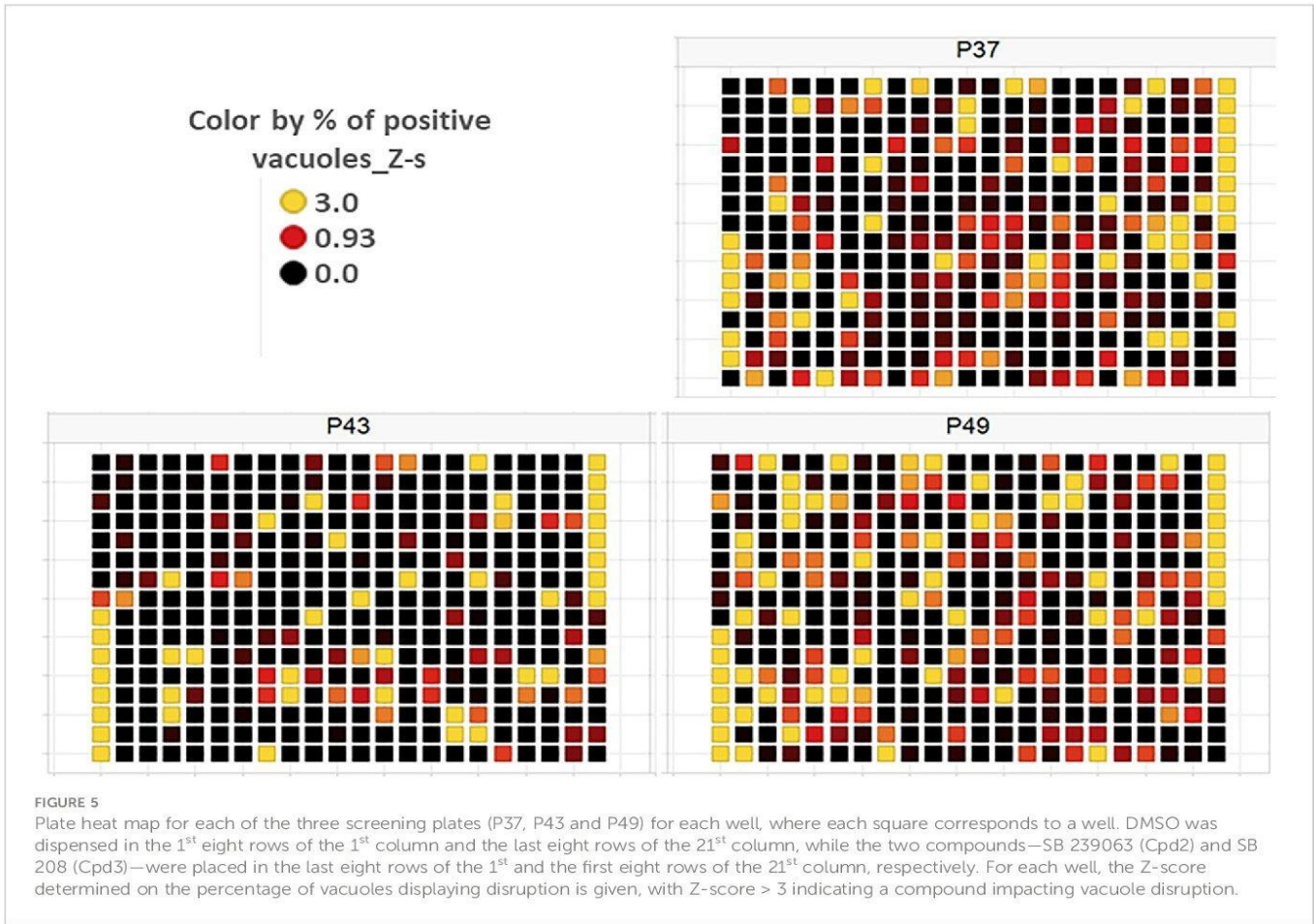


*falciparum* growth in RBCs. When trophozoite and schizonte forms of *P. falciparum* were counted by flow cytometry (Figures 10B, C), identical inhibitory effect of these four compounds was affirmed. The remaining four compounds inhibited *P. falciparum* growth, but their activity was below that noted for Cpd3, Cpd4, Cpd10 and Cpd11 (Figure 10). In all cases, inhibitory activity and absence of ring stage in the infected RBCs were confirmed by direct observation of stained red blood smears, as shown in Figure 10D. Only the negative DMSO controls exhibited numerous ring stages, confirming that these compounds are capable of directly targeting parasites, since *P. falciparum* was grown in non-nucleated red blood cells characterized by reduced metabolism and lack of intracellular organelles.

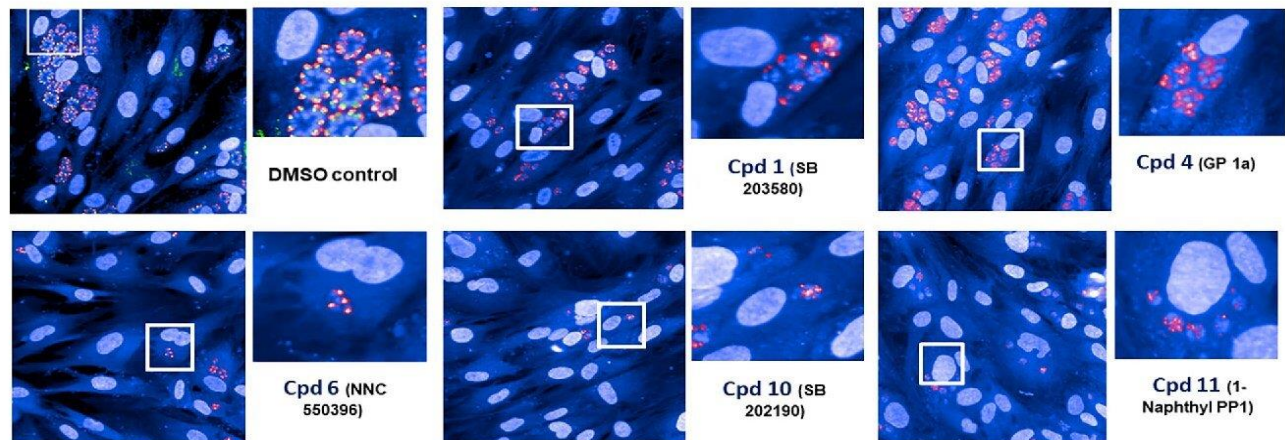
## Discussion

*T. gondii* and *P. falciparum* share evolutionary history, as both contain orthologous proteins often associated with similar cellular processes and likely exhibit similar sensitivity to inhibitors that affect their unique life stage events. Guided by these findings, we developed a powerful and efficient image-based screening protocol involving transgenic *T. gondii* simultaneously expressing TgSORT-GFP (green signal) and ROP1-mCherry (red signal) at two distinct subcellular locations, which can be applied to the extant library of 1,120 compounds. We also found that the signal of ROP1-mCherry alone is accurate and efficient for our automatic miniaturized drug screening. Our aim was to identify drugs capable of disrupting subcellular localization of fluorescence signals, thereby compromising parasite's polarity, morphology and intracellular replication. For this purpose, we employed experimental conditions that would allow us to identify compounds that not only inhibit but also disrupt parasite growth and its classical apical signal of rhoptries. Our findings revealed that, in addition to the

DAPI signal enabling detection of both HFF and parasite nuclei, the red signal was sufficient to identify the disruption of the apically located fluorescence of rhoptries during the screening process. This protocol was thus adopted in automated image analysis, which resulted in the identification of seven kinase inhibitors that mostly inhibited p38-MAP kinase, and two of which—Cpd2 (SB 203580) and Cpd3 (SB 208)—were previously reported to reduce *T. gondii* growth (Wei et al., 2002; Wiley et al., 2010). It should be emphasized that the compound library used in our analyses was used by Dittmar et al. (2016) to assess inhibition of *T. gondii* growth based on β-galactosidase assay and these authors identified 94 compounds and a significant number of small molecules known to impact dopamine or estrogen signaling. Among the 12 compounds identified in our screen, four inhibitors (Cpd4, Cpd6, Cpd9 and Cpd12) were not present in the hits reported by Dittmar et al. (2016). In addition, one of the compounds identified in our study (Cpd12, ZK 164015) as an estrogen receptor antagonist has not been identified in the aforementioned screening. These data suggest that even the same library was used; different hits can be obtained according to the methodology developed for the drug screening. It is also worth noting that Touquet et al. (2018) developed an automated image-based strategy for screening a library of compounds belonging to four classes of either natural compounds or synthetic derivatives. Next, we established the kinetics of inhibition of *T. gondii* proliferation by the identified 12 active compounds using enzymatic assay based on the β-galactosidase activity. We further confirmed that some of these compounds are also capable of inhibiting or eliminating *P. falciparum* grown in red blood cells. Interestingly, four of these compounds (potent ATP-competitive TGF-βRI inhibitor, CB<sub>2</sub> receptor inverse agonist, p38-MAPK and Src family kinase inhibitor) were at micromolar potency, as established using flow cytometry method. These observations suggest that the effects of these compounds are efficiently harmful to the intracellular growth



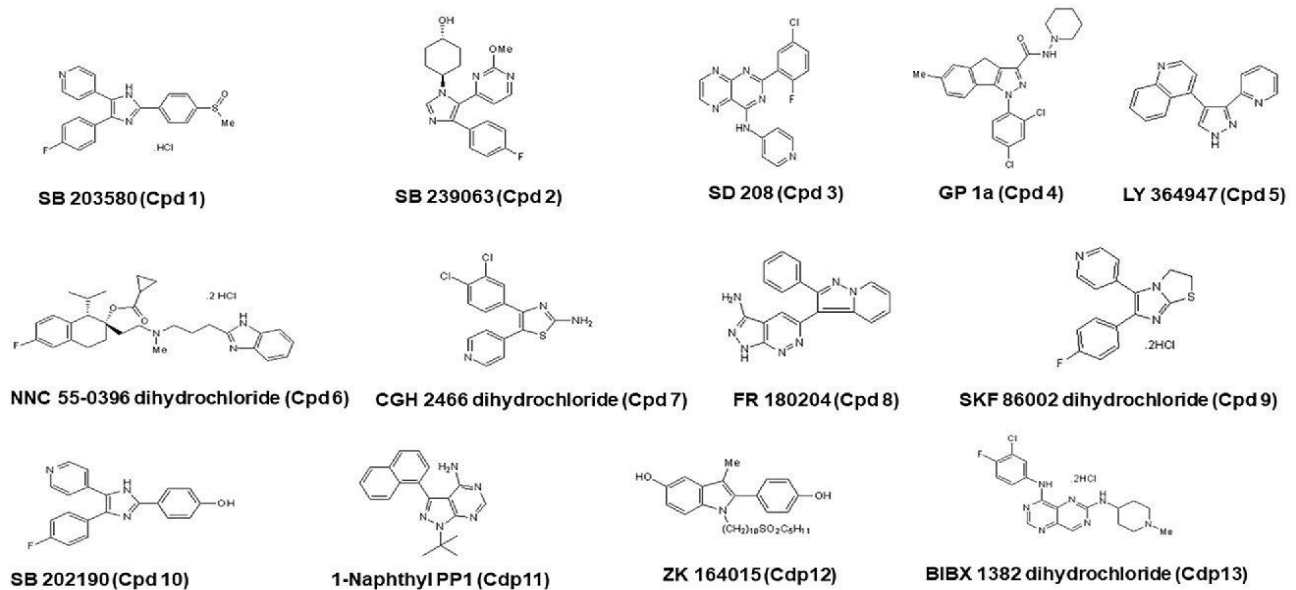




**FIGURE 7**  
 Screening hits. Five hits were obtained using our automatic image-based screening protocol and these fluorescence images (featuring necrotized intracellular parasites) illustrate the disruption of classical apical location of ROP1 signal compared to the negative DMSO control that shows intracellular dividing tachyzoites with normal morphology.

of *T. gondii*. It is interesting to note that our screen revealed several kinase inhibitors, which is relevant given that both *P. falciparum* and *T. gondii* contain a large number of proteins that are phosphorylated through action of several kinases, including tyrosine kinases (Treeck et al., 2011). The secreted proteins included an expanded, lineage-specific family of protein kinases termed rophtry kinases (ROPKs), several of which have been shown to be key virulence factors. For example, ROP16 targets the nucleus and phosphorylates STAT3/6, and regulates the immune responses (Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2006; Saeij et al., 2007; Yamamoto et al., 2009; Ong et al., 2010; Butcher et al., 2011). Thus, it is likely that the kinase inhibitors identified during our screen may have

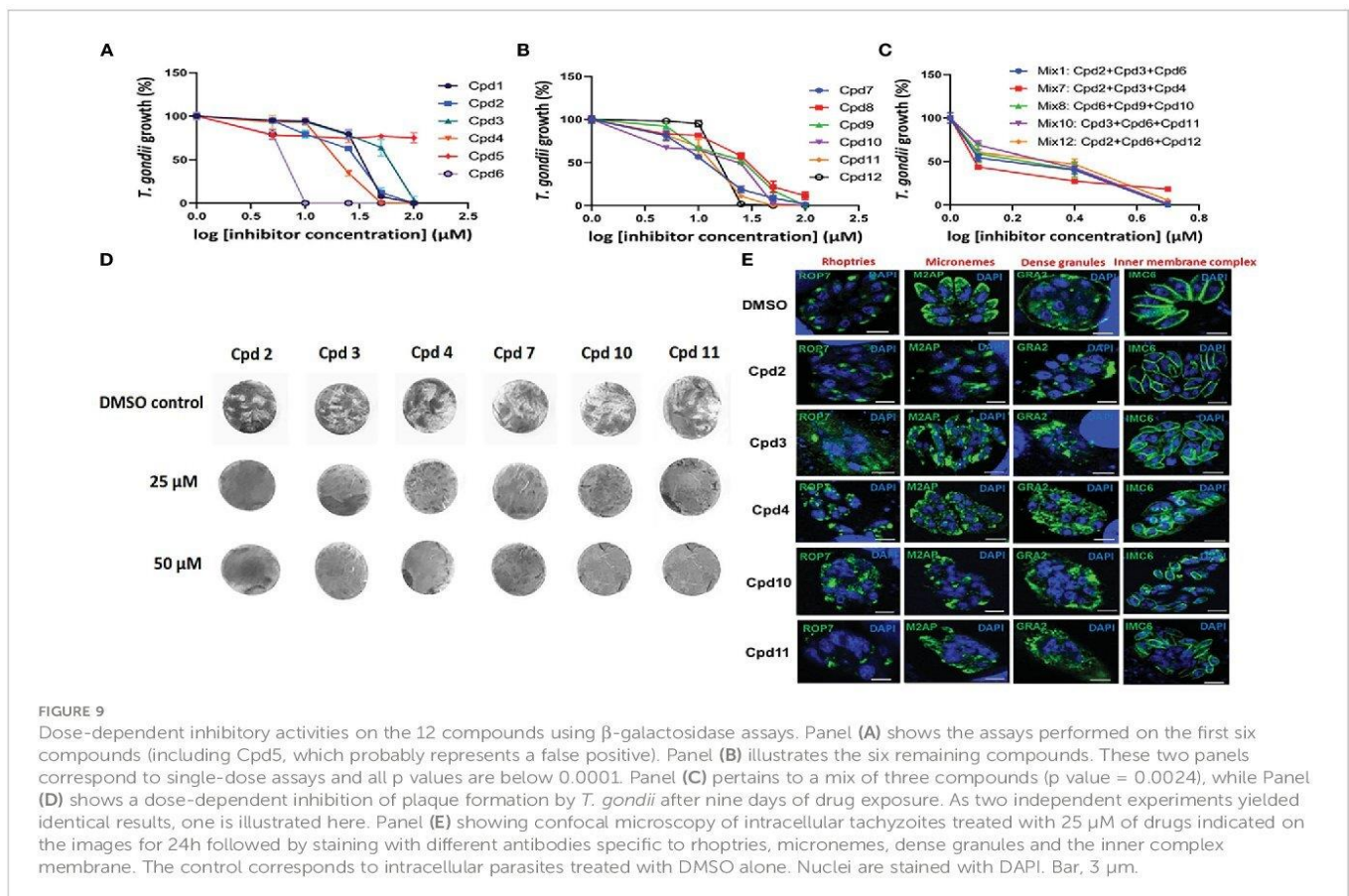
some of these parasite kinases as targets. Consequently, our approaches may be useful in the future for repurposing drugs with known safety profiles that could present attractive and significant advantages in terms of anti-parasite drug development. Although p38-MAP kinase inhibitors appear to be toxic, as indicated by adverse effects during previous clinical trials (Patnaik et al., 2016), other drugs (unrelated to kinase inhibitors) identified as a part of the present study can be considered. Based on the obtained findings, we postulate that a combination of drugs acting *via* multiple effector mechanisms might be superior to a single drug or a group of drugs with the same mechanism of action, because developing parasite resistance against multiple effector mechanisms



**FIGURE 8**  
 Chemical structures of all 12 hits with their corresponding names in the Toocris library, along with the nomenclature used in the present study (Cpd) and with the number corresponding to the order of identification.

TABLE 2 Chemical names and known functions of compounds identified.

Compound	Chemical name	Function
Cpd 1 (SB 203580)	4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-[4-(methylsulphonyl)phenyl]-1H-imidazol-4-yl]pyridinehydrochloride	Selective inhibitor of p38 MAPK
Cpd 2 (SB 239063)	trans-4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(2-methoxy-4-pyrimidinyl)-1H-imidazol-1-yl]cyclohexanol	Potent, selective p38 MAPK inhibitor
Cpd 3 (SD 208)	2-(5-Chloro-2-fluorophenyl)-4-[(4-pyridyl)amino]pteridine	Potent ATP-competitive TGF-BRI inhibitor
Cpd 4 (GP 1a)	N-(Piperidin-1-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methylinden[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide CB2	CB <sub>2</sub> receptor inverse agonist
Cpd 5 (LY 364947)	4-[3-(2-Pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]-quinoline	Selective inhibitor of TGF-βRI
Cpd 6 (NNC 55-0396 dihydrochloride)	(1S,2S)-2-[2-[[3-(1H-Benzimidazol-2-yl)propyl]methylamino]ethyl]-6-fluoro-1,2,3,4- Retrahydro-1-(1-methylethyl)-2-naphthalenylcyclopropanecarboxylate dihydrochloride	Highly selective Ca <sub>v</sub> 3.x blocker
Cpd 7 (CGH 2466 dihydrochloride)	4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(4-pyridinyl)-2-thiazolamine dihydrochloride	A <sub>1</sub> , A <sub>2B</sub> and A <sub>3</sub> antagonist and inhibitor of p38 MAPK and PDE4
Cpd 8 (FR 180204)	5-(2-Phenyl-pyrazolo[1,5-a]pyridin-3-yl)-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridazin-3-ylamine	Selective ERK inhibitor
Cpd 9 (SKF 86002 dihydrochloride)	6-(4-Fluorophenyl)-2,3-dihydro-5-(4-pyridinyl)imidazo[2,1-b]thiazolidihydrochloride	p38 MAPK inhibitor; anti-inflammatory agent
Cpd 10 (SB 202190)	4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(4-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]phenol	Potent, selective inhibitor of p38 MAPK
Cpd 11 (1-Naphthyl PP1)	1-(1,1-Dimethylethyl)-3-(1-naphthalenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine	Src family kinase inhibitor; also inhibits c-Abl
Cdp 12 (ZK 164015)	2-(4-Hydroxyphenyl)-3-methyl-1-[10-(pentylsulfonyl)decyl]-1H-indol-5-ol	Potent estrogen receptor antagonist





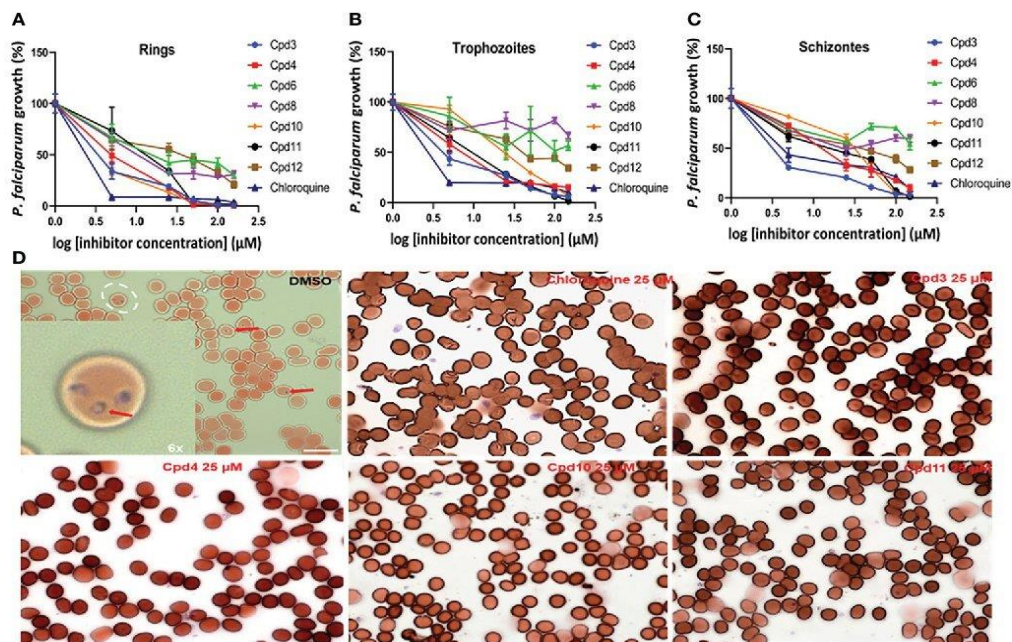


FIGURE 10

Dose-dependent inhibitory effects of the studied drugs on *P. falciparum* growth in red blood cells (RBCs). Panels (A–C) respectively showing ring stage, trophozoite and schizonte counts after drug treatments based on flow cytometry, with chloroquine as positive control ( $p < 0.0001$ ). Panel (D) shows a blood smear used to visualize ring stages of the DMSO control versus selected drugs in all used concentrations.

simultaneously would be extremely hard to achieve. Further work on target identification and mechanism analysis is thus required to facilitate the development of anti-parasitic compounds with cross-species efficacy. Establishing the linkages between unique chemical scaffolds and their resultant cellular phenotypes on two evolutionarily related yet distinct parasites will provide an avenue for conducting detailed mechanistic studies with the organism of choice. In particular, biochemical and/or genetic approaches should be employed to identify the drug targets for further design of new parasite-specific inhibitors.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Author contributions

The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: PB and ST. Performed the experiments: AH, RH, and AV. Contributed reagents/materials/analysis tools: SD, ON, and CD. Performed data analysis: PB and AV. Wrote the paper: AH, PB, and ST. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

Financial support for this work was provided by the European Community (ERC-STG INTRACELLTB Grant n° 260901), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-EQPX-04-01, ANR-11-LABX-0024), the Feder (12001407 (D-AL) Equipex Imaginex BioMed) and the Région Nord Pas de Calais (convention n° 12000080), the Agence Nationale de la Recherche grants N° ANR-14-CE14-0002-01 and N° ANR-19-CE44-0006 to ST.

## Acknowledgments

We would like to thank Dr. Vern Carruthers (University of Michigan, USA) for providing us with the transgenic *T. gondii* RH (clone 2F1) strain. Also thanks to Gaspard Deloison, Virginie Pottiez, Thomas Mouvaux, Florence Leroux and Omar Ndao for their technical assistance during high content screening and validation of positive compounds.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.



## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1102551/full#supplementary-material>

### SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Acoustic dispensing principles and apparatus.

### SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Pre-screening of effective pyrimethamine and DMSO concentrations allowing the image-based drug identification. (A) Impact of different DMSO concentrations on the uninfected HFF cells. (B): Two independent experiments using different pyrimethamine concentrations tested on 7,000

infected HFF cells. (C) Dose-dependence of pyrimethamine concentrations based on tests involving 7,000 and 13,000 infected HFF cells. (D) Determination of the pyrimethamine EC<sub>50</sub> under our experimental conditions designed for drug screening.

### SUPPLEMENTARY FIGURE 3

First screening hits of the 380-well plate containing 200 small molecules based on direct and manual microscopic observations. Two compounds—Cpd2 (SB 239063) and Cpd3 (SD 208)—were identified.

### SUPPLEMENTARY FIGURE 4

Testing drug toxicity on uninfected and infected HFF cells. (A) Cpd1 (SB 203580) at 40 μM; (B) Cpd1 (SB 203580) at 5 μM; (C) Cpd2 (SB 239063) at 40 μM; (D) (SB 239063) at 5 μM; (E) Cpd3 (SD 208) at 40 μM; (F) Cpd3 (SD 208) at 5 μM. (G) DMSO; (H) No treatment. (I) Test of toxicity on uninfected HFF cells using different Cpd1, Cpd2 and Cpd3 concentrations, revealing absence of toxicity. (J) Number of HFF cells containing positive vacuoles across the dose-dependent inhibitory activity ranges of these three drugs. The number of positive vacuoles has not significantly changed.

### SUPPLEMENTARY TABLE 1

Columbus image analysis script.

### SUPPLEMENTARY TABLE 2

Small molecules, their corresponding chemical structures and functions based on the Tocris library data.

### SUPPLEMENTARY TABLE 3

Four drugs (30%) among the twelve inhibitors identified during our screening are not present in those reported by Dittmer et al. (2016).

## References

- Alexander, D. L., Mital, J., Ward, G. E., Bradley, P., and Boothroyd, J. C. (2005). Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: A collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog.* 1, e17. doi: 10.1371/journal.ppat.0010017
- Balikagala, B., Fukuda, N., Ikeda, M., Katuru, O. T., Tachibana, S. I., Yamauchi, M., et al. (2021). Evidence of artemisinin-resistant malaria in Africa. *N. Engl. J. Med.* 385, 1163–1171. doi: 10.1056/NEJMc2117480
- Bradley, P. J., and Boothroyd, J. C. (2001). The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal. *Int. J. Parasitol.* 31, 1177–1186. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00242-9
- Brydges, S. D., Harper, J. M., Parussini, F., Coppens, I., and Carruthers, V. B. (2008). A transient forward-targeting element for microneme-regulated secretion in *Toxoplasma gondii*. *Biol. Cell.* 100, 253–264. doi: 10.1042/BC20070076
- Butcher, B. A., Fox, B. A., Rommereim, L. M., Kim, S. G., Maurer, K. J., Yarovinsky, F., et al. (2011). *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1 dependent growth control. *PLoS Pathog.* 7, e1002236. doi: 10.1371/journal.ppat.1002236
- Dittmar, A. J., Drozda, A. A., and Blader, I. J. (2016). Drug repurposing screening identifies novel compounds that efficiently inhibit *Toxoplasma gondii* growth. *mSphere* 1, e00042–e00015. doi: 10.1128/mSphere.00042-15
- Dunay, I. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O., and Montoya, J. G. (2018). Treatment of toxoplasmosis: Historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, e00057–e00017. doi: 10.1128/CMR.00057-17
- Fox, B. A., and Bzik, D. J. (2002). *De novo* pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature* 415, 926–929. doi: 10.1038/415926a
- Grimberg, B. T., Erickson, J. J., Sramkoski, R. M., Jacobberger, J. W., and Zimmerman, P. A. (2008). Monitoring *Plasmodium falciparum* growth and development by UV flow cytometry using an optimized hoechst-thiazole orange staining strategy. *Cytom A* 73, 546–554. doi: 10.1002/cyto.a.20541
- Hallée, S., Boddey, J. A., Cowman, A. F., and Richard, D. (2018a). Evidence that the plasmodium falciparum protein sortilin potentially acts as an escorter for the trafficking of the rhoptry-associated membrane antigen to the rhoptries. *mSphere* 3, e00551–e00517. doi: 10.1128/mSphere.00551-17
- Hallée, S., Counihan, N. A., Matthews, K., de Koning-Ward, T. F., and Richard, D. (2018b). The malaria parasite plasmodium falciparum sortilin is essential for merozoite formation and apical complex biogenesis. *Cell Microbiol.* 20, e12844. doi: 10.1111/cmi.12844
- Halonen, S. K., and Weiss, L. M. (2013). Toxoplasmosis. *Handb. Clin. Neurol.* 114, 125–145. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008
- Harper, J. M., Huynh, M. H., Coppens, I., Parussini, F., Moreno, S., and Carruthers, V. B. (2006). A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Mol. Biol. Cell* 17, 4551–4563. doi: 10.1091/mbc.e06-01-0064
- He, C. Y. (2007). Golgi biogenesis in simple eukaryotes. *Cell. Microbiol.* 9, 566–572.
- Hill, D., and Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 634–640. doi: 10.1046/j.1469-0691
- Huynh, M. H., and Carruthers, V. B. (2006). *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog.* 2, e84. doi: 10.1371/journal.ppat.0020084
- Huynh, M. H., and Carruthers, V. B. (2009). Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell.* 8, 530–539. doi: 10.1128/EC.00358-08
- Huynh, M. H., Rabenau, K. E., Harper, J. M., Beatty, W. L., Sibley, L. D., and Carruthers, V. B. (2003). Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO J.* 22, 2082–2090. doi: 10.1093/emboj/cdg217
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., et al. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.* 7, e1001276. doi: 10.1371/journal.ppat.1001276
- McFadden, D. C., Seeber, F., and Boothroyd, J. C. (1997). Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1849–1853. doi: 10.1128/AAC.41.9.1849
- Milne, G., Webster, J. P., and Walker, M. (2020). *Toxoplasma gondii*: An underestimated threat? *Trends Parasitol.* 36, 959–969. doi: 10.1016/j.pt.2020.08.005
- Montoya, J. G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965–1976. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412
- Ong, Y. C., Reese, M. L., and Boothroyd, J. C. (2010). *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *J. Biol. Chem.* 285, 28731–28740. doi: 10.1074/jbc.M110.112359
- Patnaik, A., Haluska, P., Tolcher, A. W., Erlichman, C., Papadopoulos, K. P., Lensing, J. L., et al. (2016). A first-in-human phase I study of the oral p38 MAPK inhibitor, ralimetinib (LY2228820 dimesylate), in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* 22, 1095–1102. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1718
- Pelletier, L., Stern, C. A., Pypaert, M., Sheff, D., Ngô, H. M., Roper, N., et al. (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature* 418, 548–552. doi: 10.1038/nature00946

- Porter, S. B., and Sande, M. A. (1992). Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 327, 1643–1648. doi: 10.1056/NEJM199212033272306
- Rajapakse, S., Chrishan Shivanthan, M., Samaranyake, N., Rodrigo, C., and Deepika Fernando, S. (2013). Antibiotics for human toxoplasmosis: A systematic review of randomized trials. *Pathog. Glob. Health* 107, 162–169. doi: 10.1179/204773213Y.0000000094
- Saeij, J. P., Boyle, J. P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L. D., Brooke-Powell, E. T., et al. (2006). Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314, 1780–1783. doi: 10.1126/science.1133690
- Saeij, J. P., Collier, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W., and Boothroyd, J. C. (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445, 324–327. doi: 10.1038/nature05395
- Sangaré, L. O., Alayi, T. D., Hovasse, A., Westermann, B., Sindikubwabo, F., Callebaut, I., et al. (2016). Unconventional endosome-like compartment and retromer complex in *Toxoplasma gondii* govern parasite integrity and host infection. *Nat. Commun.* 7, 10191. doi: 10.1038/ncomms11191
- Seeber, F., and Boothroyd, J. C. (1996). *Escherichia coli* beta-galactosidase as an *in vitro* and *in vivo* reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene* 169, 39–45. doi: 10.1016/0378-1119(95)00786-5
- Sloves, P. J., Delhay, S., Mouveaux, T., Werkmeister, E., Slomianny, C., Hovasse, A., et al. (2012). *Toxoplasma* sortilin-like receptor regulates protein transport and is essential for apical secretory organelle biogenesis and host infection. *Cell Host Microbe* 11, 515–527. doi: 10.1016/j.chom.2012.03.006
- Sloves, P. J., Mouveaux, T., Ait-Yahia, S., Vornig, H., Everaere, L., Sangare, L. O., et al. (2015). Apical organelle secretion by *Toxoplasma* controls innate and adaptive immunity and mediates long-term protection. *J. Infect. Dis.* 212 (9), 1449–1458. doi: 10.1093/infdis/jiv250
- Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S. J., Tang, K., et al. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314, 1776–1780. doi: 10.1126/science.1133643
- Tomavo, S., Slomianny, C., Meissner, M., and Carruthers, V. B. (2013). Protein trafficking through the endosomal system prepares intracellular parasites for a home invasion. *PLoS Pathog.* 9, e1003629. doi: 10.1371/journal.ppat.1003629
- Touquet, B., Pelissier, L., Cavailles, P., Yi, W., Bellini, V., Mercier, C., et al. (2018). High-content imaging assay to evaluate *Toxoplasma gondii* infection and proliferation: A multiparametric assay to screen new compounds. *PLoS One* 13, e0201678. doi: 10.1371/journal.pone.0138760
- Treeck, M., Sanders, J. L., Elias, J. E., and 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, 410–419. doi: 10.1016/j.chom.2011.09.004
- Wei, S., Marches, F., Daniel, B., Sonda, S., Heidenreich, K., and Curiel, T. (2002). Pyridinylimidazole p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors block intracellular *Toxoplasma gondii* replication. *Int. J. Parasitol.* 32, 969–977. doi: 10.1016/s0020-7519(02)00061-9
- Wiley, M., Sweeney, K. R., Chan, D. A., Brown, K. M., McMurtrey, C., Howard, E. W., et al. (2010). *Toxoplasma gondii* activates hypoxia-inducible factor (HF) by stabilizing the HF-1alpha subunit via type I activin-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 26852–26860. doi: 10.1074/jbc.M110.147041
- World Health Organization (2021). *World malaria report* (Geneva, Switzerland).
- Yamamoto, M., Standley, D. M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., et al. (2009). A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp. Med.* 206, 2747–2760. doi: 10.1084/jem.20091703

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES



## DISCUSSION ET CONCLUSION

Les parasites *Apicomplexa* notamment *T. gondii* sont pourvus d'organites sécrétoires apicaux exclusifs (micronèmes et rhoptries) qui libèrent des protéines indispensables à l'infection de l'hôte. Les protéines des micronèmes contribuent à la motilité et à l'attachement du parasite à la cellule hôte au moment de l'invasion et leur action conjuguée entre autres avec les protéines des rhoptries permet l'entrée du parasite. Les protéines des rhoptries participent également à l'établissement de la vacuole parasitophore et sont responsables de la subversion des fonctions de l'hôte. Certaines protéines des micronèmes interviennent enfin pour assurer l'échappement des cellules hôtes après la multiplication du parasite.

Diverses études ont permis une meilleure compréhension du fonctionnement de ces organites ainsi que leur biogenèse. Ainsi, l'équipe a précédemment identifié *TgSORT*, le récepteur cargo homologue à la sortiline humaine et qui, par le biais de son domaine N-terminal, transporte les protéines de micronèmes et de rhoptries du post-Golgi vers l'ELC afin de permettre leur biogenèse.

L'objectif principal de ma thèse a été de déterminer les mécanismes d'interaction entre *TgSORT* et ses partenaires ROP ou MIC et d'identifier à terme de potentiels inhibiteurs de cette interaction.

C'est pourquoi, nous avons entrepris de résoudre la structure tridimensionnelle de *TgN-SORT* en présence et en absence de ligands. La connaissance de la structure 3D des macromolécules biologiques permet leur observation à l'échelle atomique, échelle à laquelle se produisent les processus de reconnaissance moléculaire qui dirigent bon nombre de phénomènes biologiques fondamentaux. En parasitologie, l'identification des résidus spécifiques impliqués peut permettre le développement d'analogues structuraux servant d'inhibiteurs.

La première étape pour l'atteinte de notre objectif consistait à exprimer *TgN-SORT* et ses partenaires sous forme de protéines recombinantes. De nos jours, plusieurs systèmes d'expression sont utilisés pour la production de protéines d'intérêt. *E. coli* est le système le plus répandu car il offre des avantages notoires que sont : une cinétique de croissance rapide inégalée (temps de doublement d'environ 20 minutes dans des conditions optimales en milieu glucose-sels) (Sezonov, Joseleau-Petit, and D'Ari 2007), la réalisation de cultures à haute densité cellulaire (en théorie, jusqu'à  $1 \times 10^{13}$  bactéries viables/ml) (Lee 1996; Shiloach et Fass, 2005), l'utilisation de milieux riches et complexes pouvant être produits à partir de réactifs abordables, une transformation facile et rapide à partir d'ADN exogène (Pope and Kent 1996), un coût de production minime, un

rendement élevé et un court délai d'exécution. Cependant, plusieurs inconvénients sont à dénombrer tels que l'absence ou une faible expression de la protéine d'intérêt, la formation des corps d'inclusion et l'inactivité de la protéine (Rosano et Ceccarelli 2014). Ces désavantages constituent des facteurs limitants pour l'obtention d'une protéine fonctionnelle et en quantité suffisante. C'est à l'un de ces obstacles (insolubilité de la protéine) qu'a été confrontée l'équipe et qui justifie le choix de *P. pastoris* comme système d'expression de TgN-SORT.

*P. pastoris* est une levure méthylothrophique capable de métaboliser le méthanol comme seule source de carbone. Son utilisation présente de nombreux avantages comparativement aux autres systèmes eucaryotes et à certains systèmes procaryotiques. Ce sont : un taux de croissance rapide avec une facilité de fermentation à haute densité cellulaire, une haute productivité en milieu minimal, l'élimination d'endotoxine et de bactériophages contaminants, des vecteurs d'expression bien caractérisés et facilement manipulables, l'innocuité pour l'homme des virus lytiques qui infectent *P. pastoris*, le repliement et autres modifications post-traductionnelles (glycosylation, méthylation, acylation, l'ajustement protéolytique), l'adressage vers les compartiments subcellulaires et la possibilité d'un largage extracellulaire des protéines qui peuvent être purifiées directement à partir du milieu de culture (Li et al. 2007).

Nous avons effectué des expériences pilotes et exprimé N-SORT dans *P. pastoris* en vue d'en déterminer la structure libre et en présence de ligands. Plusieurs paramètres influent sur l'expression des protéines dans *P. pastoris* et son rendement : le promoteur utilisé, le choix du vecteur et de la souche, la concentration de méthanol et le temps d'induction. Le promoteur AOX1 inducible au méthanol a été utilisé. Le système d'expression de protéines hétérologues *P. pastoris* permet l'usage de promoteurs fortement régulés comme AOX1, ce qui présente des avantages pour la surexpression des protéines. Par ailleurs, la séparation de la phase de production de la protéine de celle de croissance des levures réduit leur stress en permettant l'accumulation de la biomasse avant l'induction de l'expression protéique. L'expression de protéines potentiellement toxiques pour *P. pastoris* est également possible (Ahmad et al. 2014). La première partie du métabolisme du méthanol chez cette levure est son oxydation en formaldéhyde en utilisant l'oxygène moléculaire sous l'action d'une enzyme : l'alcool oxydase (AOX). L'alcool oxydase ayant une faible affinité pour l'O<sub>2</sub>, *P. pastoris* compense en produisant de grandes quantités de l'enzyme. Le promoteur qui régule la production de l'alcool oxydase est le même utilisé pour contrôler l'expression des

protéines d'intérêt. Par ailleurs, nous avons choisi une sélection des transformants positifs basée sur l'auxotrophie à l'adénine et les séquences étaient précédées du peptide signal  $\alpha$ -facteur de *S. cerevisiae* pour une sécrétion extracellulaire donc dans le milieu de culture. Le gène ADE2 code pour la phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, qui catalyse la sixième étape de la biosynthèse de novo des nucléotides puriques (Jones & Fink, 1982). Chez plusieurs levures, les mutations du gène ADE2 entraînent l'accumulation des précurseurs des purines dans la vacuole, ce qui confère une coloration rouge à la colonie. Les quatre souches utilisées au départ étant auxotrophes *ade2*, elles ne peuvent se développer sur un milieu dépourvu d'adénine suite à la délétion complète du gène ADE2 et d'une partie de son promoteur. En outre, elles ont une croissance lente sur un milieu riche. Le vecteur pPINK $\alpha$ HC ayant servi au clonage des gènes d'intérêt contient une version tronquée du gène ADE2, sous le contrôle de son propre promoteur, comme marqueur de sélection. La transformation des souches avec les plasmides d'expression leur permet de se développer à nouveau sur un milieu manquant d'adénine. Grâce à l'intégration de l'ADN recombinant, les nucléotides puriques sont synthétisés, leurs précurseurs ne sont plus accumulés dans les vacuoles et les colonies sont de couleur blanche. L'utilisation de la souche *ade2* double knock-out pour la protéinase A et pour un précurseur de la protéinase B a limité la dégradation de TgN-SORT par ces deux protéinases très abondantes chez cette levure. TgN-SORT et ses partenaires étaient exprimées de manière optimale sous 2% de méthanol pendant 72 heures. Sajitha et. al ont eu recours au même système pour exprimer la L-asparaginase d'*E. coli* en 2015 et cette enzyme était active (Sajitha et. al., 2015). Toutefois, l'expression ou non d'une protéine recombinante dépend également de la nature du gène à exprimer. Diverses protéines de *T. gondii* ont déjà été exprimées dans *P. pastoris* et ont montré des activités biologiques. En 2010, Lau et al ont produit GRA4 extracellulaire en utilisant le promoteur AOX1 dans des conditions optimales de 0,75% de méthanol et 96 heures d'induction. La souche X-33 a été utilisée, les transformants positifs ont été sélectionnés avec de la zéocine et le test de western blot d'antigénicité de la protéine en utilisant des sérums humains positifs à la toxoplasmose s'est révélé positif (Lau et al. 2010). GRA2 exprimée dans le même système avec 1% de méthanol pendant 5 jours a également gardé son antigénicité (Lau et al, 2012). Chang et al, ont également exprimé ROP2 dans le même système avec 1% de méthanol pendant 48 heures et en western blot, cette protéine était apte à être détectée par les IgG et IgM (Chang et al., 2011). L'expression de SAG1 et GRA2 dans une souche de *P. pastoris* GS115 avec sélection des transformants à la zéocine a de même été concluante et ces protéines recombinantes étaient

actives car elles ont entraîné chez des souris des réponses humorale et cellulaire fortes (Zhou et al. 2007).

Par conséquent, divers systèmes de *P. pastoris* offrant une sélection soit colorimétrique soit à usage d'antibiotique peuvent être employés pour produire les protéines d'intérêt. Mais le système colorimétrique dont nous avons fait usage a l'avantage de prévenir les erreurs de pipetage éventuelles et l'utilisation d'antibiotique de mauvaise qualité.

Trois grandes méthodes sont utilisées pour résoudre la structure 3D des macromolécules biologiques : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la cristallographie aux rayons X et la cryomicroscopie électronique. La RMN est consacrée aux très petites protéines le plus souvent d'au plus 30 kDa et la cryoEM est en général réservée aux grosses protéines et complexes moléculaires d'au moins 150 kDa. En ce qui concerne la cristallographie aux rayons X, elle offre une grande précision dans la position des atomes mais nécessite une grande quantité de protéine pure à 95% (1-10 mg environs) et l'obtention de cristaux n'est pas toujours effective. Nous avons réalisé dans un premier temps des essais de cristallographie de *TgN-SORT* qui n'ont pas été concluants. L'analyse de la propension au désordre de la protéine a révélé la présence de domaines flexibles le long de la protéine. Certaines de ces régions correspondent à ces insertions précédemment décrites par l'équipe et qui sont exclusivement retrouvées dans les sortilines des *Apicomplexa* (Sloves et al. 2012). Plusieurs de ces domaines étant localisés à l'intérieur de *TgN-SORT*, leur retrait aurait déstructuré la protéine. C'est la raison pour laquelle nous avons uniquement enlevé les deux domaines flexibles situés aux extrémités. La *TgN-SORT* tronquée produite n'a pas cristallisé non plus. Par ailleurs, nous avons eu recours à la cryoEM. Les expériences de coloration négative effectuées en prélude à cette expérience ont montré des particules de *TgN-SORT* très homogènes et bien dispersées sur les grilles. L'analyse des images acquise n'a pas permis l'obtention de la structure 3D définitive à une résolution satisfaisante. Néanmoins la structure obtenue présente une forme torique évoquant celle de la sortiline humaine.

L'algorithme Alphafold 2 nous a permis la modélisation de la structure tridimensionnelle de *TgN-SORT*. Ce qui a confirmé la similitude avec la sortiline humaine avec laquelle *TgSORT* partage 27% d'identité.

La structure tertiaire de certaines protéines présente des domaines  $\beta$ -propellers. L'architecture de ces domaines est formée par un arrangement de plusieurs feuillets  $\beta$  antiparallèles et tordus, disposés radialement autour d'un tunnel central (Pons et al. 2003). Dans le cas des récepteurs à

domaine Vps10p-D, quatre feuillets  $\beta$  composent chaque domaine  $\beta$ -propeller. Quistgaard et collaborateurs ont déterminé par cristallographie en 2009 la structure tridimensionnelle de l'ectodomaine de Sortilin (sSortilin, constitué exclusivement par le domaine Vps10p-D) en complexe avec la neurotensine. Il en ressort que Vps10p-D est constitué des dix domaines  $\beta$ -propellers (résidus 45 à 576) suivis par deux petits domaines 10CC-a et 10CC-b (résidus 577-633 et 634-716 respectivement) formant le module 10CC à faible structure secondaire qui interagit avec l'hélice des  $\beta$ -propellers. Cette étude a révélé que le neuropeptide de 13 acides aminés constituant la neurotensine se lie à la sortiline à l'intérieur du tunnel formé par les dix domaines  $\beta$ -propellers, plus précisément sur le brin 1 du sixième domaine  $\beta$ -propeller. Une glycosylation est retrouvée sur le bord interne au niveau du brin 1 du septième domaine  $\beta$ -propeller sur l'asparagine 373. Une deuxième glycosylation est présente sur l'Asn549 sur le bord externe du côté de l'hélice interagissant avec le module 10CC.

En outre, des études de compétition ont suggéré l'existence de sites de liaison supplémentaires pour d'autres ligands à l'intérieur du tunnel. Une grande partie des ligands de Sortilin se lierait à cet endroit (Quistgaard et al. 2009c). Le propeptide joue également un rôle important en empêchant la liaison prématurée des ligands excepté chez SorCS3 et SorLA. Le module 10CC représente également un autre site de liaison identifié dans la fixation du proNGF, RAP et GDNF chez Sortilin et SorLA (Westergaard et al. 2004b). La résolution de la structure à pH acide révèle une dimérisation de Sortilin entraînant un changement de conformation qui rend les sites de fixation des ligands inaccessibles (Janulienė, 2017). C'est ce qui permet la libération des ligands. Cette dimérisation joue un rôle important dans le trafic des cytokines en particulier l'interféron  $\alpha$  (Yabe-Wada et al. 2018). Par contre, chez SorLA, impliqué notamment dans la maladie d'Alzheimer, il a été démontré par cryoEM que les formes monomère et dimère sont présentes à pH neutre. Cependant les auteurs n'ont pas réussi à établir une structure 3D de SorLA-Apo à une résolution satisfaisante. Il en ressort néanmoins que l'orientation du résidu R490 est importante pour la liaison du ligand. (Zhang et al. 2022).

Les prédictions d'AlphaFold2 ont révélé qu'à l'instar de sSortiline, TgN-SORT présente les trois domaines structuraux que sont le domaine N-terminal formé par les 10  $\beta$ -propellers suivi des deux domaines 10CC-a et 10CC-b. La présence de 3 insertions supplémentaires sur le domaine luminal chez TgSORT décrite dans les travaux précédents de l'équipe a été confirmée (Sloves et al. 2012).

En effet, ces insertions sont absentes chez sSortilin et se présentent sous forme de boucles ou domaines flexibles de tailles variables disposés à l'extérieur du tunnel et probablement impliqués dans des fonctions spécifiques chez le parasite.

La présence de modifications post-traductionnelles chez TgSORT n'a pas été rapportée, ni identifiée par Alphafold2. Ces modifications post-traductionnelles pourraient être détectées par immunoprécipitation avec des billes d'affinité ou par spectrométrie de masse.

Les différentes modélisations avec TgN-SORT et les domaines flexibles N-terminaux des protéines ROP1, ROP5 et ROP16 ont montré que les prodomaines se lient à TgN-SORT à l'intérieur du tunnel au même site de liaison que la neurotensine chez sSortilin. Ce qui n'est pas le cas pour les protéines des micronèmes. TgSORT lierait donc un motif désordonné des propeptides de ROP1, ROP5 et ROP16 afin de transporter les complexes formés par les protéines de rhoptries du post-Golgi vers l'ELC. Des dimérisations pH-dépendantes pourraient également intervenir comme cela a été démontré chez les homologues afin de libérer le récepteur de ces ligands avant son transport rétrograde vers le post-Golgi. Ces observations doivent être confirmées de manière expérimentale. Contrairement à l'homme, TgSORT ne possède pas la voie alternative du M6P pour ce transport de ses protéines, ce qui fait que la présence de ce récepteur lui est encore plus vitale.

Toutes les études structure-fonction de TgSORT ont pour but de déterminer les bases moléculaires de l'interaction du récepteur avec ses ligands afin d'identifier des inhibiteurs qui pourraient devenir de nouveaux médicaments antiparasitaires. Lors de nos études, nous avons découvert l'expression Golgi/endosome dans un compartiment central du parasite alors que les protéines sont plus loin au niveau de l'apex. Ce qui pourrait nous permettre de mettre au point un système de criblage basé sur de l'imagerie afin de perturber cette polarité morphologique. Nous avons donc fabriqué un parasite transgénique qui exprime TgSORT-GFP et ROP1-mCherry, ce qui signifie que nous avons une expression simultanée d'un signal vert et rouge distinct. Ainsi, si un inhibiteur perturbe cette localisation distincte, le vert et rouge se mélangeraient pour devenir jaune donc nous aurions alors identifié une drogue qui est capable de détruire la morphologie du parasite. Nos derniers travaux ont consisté à l'utilisation du parasite transgénique modèle, au criblage et à la validation des inhibiteurs identifiés.

La toxoplasmose et le paludisme sont contractés par des millions de personnes chaque année, ce qui conduit à une mortalité élevée. En 2021, le rapport de l'Organisation mondiale de la santé

(OMS) a estimé à 241 millions le nombre de cas de paludisme dans le monde en 2020 avec 627 000 décès essentiellement dans les pays du sud. Malgré cet impact sanitaire important, certaines difficultés majeures entravent le traitement efficace de ces parasitoses. Les médicaments actuels utilisés contre la toxoplasmose provoquent des effets secondaires graves tels que des atteintes au foie et à la moelle épinière. Ces traitements sont également inefficaces contre les kystes de bradyzoïtes. On note par ailleurs une forte résistance des souches de *P. falciparum* même aux derniers traitements disponibles notamment les CTA. Cet état des choses a conduit au recours à une stratégie de reconversion de médicaments dédiés au traitement d'autres pathologies comme ce fut le cas récemment pour l'anticancéreux Altiratinib. Il a été démontré que ce médicament cible la TgPRP4K (*T. gondii* Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog) et la PfLCK3 (*P. falciparum* cyclin-dependent-like kinase 3) perturbant l'épissage chez les deux parasites. La production des protéines est affectée et cela conduit à la mort des parasites. L'Altiratinib est également efficace contre *Eimeria* et *Neospora* (Swale et al. 2022). *T. gondii* représente un modèle de choix pour le criblage de composés par immunofluorescence entre autres en raison des facilités de culture qu'il offre et de son aptitude à générer des mutations clés. La librairie que nous avons criblée contenait un large éventail de composés dont des inhibiteurs de kinase et également des perturbateurs de diverses voies cellulaires. Ditmar et al 2006 ont employé la même librairie avec une stratégie de criblage reposant sur l'inhibition de la  $\beta$ -galactosidase et identifié 94 composés dont plusieurs impliqués dans la signalisation de la dopamine ou des œstrogènes. La stratégie basée sur l'image à laquelle nous avons eu recours a abouti à la mise en exergue d'une douzaine de composés dont sept inhibiteurs de kinases, en particulier de P38 MAP kinase. Le dosage de la  $\beta$ -galactosidase a révélé des CI50 individuelles comprises entre 5  $\mu$ M et 60  $\mu$ M. Ces CI50 étaient baissaient entre 1 et 2,5  $\mu$ M lorsque des combinaisons de 3 drogues étaient testées sur *T. gondii*, traduisant une synergie d'action. Quatre drogues ont été validées sur *P. falciparum*, *T. gondii* et *P. falciparum*. Les rhoptries possède une variété de kinases qui jouent des rôles importants dans la survie des parasites. C'est le cas de ROP18 qui phosphoryle et inactive des GTPases liées à l'immunité de l'hôte, préservant le parasite de la lyse (Fentress et Sibley, 2011). Ces protéines pourraient être éventuelles cibles pour ceux des composés appartenant à la famille des inhibiteurs de kinases. L'identification des cibles de ces inhibiteurs pourraient permettre leur validation chez d'autres espèces *Apicomplexa*.





## PERSPECTIVES

Des différents travaux effectués et des résultats obtenus, les perspectives principales suivantes sont envisagées :

- Effectuer des expériences de co-immunoprécipitation entre *TgN-SORT* et les motifs de liaison identifiés chez les protéines des rhoptries, produits sous forme de peptides
- Confirmer de manière expérimentale les prédictions obtenues par Alphafold 2 en déterminant par cryoEM, la structure de *TgN-SORT* en complexe avec des protéines ROP produites à plus grande échelles ou immunoprécipitées à partir de lysats du parasite *iKOTgSORT*
- Effectuer une complémentation du mutant *iKOTgSORT* par le gène *TgSORT* contenant une délétion du domaine de liaison prédit par Alphafold 2 et analyser les phénotypes des mutants

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahmad, Mudassar, Melanie Hirz, Harald Pichler, and Helmut Schwab. 2014. "Protein Expression in *Pichia Pastoris*: Recent Achievements and Perspectives for Heterologous Protein Production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (12): 5301–17. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>.

Ajioka JW (1998) *Toxoplasma gondii*: ESTs and gene discovery. *Int J Parasitol* 28: 1025–1031

Aldebert D., Hypolite M., Cavailles P., Touquet B., Flori P., Loeuillet C., Cesbron-Delauw M.F. (2011). Development of high-throughput methods to quantify cysts of *Toxoplasma gondii*. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 79(11), 952-958

Ali MI, Abd El Wahab WM, Hamdy DA, (2019). *Toxoplasma gondii* in cancer patients receiving chemotherapy: seroprevalence and interferon gamma level. *J Parasit Dis* ; 43(3): 464–471.

Ali, Fawad, Hira Wali, Saadia Jan, Muneeba Aslam, Imtiaz Ahmad, Sahib Gul Afridi, Sulieman Shams, and Asifullah Khan. 2021. "Analyzing the Essential Proteins Set of *Plasmodium Falciparum* PF3D7 for Novel Drug Targets Identification Against Malaria." <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-383876/v1>.

Antony, Hiasindh Ashmi, and Subhash Chandra Parija. 2016. "Antimalarial Drug Resistance: An Overview." *Tropical Parasitology* 6 (1): 30–41. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.175081>.

Argy, Nicolas, and Sandrine Houzé. 2018. "Épidémiologie et Cycle Parasitaire d'un Fléau Mondial, Le Paludisme." *Actualités Pharmaceutiques* 57 (574): 18–20. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2018.01.004>.

Arrow, Kenneth J., Claire Panosian, and Hellen Gelband. 2004. *Antimalarial Drugs and Drug Resistance. Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK215631/>.

Ashley, Elizabeth A., and Aung Pyae Phy. 2018. "Drugs in Development for Malaria." *Drugs* 78 (9): 861–79. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0911-9>.

Baker, Rosanna P, Ruvini Wijetilaka, and Sinisa Urban. 2006. "Two *Plasmodium Rhomboid* Proteases Preferentially Cleave Different Adhesins Implicated in All Invasive Stages of

- Malaria.” Edited by Daniel Goldberg. *PLoS Pathogens* 2 (10): e113. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020113>.
- Balderhaar, H. J. k., and C. Ungermann. 2013. “CORVET and HOPS Tethering Complexes - Coordinators of Endosome and Lysosome Fusion.” *Journal of Cell Science* 126 (6): 1307–16. <https://doi.org/10.1242/jcs.107805>.
- Bannister, Lawrence, and Graham Mitchell. 2003. “The Ins, Outs and Roundabouts of Malaria.” *Trends in Parasitology* 19 (5): 209–13. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(03)00086-2).
- Bannister, L.H, J.M Hopkins, R.E Fowler, S Krishna, and G.H Mitchell. 2000. “A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium Falciparum Asexual Blood Stages.” *Parasitology Today* 16 (10): 427–33. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01755-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01755-5).
- Bargieri, Daniel Y., Nicole Andenmatten, Vanessa Lagal, Sabine Thiberge, Jamie A. Whitelaw, Isabelle Tardieux, Markus Meissner, and Robert Ménard. 2013. “Apical Membrane Antigen 1 Mediates Apicomplexan Parasite Attachment but Is Dispensable for Host Cell Invasion.” *Nature Communications* 4 (1): 2552. <https://doi.org/10.1038/ncomms3552>.
- Baunaure, Françoise, and Gordon Langsley. 2005. “Trafic protéique dans le globule rouge infecté par Plasmodium.” *médecine/sciences* 21 (5): 523–29. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005215523>.
- Beeson, James G., Damien R. Drew, Michelle J. Boyle, Gaoqian Feng, Freya J.I. Fowkes, and Jack S. Richards. 2016. “Merozoite Surface Proteins in Red Blood Cell Invasion, Immunity and Vaccines against Malaria.” *FEMS Microbiology Reviews* 40 (3): 343–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw001>.
- Belete, Tafere Mulaw. 2020. “Recent Progress in the Development of New Antimalarial Drugs with Novel Targets.” *Drug Design, Development and Therapy* 14 (September): 3875–89. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S265602>.
- Bennink, Sandra, Meike J. Kiesow, and Gabriele Pradel. 2016. “The Development of Malaria Parasites in the Mosquito Midgut.” *Cellular Microbiology* 18 (7): 905–18. <https://doi.org/10.1111/cmi.12604>.
- Bessieres, M. H.; Berrebi, A.; Cassaing, S.; Fillaux, J.; Cambus, J. P.; Berry, A.; Assouline, C.; Ayoubi, J. M.; Magnaval, J. F., (2009). Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, (2), 389-92.

- Bittame A. (2011) : *Toxoplasma gondii* : étude du réseau de nanotubes membranaires de la vacuole parasitophore et des protéines GRA associées. Thèse de doctorat de l'université de Grenoble, 253p.
- Boothroyd, John C., and Jean-Francois Dubremetz. 2008a. "Kiss and Spit: The Dual Roles of Toxoplasma Rhoptries." *Nature Reviews Microbiology* 6 (1): 79–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>.
- . 2008b. "Kiss and Spit: The Dual Roles of Toxoplasma Rhoptries." *Nature Reviews Microbiology* 6 (1): 79–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>.
- Breinich, Manuela S., David J.P. Ferguson, Bernardo J. Foth, Giel G. van Dooren, Maryse Lebrun, Doris V. Quon, Boris Striepen, et al. 2009. "A Dynamin Is Required for the Biogenesis of Secretory Organelles in Toxoplasma Gondii." *Current Biology* 19 (4): 277–86. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.039>.
- Briquet, Sylvie, Mathieu Gissot, and Olivier Silvie. 2022. "A Toolbox for Conditional Control of Gene Expression in Apicomplexan Parasites." *Molecular Microbiology* 117 (3): 618–31. <https://doi.org/10.1111/mmi.14821>.
- Brown M., Lappin M.R., Brown J.L., Munkhtsog B., Swanson W. F. (2005). "Exploring the Ecologic Basis for Extreme Susceptibility of Pallas' Cats (*Otocolobus manul*) to Fatal Toxoplasmosis." *Journal of Wildlife Diseases* 41 (4): 691-700.
- Brydges, Susannah D, Gale D Sherman, Susanne Nockemann, Anne Loyens, Walter Däubener, Jean-François Dubremetz, and Vern B Carruthers. 2000. "Molecular Characterization of TgMIC5, a Proteolytically Processed Antigen Secreted from the Micronemes of Toxoplasma Gondii." *Molecular and Biochemical Parasitology* 111 (1): 51–66. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00296-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00296-6).
- Brydges, Susannah D., Xing Wang Zhou, My-Hang Huynh, Jill M. Harper, Jeffrey Mital, Koku D. Z. Adjogble, Walter Däubener, Gary E. Ward, and Vern B. Carruthers. 2006. "Targeted Deletion of MIC5 Enhances Trimming Proteolysis of Toxoplasma Invasion Proteins." *Eukaryotic Cell* 5 (12): 2174–83. <https://doi.org/10.1128/EC.00163-06>.
- Burrows, Jeremy N., Stephan Duparc, Winston E. Gutteridge, Rob Hooft van Huijsduijnen, Wiweka Kaszubska, Fiona Macintyre, Sébastien Mazzuri, Jörg J. Möhrle, and Timothy N. C. Wells. 2017. "New Developments in Anti-Malarial Target Candidate and Product Profiles." *Malaria Journal* 16 (January): 26. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1675-x>.



- Busula, Annette O., Niels O. Verhulst, Teun Bousema, Willem Takken, and Jetske G. de Boer. 2017. "Mechanisms of Plasmodium-Enhanced Attraction of Mosquito Vectors." *Trends in Parasitology* 33 (12): 961–73. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.010>.
- Butcher, Barbara A., Barbara A. Fox, Leah M. Rommereim, Sung Guk Kim, Kirk J. Maurer, Felix Yarovinsky, De'Broski R. Herbert, David J. Bzik, and Eric Y. Denkers. 2011. "Toxoplasma Gondii Rhopty 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>.
- Calero-Bernal R, Gennari SM. Clinical toxoplasmosis in dogs and cats: an update. *Front Vet Sci.* 2019;6:54
- Carruthers V.B., et Sibley L.D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 114-123.
- Chalhoub, 2012. La toxoplasmose. Thèse de doctorat : Université libanaise, 181p
- Chaturvedi, Sudha, Huilin Qi, David Coleman, Anna Rodriguez, Phyllis I. Hanson, Boris Striepen, David S. Roos, and Keith A. Joiner. 1999. "Constitutive Calcium-Independent Release of Toxoplasma Gondii Dense Granules Occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab Machinery." *Journal of Biological Chemistry* 274 (4): 2424–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2424>.
- Coppi, Alida, Rita Tewari, Joseph R. Bishop, Brandy L. Bennett, Roger Lawrence, Jeffrey D. Esko, Oliver Billker, and Photini Sinnis. 2007. "Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to Plasmodium Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Cells." *Cell Host & Microbe* 2 (5): 316–27. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.002>.
- Cowell, Annie N, and Elizabeth A Winzeler. 2019. "The Genomic Architecture of Antimalarial Drug Resistance." *Briefings in Functional Genomics* 18 (5): 314–28. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz008>.
- Cui, Liwang, Sungano Mharakurwa, Daouda Ndiaye, Pradipsinh K. Rathod, and Philip J. Rosenthal. 2015. "Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93 (3 Suppl): 57–68. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0007>.

- Delgado, Inês L. S., Sara Zúquete, Dulce Santos, Afonso P. Basto, Alexandre Leitão, and Sofia Nolasco. 2022. "The Apicomplexan Parasite *Toxoplasma Gondii*." *Encyclopedia* 2 (1): 189–211. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010012>.
- Deligianni, Elena, Rhiannon N. Morgan, Lucia Bertuccini, Christine C. Wirth, Natalie C. Silmon de Monerri, Lefteris Spanos, Michael J. Blackman, Christos Louis, Gabriele Pradel, and Inga Siden-Kiamos. 2013. "A Perforin-like Protein Mediates Disruption of the Erythrocyte Membrane during Egress of *Plasmodium Berghei* Male Gametocytes." *Cellular Microbiology* 15 (8): 1438–55. <https://doi.org/10.1111/cmi.12131>.
- Derouin F., Bultel C., Roze S. (2005). Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Récupéré à partir de <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-Toxoplasmose.pdf>
- Dettmer, Jan, Anne Hong-Hermesdorf, York-Dieter Stierhof, and Karin Schumacher. 2006. "Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* 18 (3): 715–30. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037978>.
- Di Cristina, M., Spaccapelo, R., Soldati, D., Bistoni, F., Crisanti, A., 2000. Two conserved amino acid motifs mediate protein targeting to the micronemes of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7332–7341.
- Donald, R.G. and Roos, D.S. (1995) Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 5749–5753.
- Dou, Zhicheng, Olivia L. McGovern, Manlio Di Cristina, and Vern B. Carruthers. 2014. "Toxoplasma Gondii Ingests and Digests Host Cytosolic Proteins." *MBio* 5 (4): e01188-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01188-14>.
- Dowse, Timothy, and Dominique Soldati. 2004. "Host Cell Invasion by the Apicomplexans: The Significance of Microneme Protein Proteolysis." *Current Opinion in Microbiology* 7 (4): 388–96. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.013>.
- Dubey J. (2010). *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health*, 57(1), 60-73.
- Dubey J., Kotula A., Sharar A., Andrews, C., & Lindsay, D. (1990). Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *The Journal of Parasitology*, 201-204.

Dubey J., Lindsay D., Speer C. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267-299.

Dubey, J. P. (2008). “The History of *Toxoplasma gondii*-The First 100 Years.” *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55 (6): 467-75.

Dubremetz J.F., Achbarou A., Bermudes D., Joiner K.A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitol. Res.* 79, 402–408.

Dubois, David J., and Dominique Soldati-Favre. 2019. “Biogenesis and Secretion of Micronemes in *Toxoplasma Gondii*.” *Cellular Microbiology* 21 (5): e13018. <https://doi.org/10.1111/cmi.13018>.

El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S.T., Vial, H., Labesse, G., Dubremetz, J.F., 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 3, e14.

El Hajj, H., Papoin, J., Cerede, O., Garcia-Reguet, N., Soete, M., Dubremetz, J.F., Lebrun, M., 2008. Molecular signals in the trafficking of *Toxoplasma gondii* protein MIC3 to the micronemes. *Eukaryot. Cell* 7, 1019–1028

Elbez-Rubinstein A., D. Ajzenberg M.-L. Dardé R. Cohen A. Dumètre H. Yera E. Gondon J.-C. Janaud, P. Thulliez. (2009). “Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review.” *The Journal of Infectious Diseases* 199 (2): 280–85. <https://doi.org/10.1086/595793>.

El-Nawawi F. A., Tawfik M.A., Shaapan R. M. (2008). “Methods for Inactivation of *Toxoplasma gondii* Cysts in Meat and Tissues of Experimentally Infected Sheep.” *Foodborne Pathogens and Disease* 5 (5): 687-90. <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0060>.

Epiphanio S.I., Sinhorini J., Catão-Dias L., (2003). “Pathology of Toxoplasmosis in Captive New World Primates.” *Journal of Comparative Pathology* 129(2): 196-204.

Fentress, Sarah J., and L. David Sibley. 2011. “The Secreted Kinase ROP18 Defends *Toxoplasma*’s Border.” *BioEssays* 33 (9): 693–700. <https://doi.org/10.1002/bies.201100054>.

- Flammersfeld, Ansgar, Christina Lang, Antje Flieger, and Gabriele Pradel. 2018. "Phospholipases during Membrane Dynamics in Malaria Parasites." *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 308 (1): 129–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.015>.
- Frénel, Karine, and Dominique Soldati-Favre. 2013a. "Un complexe moléculaire unique à l'origine de la motilité et de l'invasion des Apicomplexes." *médecine/sciences* 29 (5): 515–22. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013295015>.
- . 2013b. "Un complexe moléculaire unique à l'origine de la motilité et de l'invasion des Apicomplexes." *médecine/sciences* 29 (5): 515–22. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013295015>.
- Frosch, Anne E. P., Miriam K. Laufer, Don P. Mathanga, Shannon Takala-Harrison, Jacek Skarbinski, Cassidy W. Claassen, Fraction K. Dzinjalama, and Christopher V. Plowe. 2014. "Return of Widespread Chloroquine-Sensitive Plasmodium Falciparum to Malawi." *The Journal of Infectious Diseases* 210 (7): 1110–14. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu216>.
- Gaji, Rajshekhar Y., Halley P. Flammer, and Vern B. Carruthers. 2011. "Forward Targeting of Toxoplasma Gondii Proproteins to the Micronemes Involves Conserved Aliphatic Amino Acids." *Traffic* 12 (7): 840–53. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01192.x>.
- Govindasamy, K., S. Jebiwott, D. K. Jaijyan, A. Davidow, K. K. Ojo, W. C. Van Voorhis, M. Brochet, O. Billker, and P. Bhanot. 2016. "Invasion of Hepatocytes by Plasmodium Sporozoites Requires CGMP-Dependent Protein Kinase and Calcium Dependent Protein Kinase 4." *Molecular Microbiology* 102 (2): 349–63. <https://doi.org/10.1111/mmi.13466>.
- Hakimi, Mohamed-Ali, Philipp Olias, and L. David Sibley. 2017. "Toxoplasma Effectors Targeting Host Signaling and Transcription." *Clinical Microbiology Reviews* 30 (3): 615–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-17>.
- Hallée, Stéphanie, Natalie A. Counihan, Kathryn Matthews, Tania F. de Koning-Ward, and Dave Richard. 2018. "The Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Sortilin Is Essential for Merozoite Formation and Apical Complex Biogenesis." *Cellular Microbiology* 20 (8): e12844. <https://doi.org/10.1111/cmi.12844>.
- Harper, Jill M., My-Hang Huynh, Isabelle Coppens, Fabiola Parussini, Silvia Moreno, and Vern B. Carruthers. 2006. "A Cleavable Propeptide Influences Toxoplasma Infection by Facilitating the Trafficking and Secretion of the TgMIC2–M2AP Invasion Complex."

- Edited by Ralph Isberg. *Molecular Biology of the Cell* 17 (10): 4551–63. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0064>.
- Hermeij, Guido. 2009. “The Vps10p-Domain Receptor Family.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (16): 2677–89. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0043-1>.
- Hermeij, Guido, Niels Plath, Christian A. Hübner, Dietmar Kuhl, H. Chica Schaller, and Irm Hermans-Borgmeyer. 2004. “The Three SorCS Genes Are Differentially Expressed and Regulated by Synaptic Activity.” *Journal of Neurochemistry* 88 (6): 1470–76. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2004.02286.x>.
- Hermeij, Guido, I.Björn Riedel, Wolfgang Hampe, H.Chica Schaller, and Irm Hermans-Borgmeyer. 1999. “Identification and Characterization of SorCS, a Third Member of a Novel Receptor Family.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266 (2): 347–51. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1822>.
- Howe, D. K., and L. D. Sibley. 1995. “Toxoplasma Gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease.” *Journal of Infectious Diseases* 172 (6): 1561–66. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>.
- D. Howe, L. Sibley. 1995. “Toxoplasma gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease”. “*The Journal of Infectious Diseases*, Volume 172, Issue 6, December 1995, Pages 1561–1566, <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>”
- Hu, Ke, Jeff Johnson, Laurence Florens, Martin Fraunholz, Sapna Suravajjala, Camille DiLullo, John Yates, David S Roos, and John M Murray. 2006a. “Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of Toxoplasma Gondii.” *PLoS Pathogens* 2 (2): e13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020013>.
- . 2006b. “Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of Toxoplasma Gondii.” *PLoS Pathogens* 2 (2): e13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020013>.
- 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): 2082–90. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg217>.
- Huynh, My-Hang, and Vern B Carruthers. 2006. “Toxoplasma MIC2 Is a Major Determinant of Invasion and Virulence.” Edited by John C Boothroyd. *PLoS Pathogens* 2 (8): e84. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020084>.

- Iyer, Jayasree, Anne Charlotte Grüner, Laurent Rénia, Georges Snounou, and Peter R. Preiser. 2007. “Invasion of Host Cells by Malaria Parasites: A Tale of Two Protein Families.” *Molecular Microbiology* 65 (2): 231–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05791.x>.
- Jackson, Allison J., Caroline Clucas, Nicola J. Mamczur, David J. Ferguson, and Markus Meissner. 2013. “*Toxoplasma Gondii* Syntaxin 6 Is Required for Vesicular Transport Between Endosomal-Like Compartments and the Golgi Complex: *Toxoplasma Gondii* Syntaxin 6 Is a TGN Marker.” *Traffic*, September, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/tra.12102>.
- Jacobsen, Linda, Peder Madsen, Søren K. Moestrup, Anders H. Lund, Niels Tommerup, Anders Nykjær, Lars Sottrup-Jensen, Jørgen Gliemann, and Claus M. Petersen. 1996. “Molecular Characterization of a Novel Human Hybrid-Type Receptor That Binds the A2-Macroglobulin Receptor-Associated Protein.” *Journal of Biological Chemistry* 271 (49): 31379–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31379>.
- Jimenez-Ruiz, Elena, Juliette Morlon-Guyot, Wassim Daher, and Markus Meissner. 2016. “Vacuolar Protein Sorting Mechanisms in Apicomplexan Parasites.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 209 (1–2): 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.01.007>.
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, et al. 2021. “Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold.” *Nature* 596 (7873): 583–89. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Kafsack, Björn F.C, and Vern B Carruthers. 2010. “Apicomplexan Perforin-like Proteins.” *Communicative & Integrative Biology* 3 (1): 18–23.
- Kafsack, Björn F.C., Janethe D. O. Pena, Isabelle Coppens, Sandeep Ravindran, John C. Boothroyd, and Vern B. Carruthers. 2009. “Rapid Membrane Disruption by a Perforin-Like Protein Facilitates Parasite Exit from Host Cells.” *Science (New York, N.Y.)* 323 (5913): 530–33. <https://doi.org/10.1126/science.1165740>.
- Kessler, Henning, Angelika Herm-Götz, Stephan Hegge, Manuel Rauch, Dominique Soldati-Favre, Friedrich Frischknecht, and Markus Meissner. 2008. “Microneme Protein 8 – a New Essential Invasion Factor in *Toxoplasma Gondii*.” *Journal of Cell Science* 121 (7): 947–56. <https://doi.org/10.1242/jcs.022350>.



- Khan, Shahid M., Blandine Franke-Fayard, Gunnar R. Mair, Edwin Lasonder, Chris J. Janse, Matthias Mann, and Andrew P. Waters. 2005. "Proteome Analysis of Separated Male and Female Gametocytes Reveals Novel Sex-Specific Plasmodium Biology." *Cell* 121 (5): 675–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.027>.
- Kikuno, R. 1999. "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XIV. The Complete Sequences of 100 New CDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in Vitro." *DNA Research* 6 (3): 197–205. <https://doi.org/10.1093/dnares/6.3.197>.
- Kim, Kami, and Louis M. Weiss. 2004. "Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan." *International Journal for Parasitology* 34 (3): 423–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>.
- Klein, E.Y. 2013. "Antimalarial Drug Resistance: A Review of the Biology and Strategies to Delay Emergence and Spread." *International Journal of Antimicrobial Agents* 41 (4): 311–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.007>.
- Koch, Marion, and Jake Baum. 2016. "The Mechanics of Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte – towards a Reassessment of the Host Cell Contribution." *Cellular Microbiology* 18 (3): 319–29. <https://doi.org/10.1111/cmi.12557>.
- Kremer, Katrin, Dirk Kamin, Eva Rittweger, Jonathan Wilkes, Halley Flammer, Sabine Mahler, Joanne Heng, et al. 2013. "An Overexpression Screen of Toxoplasma Gondii Rab-GTPases Reveals Distinct Transport Routes to the Micronemes." Edited by Peter J. Bradley. *PLoS Pathogens* 9 (3): e1003213. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003213>.
- Lagal, Vanessa, Emily M. Binder, My-Hang Huynh, Bjorn F. C. Kafsack, Philippa K. Harris, Roberto Diez, Dawn Chen, Robert N. Cole, Vern B. Carruthers, and Kami Kim. 2010. "Toxoplasma Gondii Protease TgSUB1 Is Required for Cell Surface Processing of Micronemal Adhesive Complexes and Efficient Adhesion of Tachyzoites: TgSUB1 Microneme Protein Processing." *Cellular Microbiology* 12 (12): 1792–1808. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01509.x>.
- Lamarque, Mauld H., Magali Roques, Marie Kong-Hap, Michelle L. Tonkin, George Rugarabamu, Jean-Baptiste Marq, Diana M. Penarete-Vargas, Martin J. Boulanger, Dominique Soldati-Favre, and Maryse Lebrun. 2014. "Plasticity and Redundancy among AMA–RON Pairs Ensure Host Cell Entry of Toxoplasma Parasites." *Nature Communications* 5 (1): 4098. <https://doi.org/10.1038/ncomms5098>.

- Lee, Sang Yup. 1996. "High Cell-Density Culture of Escherichia Coli." *Trends in Biotechnology* 14 (3): 98–105. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9).
- Li, Pingzuo, Anukanth Anumanthan, Xiu-Gong Gao, Kuppusamy Ilangovan, Vincent V. Suzara, Nejat Düzgüneş, and V. Renugopalakrishnan. 2007. "Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142 (2): 105–24. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0003-x>.
- Loubens, Manon, Laetitia Vincensini, Priyanka Fernandes, Sylvie Briquet, Carine Marinach, and Olivier Silvie. 2021. "Plasmodium Sporozoites on the Move: Switching from Cell Traversal to Productive Invasion of Hepatocytes." *Molecular Microbiology* 115 (5): 870–81. <https://doi.org/10.1111/mmi.14645>.
- McFadden, D. C., Seeber, F., and Boothroyd, J. C. Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. 41,1849-1853. doi: 10.1128/AAC.41.9.1849.
- Maier, Alexander G., Kai Matuschewski, Meng Zhang, and Melanie Rug. 2019. "Plasmodium Falciparum." *Trends in Parasitology* 35 (6): 481–82. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.010>.
- Marcusson, Eric G., Bruce F. Horazdovsky, Joan Lin Cereghino, Editte Gharakhanian, and Scott D. Emr. 1994. "The Sorting Receptor for Yeast Vacuolar Carboxypeptidase Y Is Encoded by the VPS10 Gene." *Cell* 77 (4): 579–86. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90219-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90219-4).
- Mazella, Jean, Nicole Zsürger, Valérie Navarro, Joëlle Chabry, Mourad Kaghad, Daniel Caput, Pascual Ferrara, et al. 1998. "The 100-KDa Neurotensin Receptor Is Gp95/Sortilin, A Non-G-Protein-Coupled Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26273–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26273>.
- McGovern, Olivia L., and Vern B. Carruthers. 2016. "Toxoplasma Retromer Is Here to Stay." *Trends in Parasitology* 32 (10): 758–60. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.007>.
- Meissner, Markus, Matthias Reiss, Nicola Viebig, Vern B. Carruthers, Catherine Toursel, Stanislas Tomavo, James W. Ajioka, and Dominique Soldati. 2002. "A Family of Transmembrane Microneme Proteins of *Toxoplasma Gondii* Contain EGF-like Domains and Function as Escorts." *Journal of Cell Science* 115 (3): 563–74. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.3.563>.
- Miguel-Blanco, Celia, James M. Murithi, Ernest Diez Benavente, Fiona Angrisano, Katarzyna A. Sala, Donnelly A. van Schalkwyk, Manu Vanaerschot, et al. 2021. "The Antimalarial

- Efficacy and Mechanism of Resistance of the Novel Chemotype DDD01034957.” *Scientific Reports* 11 (January): 1888. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81343-z>.
- Mital, Jeffrey, Markus Meissner, Dominique Soldati, and Gary E. Ward. 2005. “Conditional Expression of *Toxoplasma Gondii* Apical Membrane Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role in Host Cell Invasion.” *Molecular Biology of the Cell* 16 (9): 4341–49. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0281>.
- Morlon-Guyot, Juliette, Sandra Pastore, Laurence Berry, Maryse Lebrun, and Wassim Daher. 2015. “*Toxoplasma Gondii* Vps11, a Subunit of HOPS and CORVET Tethering Complexes, Is Essential for the Biogenesis of Secretory Organelles.” *Cellular Microbiology* 17 (8): 1157–78. <https://doi.org/10.1111/cmi.12426>.
- Morrisette, Naomi S., and L. David Sibley. 2002a. “Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (1): 21–38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>.
- . 2002b. “Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 66 (1): 21–38; table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>.
- Müller, Ingrid B., and John E. Hyde. 2010. “Antimalarial Drugs: Modes of Action and Mechanisms of Parasite Resistance.” *Future Microbiology* 5 (12): 1857–73. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.136>.
- Munck Petersen, C, M S Nielsen, C Jacobsen, J Tauris, L Jacobsen, J Gliemann, S K Moestrup, and P Madsen. 1999. “Propeptide Cleavage Conditions Sortilin/Neurotensin Receptor-3 for Ligand Binding.” *The EMBO Journal* 18 (3): 595–604. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.595>.
- Ngô, Huân M., Mei Yang, Kerstin Paprotka, Marc Pypaert, Heinrich Hoppe, and Keith A. Joiner. 2003. “AP-1 in *Toxoplasma Gondii* Mediates Biogenesis of the Rhoptry Secretory Organelle from a Post-Golgi Compartment.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 5343–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208291200>.
- Nielsen, Morten S., Christian Jacobsen, Gunilla Olivecrona, Jørgen Gliemann, and Claus M. Petersen. 1999. “Sortilin/Neurotensin Receptor-3 Binds and Mediates Degradation of Lipoprotein Lipase.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (13): 8832–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8832>.

- Nikolajsen, Camilla Lund, Thomas F. Dyrlund, Ebbe Toftgaard Poulsen, Jan J. Enghild, and Carsten Scavenius. 2014. "Coagulation Factor XIIIa Substrates in Human Plasma." *Journal of Biological Chemistry* 289 (10): 6526–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517904>.
- Nykjaer, Anders, Ramee Lee, Kenneth K. Teng, Pernille Jansen, Peder Madsen, Morten S. Nielsen, Christian Jacobsen, et al. 2004. "Sortilin Is Essential for ProNGF-Induced Neuronal Cell Death." *Nature* 427 (6977): 843–48. <https://doi.org/10.1038/nature02319>.
- Opitz, Corinna, and Dominique Soldati. 2002. "'The Glideosome': A Dynamic Complex Powering Gliding Motion and Host Cell Invasion by Toxoplasma Gondii." *Molecular Microbiology* 45 (3): 597–604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03056.x>.
- Ostrowicz, Clemens W., Cornelia Bröcker, Franziska Ahnert, Mirjana Nordmann, Jens Lachmann, Karolina Peplowska, Angela Perz, Kathrin Auffarth, Siegfried Engelbrecht-Vandré, and Christian Ungermann. 2010. "Defined Subunit Arrangement and Rab Interactions Are Required for Functionality of the HOPS Tethering Complex." *Traffic* 11 (10): 1334–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01097.x>.
- Packard, Randall M. 2014. "The Origins of Antimalarial-Drug Resistance." *New England Journal of Medicine* 371 (5): 397–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1403340>.
- Parussini, Fabiola, Isabelle Coppens, Parag P. Shah, Scott L. Diamond, and Vern B. Carruthers. 2010. "Cathepsin L Occupies a Vacuolar Compartment and Is a Protein Maturase within the Endo/Exocytic System of Toxoplasma Gondii." *Molecular Microbiology* 76 (6): 1340–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07181.x>.
- Paul, Aditya S., Elizabeth S. Egan, and Manoj T. Duraisingh. 2015. "Host-Parasite Interactions That Guide Red Blood Cell Invasion by Malaria Parasites." *Current Opinion in Hematology* 22 (3): 220–26. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000135>.
- Petersen, Claus M., Morten S. Nielsen, Anders Nykjær, Linda Jacobsen, Niels Tommerup, Hanne H. Rasmussen, Hans RØigaard, JØrgen Gliemann, Peder Madsen, and SØren K. Moestrup. 1997. "Molecular Identification of a Novel Candidate Sorting Receptor Purified from Human Brain by Receptor-Associated Protein Affinity Chromatography." *Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3599–3605. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3599>.
- Pflugger, Stacy L., Holly V. Goodson, Jennifer M. Moran, Christine J. Ruggiero, Xin Ye, Krista M. Emmons, and Kristin M. Hager. 2005. "Receptor for Retrograde Transport in the

- Apicomplexan Parasite *Toxoplasma Gondii*.” *Eukaryotic Cell* 4 (2): 432–42. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.432-442.2005>.
- Pons, Tirso, Raúl Gómez, Glay Chinae, and Alfonso Valencia. 2003. “Beta-Propellers: Associated Functions and Their Role in Human Diseases.” *Current Medicinal Chemistry* 10 (6): 505–24. <https://doi.org/10.2174/0929867033368204>.
- Pope, B, and H M Kent. 1996. “High Efficiency 5 Min Transformation of *Escherichia Coli*.” *Nucleic Acids Research* 24 (3): 536–37.
- Praefcke, Gerrit J. K., and Harvey T. McMahon. 2004. “The Dynamin Superfamily: Universal Membrane Tubulation and Fission Molecules?” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (2): 133–47. <https://doi.org/10.1038/nrm1313>.
- Quistgaard, Esben M, Peder Madsen, Morten K Grøftehaug, Poul Nissen, Claus M Petersen, and Søren S Thirup. 2009a. “Ligands Bind to Sortilin in the Tunnel of a Ten-Bladed  $\beta$ -Propeller Domain.” *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (1): 96–98. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1543>.
- . 2009b. “Ligands Bind to Sortilin in the Tunnel of a Ten-Bladed  $\beta$ -Propeller Domain.” *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (1): 96–98. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1543>.
- . 2009c. “Ligands Bind to Sortilin in the Tunnel of a Ten-Bladed  $\beta$ -Propeller Domain.” *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (1): 96–98. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1543>.
- Reininger, Luc, Oliver Billker, Rita Tewari, Arunima Mukhopadhyay, Clare Fennell, Dominique Dorin-Semblat, Caroline Doerig, et al. 2005. “A NIMA-Related Protein Kinase Is Essential for Completion of the Sexual Cycle of Malaria Parasites.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (36): 31957–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504523200>.
- Reiss, Matthias, Nicola Viebig, Susan Brecht, Marie-Noelle Fourmaux, Martine Soete, Manlio Di Cristina, Jean François Dubremetz, and Dominique Soldati. 2001. “Identification and Characterization of an Escorter for Two Secretory Adhesins in *Toxoplasma Gondii*.” *The Journal of Cell Biology* 152 (3): 563–78.
- Richard, Dave, Christopher A. MacRaid, David T. Riglar, Jo-Anne Chan, Michael Foley, Jake Baum, Stuart A. Ralph, Raymond S. Norton, and Alan F. Cowman. 2010. “Interaction between *Plasmodium Falciparum* Apical Membrane Antigen 1 and the Rhoptry Neck Protein Complex Defines a Key Step in the Erythrocyte Invasion Process of Malaria

- Parasites.” *The Journal of Biological Chemistry* 285 (19): 14815–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080770>.
- Riedel, Björn I., Irm Hermans-Borgmeyer, and Christian A. Hübner. 2002. “SorLA, a Member of the LDL Receptor Family, Is Expressed in the Collecting Duct of the Murine Kidney.” *Histochemistry and Cell Biology* 118 (3): 183–91. <https://doi.org/10.1007/s00418-002-0445-8>.
- Saeij, J. P. J., J. P. Boyle, S. Coller, S. Taylor, L. D. Sibley, E. T. Brooke-Powell, J. W. Ajioka, and J. C. Boothroyd. 2006. “Polymorphic Secreted Kinases Are Key Virulence Factors in Toxoplasmosis.” *Science* 314 (5806): 1780–83. <https://doi.org/10.1126/science.1133690>.
- Sakura, Takaya, Fabien Sindikubwabo, Lena Oesterlin, Hugo Bousquet, Christian Slomianny, Mohamed-Ali Hakimi, Gordon Langsley, and Stanislas Tomavo. 2016. “A Critical Role for Toxoplasma Gondii Vacuolar Protein Sorting VPS9 in Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection.” *Scientific Reports* 6 (December): 38842. <https://doi.org/10.1038/srep38842>.
- Sangaré, Lamba Omar, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, Benoit Westermann, Agnes Hovasse, Fabien Sindikubwabo, Isabelle Callebaut, Elisabeth Werkmeister, et al. 2016. “Unconventional Endosome-like Compartment and Retromer Complex in Toxoplasma Gondii Govern Parasite Integrity and Host Infection.” *Nature Communications* 7 (April). <https://doi.org/10.1038/ncomms11191>.
- Schlacht, A., E. K. Herman, M. J. Klute, M. C. Field, and J. B. Dacks. 2014. “Missing Pieces of an Ancient Puzzle: Evolution of the Eukaryotic Membrane-Trafficking System.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (10): a016048–a016048. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016048>.
- Seeber, F., and Boothroyd, J. C. *Escherichia coli* beta-galactosidase as an *in vitro* and *in vivo* reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene*. 1996. 169, 39-45. doi: 10.1016/0378-1119(95)00786-5.
- Sezonov, Guennadi, Danièle Joseleau-Petit, and Richard D’Ari. 2007. “Escherichia Coli Physiology in Luria-Bertani Broth.” *Journal of Bacteriology* 189 (23): 8746–49. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>.
- Sheiner, Lilach, Jessica L. Demerly, Nicole Poulsen, Wandy L. Beatty, Olivier Lucas, Michael S. Behnke, Michael W. White, and Boris Striepen. 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, Bang, Jeffrey S. Buguliskis, Tobie D. Lee, and L. David Sibley. 2014. “Functional Analysis of Rhomboid Proteases during *Toxoplasma* Invasion.” Edited by Louis M. Weiss. *MBio* 5 (5): e01795-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01795-14>.
- Sibley, L. David, and James W. Ajioka. 2008. “Population Structure of *Toxoplasma Gondii* : Clonal Expansion Driven by Infrequent Recombination and Selective Sweeps.” *Annual Review of Microbiology* 62 (1): 329–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162925>.
- Sibley, L. David, and John C. Boothroyd. 1992. “Virulent Strains of *Toxoplasma Gondii* Comprise a Single Clonal Lineage.” *Nature* 359 (6390): 82–85. <https://doi.org/10.1038/359082a0>.
- Simon, Stéphane, Benoit de Thoisy, Aurélien Mercier, Mathieu Nacher, and Magalie Demar. 2019. “Virulence of Atypical *Toxoplasma Gondii* Strains Isolated in French Guiana in a Murine Model.” *Parasite* 26: 60. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019048>.
- Singh, Shailja, M. Mahmood Alam, Ipsita Pal-Bhowmick, Joseph A. Brzostowski, and Chetan E. Chitnis. 2010. “Distinct External Signals Trigger Sequential Release of Apical Organelles during Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites.” *PLoS Pathogens* 6 (2): e1000746. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000746>.
- Sloves, Pierre-Julien, Stephane Delhaye, Thomas Mouveaux, Elisabeth Werkmeister, Christian Slomianny, Agnes Hovasse, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, et al. 2012. “*Toxoplasma* Sortilin-like Receptor Regulates Protein Transport and Is Essential for Apical Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection.” *Cell Host & Microbe* 11 (5): 515–27. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.03.006>.
- Sloves, Pierre-Julien, Thomas Mouveaux, Saliha Ait-Yahia, Han Vorng, Laetitia Everaere, Lamba Omar Sangare, Anne Tsicopoulos, and Stanislas Tomavo. 2015. “Apical Organelle Secretion by *Toxoplasma* Controls Innate and Adaptive Immunity and Mediates Long-Term Protection.” *The Journal of Infectious Diseases* 212 (9): 1449–58. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv250>.
- Solinger, Jachen A., and Anne Spang. 2013. “Tethering Complexes in the Endocytic Pathway: CORVET and HOPS.” *The FEBS Journal* 280 (12): 2743–57. <https://doi.org/10.1111/febs.12151>.

- Suh, Kathryn N., Kevin C. Kain, and Jay S. Keystone. 2004. "Malaria." *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* 170 (11): 1693–1702. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1030418>.
- Takala-Harrison, Shannon, and Miriam K. Laufer. 2015. "Antimalarial Drug Resistance in Africa: Key Lessons for the Future." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1342 (April): 62–67. <https://doi.org/10.1111/nyas.12766>.
- Tang, Yu-Qing, Qian Ye, He Huang, and Wei-Yi Zheng. 2020. "An Overview of Available Antimalarials: Discovery, Mode of Action and Drug Resistance." *Current Molecular Medicine* 20 (8): 583–92. <https://doi.org/10.2174/1566524020666200207123253>.
- Teng, Henry K., Kenneth K. Teng, Ramee Lee, Saundrene Wright, Seema Tevar, Ramiro D. Almeida, Pouneh Kermani, et al. 2005. "ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of P75NTR and Sortilin." *The Journal of Neuroscience* 25 (22): 5455–63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>.
- Tomavo S, Slomianny C, Meissner M & Carruthers VB. (2013) Protein trafficking through the endosomal system prepares intracellular parasites for a home invasion. **PLoS Pathogens** 9: e1003629.
- Tomavo S (2014) Evolutionarily repurposing of endosomal systems for apical organelle biogenesis in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology** 44: 133-138.
- Tomley, Fiona M, and Dominique S Soldati. 2001. "Mix and Match Modules: Structure and Function of Microneme Proteins in Apicomplexan Parasites." *Trends in Parasitology* 17 (2): 81–88. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(00\)01761-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01761-X).
- Tonkin, Christopher J., ed. 2020. *Toxoplasma Gondii: Methods and Protocols*. Vol. 2071. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9857-9>.
- Tse, Edwin G., Marat Korsik, and Matthew H. Todd. 2019. "The Past, Present and Future of Anti-Malarial Medicines." *Malaria Journal* 18 (March): 93. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>.
- Vaughan, Ashley M., and Stefan H.I. Kappe. 2017. "Malaria Parasite Liver Infection and Exoerythrocytic Biology." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7 (6): a025486. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025486>.

- Venugopal, Kannan, Franziska Hentzschel, Gediminas Valkiūnas, and Matthias Marti. 2020. “Plasmodium Asexual Growth and Sexual Development in the Haematopoietic Niche of the Host.” *Nature Reviews Microbiology* 18 (3): 177–89. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0306-2>.
- Venugopal, Kannan, and Sabrina Marion. 2018. “Secretory Organelle Trafficking in Toxoplasma Gondii: A Long Story for a Short Travel.” *International Journal of Medical Microbiology* 308 (7): 751–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.07.007>.
- Vlachou, Dina, Timm Schlegelmilch, Ellen Runn, Antonio Mendes, and Fotis C. Kafatos. 2006. “The Developmental Migration of Plasmodium in Mosquitoes.” *Pattern Formation and Developmental Mechanisms* 16 (4): 384–91. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.06.012>.
- Westergaard, Uffe B., Esben S. Sørensen, Guido Hermey, Morten S. Nielsen, Anders Nykjær, Kirstine Kirkegaard, Christian Jacobsen, Jørgen Gliemann, Peder Madsen, and Claus Munck Petersen. 2004a. “Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (48): 50221–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408873200>.
- . 2004b. “Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (48): 50221–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408873200>.
- Wicht, Kathryn J., Sachel Mok, and David A. Fidock. 2020. “Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Plasmodium Falciparum Malaria.” *Annual Review of Microbiology* 74 (September): 431–54. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115546>.
- Woo, Yong H, Hifzur Ansari, Thomas D Otto, Christen M Klinger, Martin Kolisko, Jan Michálek, Alka Saxena, et al. 2015. “Chromerid Genomes Reveal the Evolutionary Path from Photosynthetic Algae to Obligate Intracellular Parasites.” *ELife* 4 (July): e06974. <https://doi.org/10.7554/eLife.06974>.
- Wu, Shixuan, and Geoffrey J. Letchworth. 2004. “High Efficiency Transformation by Electroporation of *Pichia Pastoris* Pretreated with Lithium Acetate and Dithiothreitol.” *BioTechniques* 36 (1): 152–54. <https://doi.org/10.2144/04361DD02>.
- Yamazaki, Hiroyuki, Hideaki Bujo, Jun Kusunoki, Kouichi Seimiya, Tatsuro Kanaki, Nobuhiro Morisaki, Wolfgang Johann Schneider, and Yasushi Saito. 1996. “Elements of Neural Adhesion Molecules and a Yeast Vacuolar Protein Sorting Receptor Are Present in a Novel Mammalian Low Density Lipoprotein Receptor Family Member.” *Journal of Biological Chemistry* 271 (40): 24761–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24761>.

- Zhou, Xing W., Michael J. Blackman, Steven A. Howell, and Vern B. Carruthers. 2004. "Proteomic Analysis of Cleavage Events Reveals a Dynamic Two-Step Mechanism for Proteolysis of a Key Parasite Adhesive Complex." *Molecular & Cellular Proteomics* 3 (6): 565–76. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300123-MCP200>.
- Gaji, R.Y., Flammer, H.P., Carruthers, V.B., 2011. Forward targeting of *Toxoplasma gondii* proproteins to the micronemes involves conserved aliphatic amino acids. *Traffic* 12, 840–853.
- Gilbert RE, Freeman K, Lago EG. (2008). For the European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* ; 2(8): e277.
- Hakimi, M.A., Olias, P., Sibley, L.D., 2017. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 615–645.
- Halonen S.K., et Weiss L.M. (2013). "Chapter 8 - Toxoplasmosis." *Handbook of Clinical Neurology* 114: 125-45.
- Hamidović A (2020). Comprendre la diversité génétique de *Toxoplasma gondii* au Bénin au travers de ses hôtes et de son génome : des influences humaines et environnementales. Thèse de doctorat de l'Université de Limoges, 170p.
- Harper, J.M., Huynh, M.H., Coppens, I., Parussini, F., Moreno, S., Carruthers, V.B., 2006. A cleavable propeptide influences *Toxoplasma* infection by facilitating the trafficking and secretion of the TgMIC2-M2AP invasion complex. *Mol. Biol. Cell* 17, 4551–4563.
- He C.Y.; Shaw M.K.; Pletcher C.H.; Striepen B.; Tilney L.G.; Roos, D. S., (2001). A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Embo J*, 20, (3), 330-9.
- Hill, D.; Dubey, J. P., (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*, 8, (10), 634-40.
- Hoppe, H.C., Ngo, H.M., Yang, M., Joiner, K.A., 2000. Targeting to rhoptry organelles of *Toxoplasma gondii* involves evolutionarily conserved mechanisms. *Nat. Cell Biol.* 2, 449–456.
- Huynh, M.H., Rabenau, K.E., Harper, J.M., Beatty, W.L., Sibley, L.D., Carruthers, V.B., 2003. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *EMBO J.* 22, 2082–2090.

Innes E. A., Bartley P. M., Maley S. W., Wright S. E., Buxton, D. (2007): Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine* 25, 5495-503.

Jones EW, Fink, GR (1982) In: Strathern JN, Jones EW, Broach JR (eds) *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp 181–299

Khan A.S., Taylor C., Su A.J., Mackey J., Boyle R., Cole D., Glover K., Tang I.T., Paulsen M., Berriman J.C., Boothroyd E.R., Pfefferkorn J.P., Dubey J.W., Ajioka D.S., Roos J.C., Wootton L. D. Sibley. (2005). “Composite Genome Map and Recombination Parameters Derived from Three Archetypal Lineages of *Toxoplasma gondii*.” *Nucleic Acids Research* 33 (9): 2980-92.

Köhler S.; Delwiche C. F.; Denny P.W.; Tilney L. G.; Webster P.; Wilson R. J.; Palmer J. D.; Roos D. S., (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*, 275(5305), 1485-9.

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., Meissner, M., 2013. An overexpression screen of *Toxoplasma gondii* Rab-GTPases reveals distinct transport routes to the micronemes. *PLoS Pathog.* 9, e1003213.

McAuley JB. Congenital toxoplasmosis. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2014;3 (Suppl 1):S30-35.

N. Leloup, P. Lössl, H. Meijer, M. Brennich, A. J.R. Heck, Dominique M.E. Thies-Weesie & Bert J.C. Janssen. 2017. “ Low pH-induced conformational change and dimerization of sortilin triggers endocytosed ligand release”. “Nature communications”

Ngo, 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. *J. Biol. Chem.* 278, 5343–5352.

Nicolle, C., et L. Manceaux. L. (1908). “Sur Une Infection à Corps de Leishman (Ou Organismes Voisins) Du Gondi.” *CR Acad Sci* 147 (763).

Nishi, M., Hu, K., Murray, J.M., Roos, D.S., 2008. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 121, 1559–1568.

Owen M.R., Clarkson M.J., Trees A.J. (1998): Acute phase toxoplasma abortions in sheep. *Vet Rec* 142, 480-2.

Park Y-H, Nam H-W. Clinical features and treatment of ocular toxoplasmosis. *Korean J Parasitol.* 2013; 51 (4):393-399.

Pelletier L.; Stern C.A.; Pypaert M.; Sheff D.; Ngo 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), 548-52.

Pfaff AW, De-la-torre A, Rochet E, (2014). New clinical and experimental insights into old world and neotropical ocular toxoplasmosis. *Int J Parasitol* ; 44 (2):99-107.

Robert-Gangneux F, Dardé M-L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 25(2):264-296.

Roos D.S.; Crawford M.J.; Donald R.G.; Kissinger J.C.; Klimczak L.J.; Striepen B., (1999). Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol*, 2, (4), 426-32.

Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*, Advances and Challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-17. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

**Seeber F., Boothroyd J.C. 1996.** *Escherichia coli* beta-galactosidase as an *in vitro* and *in vivo* reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene*, 169(1), 39-45.

Speer CA, Dubey JP. (2005). Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol.* 35 (2):193–206.

Splendore A. (1908). "Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo". Nota preliminare pel. *Rev. Soc. Scient. Sao Paulo*, 3, pp. 109-112.

Taila A.K., Hingwe A. S., Johnson L.E. (2011). "Toxoplasmosis in a Patient Who Was Immunocompetent: A Case Report." *Journal of Medical Case Reports* 5 (1): 16.

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30(12), 1217-1258.



Tilley M, Fichera ME, Jerome ME, (1997). *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. *Infect Immun.* 65 (11):4598–4605.

Tourdjman M., Tchéandjieu C., De Valk H., V. Goulet. (2015). “Toxoplasmose Chez Les Femmes Enceintes En France: Évolution de La Séroprévalence et Des Facteurs Associés Entre 1995 et 2010, à Partir Des Enquêtes Nationales Périnatales.” *Bull Epidemiol Hebd*, 15-16.

Van Dooren GG, Striepen B. (2013). The algal past and parasite present of the apicoplast. *Annu Rev Microbiol.* 67:271-289.

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 Pathog.* 13, e1006331.

Villeneuve, A. (2003). *Les zoonoses parasitaires: l'infection chez les animaux et chez l'homme: Les Presses de l'Université de Montréal (PUM).*

Wang Z-D, Wang S-C, Liu -H-H. (2017). Prevalence and burden of *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected people: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV.* 4 (4):e177-e188.

Wilson, R. J., and D. H. Williamson. 1997. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:1–16.

Zhu G., Marchewka M.J., Keithly J.S. (2000). *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology (Reading, Engl.)* 146 (Pt 2), 315-321.

Ahmad, Mudassar, Melanie Hirz, Harald Pichler, and Helmut Schwab. 2014. “Protein Expression in *Pichia Pastoris*: Recent Achievements and Perspectives for Heterologous Protein Production.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (12): 5301–17. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>.

Ali, Fawad, Hira Wali, Saadia Jan, Muneeba Aslam, Imtiaz Ahmad, Sahib Gul Afridi, Suliaman Shams, and Asifullah Khan. 2021. “Analyzing the Essential Proteins Set of Plasmodium

- Falciparum PF3D7&nbsp;for Novel Drug Targets Identification Against Malari.”  
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-383876/v1>.
- Antony, Hiasindh Ashmi, and Subhash Chandra Parija. 2016. “Antimalarial Drug Resistance: An Overview.” *Tropical Parasitology* 6 (1): 30–41. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.175081>.
- Argy, Nicolas, and Sandrine Houzé. 2018. “Épidémiologie et Cycle Parasitaire d’un Fléau Mondial, Le Paludisme.” *Actualités Pharmaceutiques* 57 (574): 18–20. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2018.01.004>.
- Arrow, Kenneth J., Claire Panosian, and Hellen Gelband. 2004. *Antimalarial Drugs and Drug Resistance. Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK215631/>.
- Ashley, Elizabeth A., and Aung Pyae Phyo. 2018. “Drugs in Development for Malaria.” *Drugs* 78 (9): 861–79. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0911-9>.
- Baker, Rosanna P, Ruvini Wijetilaka, and Sinisa Urban. 2006. “Two Plasmodium Rhomboid Proteases Preferentially Cleave Different Adhesins Implicated in All Invasive Stages of Malaria.” Edited by Daniel Goldberg. *PLoS Pathogens* 2 (10): e113. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020113>.
- Balderhaar, H. J. k., and C. Ungermann. 2013. “CORVET and HOPS Tethering Complexes - Coordinators of Endosome and Lysosome Fusion.” *Journal of Cell Science* 126 (6): 1307–16. <https://doi.org/10.1242/jcs.107805>.
- Bannister, Lawrence, and Graham Mitchell. 2003. “The Ins, Outs and Roundabouts of Malaria.” *Trends in Parasitology* 19 (5): 209–13. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(03)00086-2).
- Bannister, L.H, J.M Hopkins, R.E Fowler, S Krishna, and G.H Mitchell. 2000. “A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium Falciparum Asexual Blood Stages.” *Parasitology Today* 16 (10): 427–33. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01755-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01755-5).
- Bargieri, Daniel Y., Nicole Andenmatten, Vanessa Lagal, Sabine Thiberge, Jamie A. Whitelaw, Isabelle Tardieux, Markus Meissner, and Robert Ménard. 2013. “Apical Membrane Antigen 1 Mediates Apicomplexan Parasite Attachment but Is Dispensable for Host Cell Invasion.” *Nature Communications* 4 (1): 2552. <https://doi.org/10.1038/ncomms3552>.

- Baunaure, Françoise, and Gordon Langsley. 2005. "Trafic protéique dans le globule rouge infecté par Plasmodium." *médecine/sciences* 21 (5): 523–29. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005215523>.
- Beeson, James G., Damien R. Drew, Michelle J. Boyle, Gaoqian Feng, Freya J.I. Fowkes, and Jack S. Richards. 2016. "Merozoite Surface Proteins in Red Blood Cell Invasion, Immunity and Vaccines against Malaria." *FEMS Microbiology Reviews* 40 (3): 343–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw001>.
- Belete, Tafere Mulaw. 2020. "Recent Progress in the Development of New Antimalarial Drugs with Novel Targets." *Drug Design, Development and Therapy* 14 (September): 3875–89. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S265602>.
- Bennink, Sandra, Meike J. Kiesow, and Gabriele Pradel. 2016. "The Development of Malaria Parasites in the Mosquito Midgut." *Cellular Microbiology* 18 (7): 905–18. <https://doi.org/10.1111/cmi.12604>.
- Boothroyd, John C., and Jean-Francois Dubremetz. 2008a. "Kiss and Spit: The Dual Roles of Toxoplasma Rhoptries." *Nature Reviews Microbiology* 6 (1): 79–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>.
- . 2008b. "Kiss and Spit: The Dual Roles of Toxoplasma Rhoptries." *Nature Reviews Microbiology* 6 (1): 79–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>.
- Breinich, Manuela S., David J.P. Ferguson, Bernardo J. Foth, Giel G. van Dooren, Maryse Lebrun, Doris V. Quon, Boris Striepen, et al. 2009. "A Dynamin Is Required for the Biogenesis of Secretory Organelles in Toxoplasma Gondii." *Current Biology* 19 (4): 277–86. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.039>.
- Briquet, Sylvie, Mathieu Gissot, and Olivier Silvie. 2022. "A Toolbox for Conditional Control of Gene Expression in Apicomplexan Parasites." *Molecular Microbiology* 117 (3): 618–31. <https://doi.org/10.1111/mmi.14821>.
- Brydges, Susannah D, Gale D Sherman, Susanne Nockemann, Anne Loyens, Walter Däubener, Jean-François Dubremetz, and Vern B Carruthers. 2000. "Molecular Characterization of TgMIC5, a Proteolytically Processed Antigen Secreted from the Micronemes of Toxoplasma Gondii." *Molecular and Biochemical Parasitology* 111 (1): 51–66. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00296-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00296-6).

- Brydges, Susannah D., Xing Wang Zhou, My-Hang Huynh, Jill M. Harper, Jeffrey Mital, Koku D. Z. Adjogble, Walter Däubener, Gary E. Ward, and Vern B. Carruthers. 2006. “Targeted Deletion of *MIC5* Enhances Trimming Proteolysis of *Toxoplasma* Invasion Proteins.” *Eukaryotic Cell* 5 (12): 2174–83. <https://doi.org/10.1128/EC.00163-06>.
- Burrows, Jeremy N., Stephan Duparc, Winston E. Gutteridge, Rob Hooft van Huijsduijnen, Wiweka Kaszubska, Fiona Macintyre, Sébastien Mazzuri, Jörg J. Möhrle, and Timothy N. C. Wells. 2017. “New Developments in Anti-Malarial Target Candidate and Product Profiles.” *Malaria Journal* 16 (January): 26. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1675-x>.
- Busula, Annette O., Niels O. Verhulst, Teun Bousema, Willem Takken, and Jetske G. de Boer. 2017. “Mechanisms of Plasmodium-Enhanced Attraction of Mosquito Vectors.” *Trends in Parasitology* 33 (12): 961–73. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.010>.
- Butcher, Barbara A., Barbara A. Fox, Leah M. Rommereim, Sung Guk Kim, Kirk J. Maurer, Felix Yarovinsky, De’Broski R. Herbert, David J. Bzik, and Eric Y. Denkers. 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>.
- Chalhoub, 2012. La toxoplasmose. Thèse de doctorat : Université libanaise, 181p
- Chaturvedi, Sudha, Huilin Qi, David Coleman, Anna Rodriguez, Phyllis I. Hanson, Boris Striepen, David S. Roos, and Keith A. Joiner. 1999. “Constitutive Calcium-Independent Release of Toxoplasma Gondii Dense Granules Occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab Machinery.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (4): 2424–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2424>.
- Coppi, Alida, Rita Tewari, Joseph R. Bishop, Brandy L. Bennett, Roger Lawrence, Jeffrey D. Esko, Oliver Billker, and Photini Sinnis. 2007. “Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to Plasmodium Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Cells.” *Cell Host & Microbe* 2 (5): 316–27. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.002>.
- Cowell, Annie N, and Elizabeth A Winzeler. 2019. “The Genomic Architecture of Antimalarial Drug Resistance.” *Briefings in Functional Genomics* 18 (5): 314–28. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elz008>.
- Cui, Liwang, Sungano Mharakurwa, Daouda Ndiaye, Pradipsinh K. Rathod, and Philip J. Rosenthal. 2015. “Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and

- Findings of the ICEMR Network.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 93 (3 Suppl): 57–68. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0007>.
- Delgado, Inês L. S., Sara Zúquete, Dulce Santos, Afonso P. Basto, Alexandre Leitão, and Sofia Nolasco. 2022. “The Apicomplexan Parasite *Toxoplasma Gondii*.” *Encyclopedia* 2 (1): 189–211. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010012>.
- Deligianni, Elena, Rhiannon N. Morgan, Lucia Bertuccini, Christine C. Wirth, Natalie C. Silmon de Monerri, Lefteris Spanos, Michael J. Blackman, Christos Louis, Gabriele Pradel, and Inga Siden-Kiamos. 2013. “A Perforin-like Protein Mediates Disruption of the Erythrocyte Membrane during Egress of *Plasmodium Berghei* Male Gametocytes.” *Cellular Microbiology* 15 (8): 1438–55. <https://doi.org/10.1111/cmi.12131>.
- Dettmer, Jan, Anne Hong-Hermesdorf, York-Dieter Stierhof, and Karin Schumacher. 2006. “Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in *Arabidopsis*.” *The Plant Cell* 18 (3): 715–30. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037978>.
- Dou, Zhicheng, Olivia L. McGovern, Manlio Di Cristina, and Vern B. Carruthers. 2014. “*Toxoplasma Gondii* Ingests and Digests Host Cytosolic Proteins.” *MBio* 5 (4): e01188-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01188-14>.
- Dowse, Timothy, and Dominique Soldati. 2004. “Host Cell Invasion by the Apicomplexans: The Significance of Microneme Protein Proteolysis.” *Current Opinion in Microbiology* 7 (4): 388–96. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.013>.
- Dubois, David J., and Dominique Soldati-Favre. 2019. “Biogenesis and Secretion of Micronemes in *Toxoplasma Gondii*.” *Cellular Microbiology* 21 (5): e13018. <https://doi.org/10.1111/cmi.13018>.
- Fentress, Sarah J., and L. David Sibley. 2011. “The Secreted Kinase ROP18 Defends *Toxoplasma*’s Border.” *BioEssays* 33 (9): 693–700. <https://doi.org/10.1002/bies.201100054>.
- Flammersfeld, Ansgar, Christina Lang, Antje Flieger, and Gabriele Pradel. 2018. “Phospholipases during Membrane Dynamics in Malaria Parasites.” *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 308 (1): 129–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.015>.
- Frénal, Karine, and Dominique Soldati-Favre. 2013a. “Un complexe moléculaire unique à l’origine de la motilité et de l’invasion des Apicomplexes.” *médecine/sciences* 29 (5): 515–22. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013295015>.

- . 2013b. “Un complexe moléculaire unique à l’origine de la motilité et de l’invasion des Apicomplexes.” *médecine/sciences* 29 (5): 515–22. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013295015>.
- Frosch, Anne E. P., Miriam K. Laufer, Don P. Mathanga, Shannon Takala-Harrison, Jacek Skarbinski, Cassidy W. Claassen, Fraction K. Dzinjalama, and Christopher V. Plowe. 2014. “Return of Widespread Chloroquine-Sensitive Plasmodium Falciparum to Malawi.” *The Journal of Infectious Diseases* 210 (7): 1110–14. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu216>.
- Gaji, Rajshekhar Y., Halley P. Flammer, and Vern B. Carruthers. 2011. “Forward Targeting of Toxoplasma Gondii Proproteins to the Micronemes Involves Conserved Aliphatic Amino Acids.” *Traffic* 12 (7): 840–53. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01192.x>.
- Govindasamy, K., S. Jebiwott, D. K. Jaijyan, A. Davidow, K. K. Ojo, W. C. Van Voorhis, M. Brochet, O. Billker, and P. Bhanot. 2016. “Invasion of Hepatocytes by Plasmodium Sporozoites Requires CGMP-Dependent Protein Kinase and Calcium Dependent Protein Kinase 4.” *Molecular Microbiology* 102 (2): 349–63. <https://doi.org/10.1111/mmi.13466>.
- Hakimi, Mohamed-Ali, Philipp Olias, and L. David Sibley. 2017. “Toxoplasma Effectors Targeting Host Signaling and Transcription.” *Clinical Microbiology Reviews* 30 (3): 615–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-17>.
- Hallée, Stéphanie, Natalie A. Counihan, Kathryn Matthews, Tania F. de Koning-Ward, and Dave Richard. 2018. “The Malaria Parasite Plasmodium Falciparum Sortilin Is Essential for Merozoite Formation and Apical Complex Biogenesis.” *Cellular Microbiology* 20 (8): e12844. <https://doi.org/10.1111/cmi.12844>.
- Harper, Jill M., My-Hang Huynh, Isabelle Coppens, Fabiola Parussini, Silvia Moreno, and Vern B. Carruthers. 2006. “A Cleavable Propeptide Influences Toxoplasma Infection by Facilitating the Trafficking and Secretion of the TgMIC2–M2AP Invasion Complex.” Edited by Ralph Isberg. *Molecular Biology of the Cell* 17 (10): 4551–63. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0064>.
- Hermey, Guido. 2009. “The Vps10p-Domain Receptor Family.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (16): 2677–89. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0043-1>.
- Hermey, Guido, Niels Plath, Christian A. Hübner, Dietmar Kuhl, H. Chica Schaller, and Irm Hermans-Borgmeyer. 2004. “The Three SorCS Genes Are Differentially Expressed and



- Regulated by Synaptic Activity.” *Journal of Neurochemistry* 88 (6): 1470–76. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2004.02286.x>.
- Herney, Guido, I.Björn Riedel, Wolfgang Hampe, H.Chica Schaller, and Irm Hermans-Borgmeyer. 1999. “Identification and Characterization of SorCS, a Third Member of a Novel Receptor Family.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266 (2): 347–51. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1822>.
- Howe, D. K., and L. D. Sibley. 1995. “Toxoplasma Gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease.” *Journal of Infectious Diseases* 172 (6): 1561–66. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>.
- Hu, Ke, Jeff Johnson, Laurence Florens, Martin Fraunholz, Sapna Suravajjala, Camille DiLullo, John Yates, David S Roos, and John M Murray. 2006a. “Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of Toxoplasma Gondii.” *PLoS Pathogens* 2 (2): e13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020013>.
- . 2006b. “Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of Toxoplasma Gondii.” *PLoS Pathogens* 2 (2): e13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020013>.
- 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): 2082–90. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg217>.
- Huynh, My-Hang, and Vern B Carruthers. 2006. “Toxoplasma MIC2 Is a Major Determinant of Invasion and Virulence.” Edited by John C Boothroyd. *PLoS Pathogens* 2 (8): e84. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020084>.
- Iyer, Jayasree, Anne Charlotte Grüner, Laurent Rénia, Georges Snounou, and Peter R. Preiser. 2007. “Invasion of Host Cells by Malaria Parasites: A Tale of Two Protein Families.” *Molecular Microbiology* 65 (2): 231–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05791.x>.
- Jackson, Allison J., Caroline Clucas, Nicola J. Mamczur, David J. Ferguson, and Markus Meissner. 2013. “Toxoplasma Gondii Syntaxin 6 Is Required for Vesicular Transport Between Endosomal-Like Compartments and the Golgi Complex: Toxoplasma Gondii Syntaxin 6 Is a TGN Marker.” *Traffic*, September, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/tra.12102>.

- Jacobsen, Linda, Peder Madsen, Søren K. Moestrup, Anders H. Lund, Niels Tommerup, Anders Nykjær, Lars Sottrup-Jensen, Jørgen Gliemann, and Claus M. Petersen. 1996. "Molecular Characterization of a Novel Human Hybrid-Type Receptor That Binds the A2-Macroglobulin Receptor-Associated Protein." *Journal of Biological Chemistry* 271 (49): 31379–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31379>.
- Jimenez-Ruiz, Elena, Juliette Morlon-Guyot, Wassim Daher, and Markus Meissner. 2016. "Vacuolar Protein Sorting Mechanisms in Apicomplexan Parasites." *Molecular and Biochemical Parasitology* 209 (1–2): 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.01.007>.
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, et al. 2021. "Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold." *Nature* 596 (7873): 583–89. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Kafsack, Björn F.C, and Vern B Carruthers. 2010. "Apicomplexan Perforin-like Proteins." *Communicative & Integrative Biology* 3 (1): 18–23.
- Kafsack, Björn F.C., Janethe D. O. Pena, Isabelle Coppens, Sandeep Ravindran, John C. Boothroyd, and Vern B. Carruthers. 2009. "Rapid Membrane Disruption by a Perforin-Like Protein Facilitates Parasite Exit from Host Cells." *Science (New York, N.Y.)* 323 (5913): 530–33. <https://doi.org/10.1126/science.1165740>.
- Kessler, Henning, Angelika Herm-Götz, Stephan Hegge, Manuel Rauch, Dominique Soldati-Favre, Friedrich Frischknecht, and Markus Meissner. 2008. "Microneme Protein 8 – a New Essential Invasion Factor in *Toxoplasma Gondii*." *Journal of Cell Science* 121 (7): 947–56. <https://doi.org/10.1242/jcs.022350>.
- Khan, Shahid M., Blandine Franke-Fayard, Gunnar R. Mair, Edwin Lasonder, Chris J. Janse, Matthias Mann, and Andrew P. Waters. 2005. "Proteome Analysis of Separated Male and Female Gametocytes Reveals Novel Sex-Specific Plasmodium Biology." *Cell* 121 (5): 675–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.027>.
- Kikuno, R. 1999. "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XIV. The Complete Sequences of 100 New CDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in Vitro." *DNA Research* 6 (3): 197–205. <https://doi.org/10.1093/dnares/6.3.197>.

- Kim, Kami, and Louis M. Weiss. 2004. "Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan." *International Journal for Parasitology* 34 (3): 423–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>.
- Klein, E.Y. 2013. "Antimalarial Drug Resistance: A Review of the Biology and Strategies to Delay Emergence and Spread." *International Journal of Antimicrobial Agents* 41 (4): 311–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.007>.
- Koch, Marion, and Jake Baum. 2016. "The Mechanics of Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte – towards a Reassessment of the Host Cell Contribution." *Cellular Microbiology* 18 (3): 319–29. <https://doi.org/10.1111/cmi.12557>.
- Kremer, Katrin, Dirk Kamin, Eva Rittweger, Jonathan Wilkes, Halley Flammer, Sabine Mahler, Joanne Heng, et al. 2013. "An Overexpression Screen of Toxoplasma Gondii Rab-GTPases Reveals Distinct Transport Routes to the Micronemes." Edited by Peter J. Bradley. *PLoS Pathogens* 9 (3): e1003213. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003213>.
- Lagal, Vanessa, Emily M. Binder, My-Hang Huynh, Bjorn F. C. Kafsack, Philippa K. Harris, Roberto Diez, Dawn Chen, Robert N. Cole, Vern B. Carruthers, and Kami Kim. 2010. "Toxoplasma Gondii Protease TgSUB1 Is Required for Cell Surface Processing of Micronemal Adhesive Complexes and Efficient Adhesion of Tachyzoites: TgSUB1 Microneme Protein Processing." *Cellular Microbiology* 12 (12): 1792–1808. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01509.x>.
- Lamarque, Mauld H., Magali Roques, Marie Kong-Hap, Michelle L. Tonkin, George Rugarabamu, Jean-Baptiste Marq, Diana M. Penarete-Vargas, Martin J. Boulanger, Dominique Soldati-Favre, and Maryse Lebrun. 2014. "Plasticity and Redundancy among AMA–RON Pairs Ensure Host Cell Entry of Toxoplasma Parasites." *Nature Communications* 5 (1): 4098. <https://doi.org/10.1038/ncomms5098>.
- Lee, Sang Yup. 1996. "High Cell-Density Culture of Escherichia Coli." *Trends in Biotechnology* 14 (3): 98–105. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9).
- Li, Pingzuo, Anukanth Anumanthan, Xiu-Gong Gao, Kuppusamy Ilangovan, Vincent V. Suzara, Nejat Düzgüneş, and V. Renugopalakrishnan. 2007. "Expression of Recombinant Proteins in Pichia Pastoris." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142 (2): 105–24. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0003-x>.

- Loubens, Manon, Laetitia Vincensini, Priyanka Fernandes, Sylvie Briquet, Carine Marinach, and Olivier Silvie. 2021. "Plasmodium Sporozoites on the Move: Switching from Cell Traversal to Productive Invasion of Hepatocytes." *Molecular Microbiology* 115 (5): 870–81. <https://doi.org/10.1111/mmi.14645>.
- McFadden, D. C., Seeber, F., and Boothroyd, J. C. [Use of \*Toxoplasma gondii\* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro](#). *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. 41,1849-1853. doi: 10.1128/AAC.41.9.1849.
- Maier, Alexander G., Kai Matuschewski, Meng Zhang, and Melanie Rug. 2019. "Plasmodium Falciparum." *Trends in Parasitology* 35 (6): 481–82. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.010>.
- Marcusson, Eric G., Bruce F. Horazdovsky, Joan Lin Cereghino, Editte Gharakhanian, and Scott D. Emr. 1994. "The Sorting Receptor for Yeast Vacuolar Carboxypeptidase Y Is Encoded by the VPS10 Gene." *Cell* 77 (4): 579–86. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90219-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90219-4).
- Mazella, Jean, Nicole Zsürger, Valérie Navarro, Joëlle Chabry, Mourad Kaghad, Daniel Caput, Pascual Ferrara, et al. 1998. "The 100-KDa Neurotensin Receptor Is Gp95/Sortilin, A Non-G-Protein-Coupled Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26273–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26273>.
- McGovern, Olivia L., and Vern B. Carruthers. 2016. "Toxoplasma Retromer Is Here to Stay." *Trends in Parasitology* 32 (10): 758–60. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.007>.
- Meissner, Markus, Matthias Reiss, Nicola Viebig, Vern B. Carruthers, Catherine Tournel, Stanislas Tomavo, James W. Ajioka, and Dominique Soldati. 2002. "A Family of Transmembrane Microneme Proteins of *Toxoplasma Gondii* Contain EGF-like Domains and Function as Escorts." *Journal of Cell Science* 115 (3): 563–74. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.3.563>.
- Miguel-Blanco, Celia, James M. Murithi, Ernest Diez Benavente, Fiona Angrisano, Katarzyna A. Sala, Donnelly A. van Schalkwyk, Manu Vanaerschot, et al. 2021. "The Antimalarial Efficacy and Mechanism of Resistance of the Novel Chemotype DDD01034957." *Scientific Reports* 11 (January): 1888. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81343-z>.
- Mital, Jeffrey, Markus Meissner, Dominique Soldati, and Gary E. Ward. 2005. "Conditional Expression of *Toxoplasma Gondii* Apical Membrane Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role in Host Cell Invasion." *Molecular Biology of the Cell* 16 (9): 4341–49. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0281>.

- Morlon-Guyot, Juliette, Sandra Pastore, Laurence Berry, Maryse Lebrun, and Wassim Daher. 2015. "Toxoplasma Gondii Vps11, a Subunit of HOPS and CORVET Tethering Complexes, Is Essential for the Biogenesis of Secretory Organelles." *Cellular Microbiology* 17 (8): 1157–78. <https://doi.org/10.1111/cmi.12426>.
- Morrisette, Naomi S., and L. David Sibley. 2002a. "Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (1): 21–38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>.
- . 2002b. "Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 66 (1): 21–38; table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>.
- Müller, Ingrid B., and John E. Hyde. 2010. "Antimalarial Drugs: Modes of Action and Mechanisms of Parasite Resistance." *Future Microbiology* 5 (12): 1857–73. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.136>.
- Munck Petersen, C, M S Nielsen, C Jacobsen, J Tauris, L Jacobsen, J Gliemann, S K Moestrup, and P Madsen. 1999. "Propeptide Cleavage Conditions Sortilin/Neurotensin Receptor-3 for Ligand Binding." *The EMBO Journal* 18 (3): 595–604. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.595>.
- Ngô, Huân M., Mei Yang, Kerstin Paprotka, Marc Pypaert, Heinrich Hoppe, and Keith A. Joiner. 2003. "AP-1 in Toxoplasma Gondii Mediates Biogenesis of the Rhoptry Secretory Organelle from a Post-Golgi Compartment." *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 5343–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208291200>.
- Nielsen, Morten S., Christian Jacobsen, Gunilla Olivecrona, Jørgen Gliemann, and Claus M. Petersen. 1999. "Sortilin/Neurotensin Receptor-3 Binds and Mediates Degradation of Lipoprotein Lipase." *Journal of Biological Chemistry* 274 (13): 8832–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8832>.
- Nikolajsen, Camilla Lund, Thomas F. Dyrland, Ebbe Toftgaard Poulsen, Jan J. Enghild, and Carsten Scavenius. 2014. "Coagulation Factor XIIIa Substrates in Human Plasma." *Journal of Biological Chemistry* 289 (10): 6526–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517904>.
- Nykjaer, Anders, Ramee Lee, Kenneth K. Teng, Pernille Jansen, Peder Madsen, Morten S. Nielsen, Christian Jacobsen, et al. 2004. "Sortilin Is Essential for ProNGF-Induced Neuronal Cell Death." *Nature* 427 (6977): 843–48. <https://doi.org/10.1038/nature02319>.

- Opitz, Corinna, and Dominique Soldati. 2002. “‘The Glideosome’: A Dynamic Complex Powering Gliding Motion and Host Cell Invasion by *Toxoplasma Gondii*.” *Molecular Microbiology* 45 (3): 597–604. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03056.x>.
- Ostrowicz, Clemens W., Cornelia Bröcker, Franziska Ahnert, Mirjana Nordmann, Jens Lachmann, Karolina Peplowska, Angela Perz, Kathrin Auffarth, Siegfried Engelbrecht-Vandré, and Christian Ungermann. 2010. “Defined Subunit Arrangement and Rab Interactions Are Required for Functionality of the HOPS Tethering Complex.” *Traffic* 11 (10): 1334–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01097.x>.
- Packard, Randall M. 2014. “The Origins of Antimalarial-Drug Resistance.” *New England Journal of Medicine* 371 (5): 397–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1403340>.
- Parussini, Fabiola, Isabelle Coppens, Parag P. Shah, Scott L. Diamond, and Vern B. Carruthers. 2010. “Cathepsin L Occupies a Vacuolar Compartment and Is a Protein Maturase within the Endo/Exocytic System of *Toxoplasma Gondii*.” *Molecular Microbiology* 76 (6): 1340–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07181.x>.
- Paul, Aditya S., Elizabeth S. Egan, and Manoj T. Duraisingh. 2015. “Host-Parasite Interactions That Guide Red Blood Cell Invasion by Malaria Parasites.” *Current Opinion in Hematology* 22 (3): 220–26. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000135>.
- Petersen, Claus M., Morten S. Nielsen, Anders Nykjær, Linda Jacobsen, Niels Tommerup, Hanne H. Rasmussen, Hans RØigaard, JØrgen Gliemann, Peder Madsen, and SØren K. Moestrup. 1997. “Molecular Identification of a Novel Candidate Sorting Receptor Purified from Human Brain by Receptor-Associated Protein Affinity Chromatography.” *Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3599–3605. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3599>.
- Pflugger, Stacy L., Holly V. Goodson, Jennifer M. Moran, Christine J. Ruggiero, Xin Ye, Krista M. Emmons, and Kristin M. Hager. 2005. “Receptor for Retrograde Transport in the Apicomplexan Parasite *Toxoplasma Gondii*.” *Eukaryotic Cell* 4 (2): 432–42. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.432-442.2005>.
- Pons, Tirso, Raúl Gómez, Glay Chinae, and Alfonso Valencia. 2003. “Beta-Propellers: Associated Functions and Their Role in Human Diseases.” *Current Medicinal Chemistry* 10 (6): 505–24. <https://doi.org/10.2174/09298670333368204>.
- Pope, B, and H M Kent. 1996. “High Efficiency 5 Min Transformation of *Escherichia Coli*.” *Nucleic Acids Research* 24 (3): 536–37.



- Praefcke, Gerrit J. K., and Harvey T. McMahon. 2004. "The Dynamin Superfamily: Universal Membrane Tubulation and Fission Molecules?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (2): 133–47. <https://doi.org/10.1038/nrm1313>.
- Quistgaard, Esben M, Peder Madsen, Morten K Grøftehaug, Poul Nissen, Claus M Petersen, and Søren S Thirup. 2009a. "Ligands Bind to Sortilin in the Tunnel of a Ten-Bladed  $\beta$ -Propeller Domain." *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (1): 96–98. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1543>.
- . 2009b. "Ligands Bind to Sortilin in the Tunnel of a Ten-Bladed  $\beta$ -Propeller Domain." *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (1): 96–98. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1543>.
- . 2009c. "Ligands Bind to Sortilin in the Tunnel of a Ten-Bladed  $\beta$ -Propeller Domain." *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (1): 96–98. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1543>.
- Reininger, Luc, Oliver Billker, Rita Tewari, Arunima Mukhopadhyay, Clare Fennell, Dominique Dorin-Semblat, Caroline Doerig, et al. 2005. "A NIMA-Related Protein Kinase Is Essential for Completion of the Sexual Cycle of Malaria Parasites." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (36): 31957–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504523200>.
- Reiss, Matthias, Nicola Viebig, Susan Brecht, Marie-Noelle Fourmaux, Martine Soete, Manlio Di Cristina, Jean François Dubremetz, and Dominique Soldati. 2001. "Identification and Characterization of an Escorter for Two Secretory Adhesins in *Toxoplasma Gondii*." *The Journal of Cell Biology* 152 (3): 563–78.
- Richard, Dave, Christopher A. MacRaid, David T. Riglar, Jo-Anne Chan, Michael Foley, Jake Baum, Stuart A. Ralph, Raymond S. Norton, and Alan F. Cowman. 2010. "Interaction between *Plasmodium Falciparum* Apical Membrane Antigen 1 and the Rhoptry Neck Protein Complex Defines a Key Step in the Erythrocyte Invasion Process of Malaria Parasites." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (19): 14815–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080770>.
- Riedel, Björn I., Irm Hermans-Borgmeyer, and Christian A. Hübner. 2002. "SorLA, a Member of the LDL Receptor Family, Is Expressed in the Collecting Duct of the Murine Kidney." *Histochemistry and Cell Biology* 118 (3): 183–91. <https://doi.org/10.1007/s00418-002-0445-8>.

- Saeij, J. P. J., J. P. Boyle, S. Coller, S. Taylor, L. D. Sibley, E. T. Brooke-Powell, J. W. Ajioka, and J. C. Boothroyd. 2006. “Polymorphic Secreted Kinases Are Key Virulence Factors in Toxoplasmosis.” *Science* 314 (5806): 1780–83. <https://doi.org/10.1126/science.1133690>.
- Sakura, Takaya, Fabien Sindikubwabo, Lena Oesterlin, Hugo Bousquet, Christian Slomianny, Mohamed-Ali Hakimi, Gordon Langsley, and Stanislas Tomavo. 2016. “A Critical Role for Toxoplasma Gondii Vacuolar Protein Sorting VPS9 in Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection.” *Scientific Reports* 6 (December): 38842. <https://doi.org/10.1038/srep38842>.
- Sangaré, Lamba Omar, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, Benoit Westermann, Agnes Hovasse, Fabien Sindikubwabo, Isabelle Callebaut, Elisabeth Werkmeister, et al. 2016. “Unconventional Endosome-like Compartment and Retromer Complex in Toxoplasma Gondii Govern Parasite Integrity and Host Infection.” *Nature Communications* 7 (April). <https://doi.org/10.1038/ncomms11191>.
- Schlacht, A., E. K. Herman, M. J. Klute, M. C. Field, and J. B. Dacks. 2014. “Missing Pieces of an Ancient Puzzle: Evolution of the Eukaryotic Membrane-Trafficking System.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (10): a016048–a016048. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016048>.
- Seeber, F., and Boothroyd, J. C. *Escherichia coli* beta-galactosidase as an *in vitro* and *in vivo* reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene*. 1996. 169, 39-45. doi: 10.1016/0378-1119(95)00786-5.
- Sezonov, Guennadi, Danièle Joseleau-Petit, and Richard D’Ari. 2007. “Escherichia Coli Physiology in Luria-Bertani Broth.” *Journal of Bacteriology* 189 (23): 8746–49. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>.
- Sheiner, Lilach, Jessica L. Demerly, Nicole Poulsen, Wandy L. Beatty, Olivier Lucas, Michael S. Behnke, Michael W. White, and Boris Striepen. 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, Bang, Jeffrey S. Buguliskis, Tobie D. Lee, and L. David Sibley. 2014. “Functional Analysis of Rhomboid Proteases during *Toxoplasma* Invasion.” Edited by Louis M. Weiss. *MBio* 5 (5): e01795-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01795-14>.

- Sibley, L. David, and James W. Ajioka. 2008. "Population Structure of *Toxoplasma Gondii* : Clonal Expansion Driven by Infrequent Recombination and Selective Sweeps." *Annual Review of Microbiology* 62 (1): 329–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162925>.
- Sibley, L. David, and John C. Boothroyd. 1992. "Virulent Strains of *Toxoplasma Gondii* Comprise a Single Clonal Lineage." *Nature* 359 (6390): 82–85. <https://doi.org/10.1038/359082a0>.
- Simon, Stéphane, Benoit de Thoisy, Aurélien Mercier, Mathieu Nacher, and Magalie Demar. 2019. "Virulence of Atypical *Toxoplasma Gondii* Strains Isolated in French Guiana in a Murine Model." *Parasite* 26: 60. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019048>.
- Singh, Shailja, M. Mahmood Alam, Ipsita Pal-Bhowmick, Joseph A. Brzostowski, and Chetan E. Chitnis. 2010. "Distinct External Signals Trigger Sequential Release of Apical Organelles during Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites." *PLoS Pathogens* 6 (2): e1000746. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000746>.
- Sloves, Pierre-Julien, Stephane Delhaye, Thomas Mouveaux, Elisabeth Werkmeister, Christian Slomianny, Agnes Hovasse, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, et al. 2012. "Toxoplasma Sortilin-like Receptor Regulates Protein Transport and Is Essential for Apical Secretory Organelle Biogenesis and Host Infection." *Cell Host & Microbe* 11 (5): 515–27. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.03.006>.
- Sloves, Pierre-Julien, Thomas Mouveaux, Saliha Ait-Yahia, Han Vorng, Laetitia Everaere, Lamba Omar Sangare, Anne Tscopoulos, and Stanislas Tomavo. 2015. "Apical Organelle Secretion by *Toxoplasma* Controls Innate and Adaptive Immunity and Mediates Long-Term Protection." *The Journal of Infectious Diseases* 212 (9): 1449–58. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv250>.
- Solinger, Jachen A., and Anne Spang. 2013. "Tethering Complexes in the Endocytic Pathway: CORVET and HOPS." *The FEBS Journal* 280 (12): 2743–57. <https://doi.org/10.1111/febs.12151>.
- Suh, Kathryn N., Kevin C. Kain, and Jay S. Keystone. 2004. "Malaria." *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* 170 (11): 1693–1702. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1030418>.
- Swale C, Bellini V, Bowler MW, Flore N, Brenier-Pinchart MP, Cannella D, Belmudes L, Mas C, Couté Y, Laurent F, Scherf A, Bougdour A, Hakimi MA, development by selectively targeting a spliceosome kinase. *Sci Transl Med*, 14(656):eabn3231(2022)

- Takala-Harrison, Shannon, and Miriam K. Laufer. 2015. “Antimalarial Drug Resistance in Africa: Key Lessons for the Future.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1342 (April): 62–67. <https://doi.org/10.1111/nyas.12766>.
- Tang, Yu-Qing, Qian Ye, He Huang, and Wei-Yi Zheng. 2020. “An Overview of Available Antimalarials: Discovery, Mode of Action and Drug Resistance.” *Current Molecular Medicine* 20 (8): 583–92. <https://doi.org/10.2174/1566524020666200207123253>.
- Teng, Henry K., Kenneth K. Teng, Ramee Lee, Saundrene Wright, Seema Tevar, Ramiro D. Almeida, Pouneh Kermani, et al. 2005. “ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of P75NTR and Sortilin.” *The Journal of Neuroscience* 25 (22): 5455–63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>.
- Tomavo S, Slomianny C, Meissner M & Carruthers VB. (2013) Protein trafficking through the endosomal system prepares intracellular parasites for a home invasion. **PLoS Pathogens** 9: e1003629.
- Tomavo S (2014) Evolutionarily repurposing of endosomal systems for apical organelle biogenesis in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology** 44: 133-138.
- Tomley, Fiona M, and Dominique S Soldati. 2001. “Mix and Match Modules: Structure and Function of Microneme Proteins in Apicomplexan Parasites.” *Trends in Parasitology* 17 (2): 81–88. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(00\)01761-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01761-X).
- Tonkin, Christopher J., ed. 2020. *Toxoplasma Gondii: Methods and Protocols*. Vol. 2071. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9857-9>.
- Tse, Edwin G., Marat Korsik, and Matthew H. Todd. 2019. “The Past, Present and Future of Anti-Malarial Medicines.” *Malaria Journal* 18 (March): 93. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>.
- Vaughan, Ashley M., and Stefan H.I. Kappe. 2017. “Malaria Parasite Liver Infection and Exoerythrocytic Biology.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7 (6): a025486. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025486>.
- Venugopal, Kannan, Franziska Hentzschel, Gediminas Valkiūnas, and Matthias Marti. 2020. “Plasmodium Asexual Growth and Sexual Development in the Haematopoietic Niche of

- the Host.” *Nature Reviews Microbiology* 18 (3): 177–89. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0306-2>.
- Venugopal, Kannan, and Sabrina Marion. 2018. “Secretory Organelle Trafficking in Toxoplasma Gondii: A Long Story for a Short Travel.” *International Journal of Medical Microbiology* 308 (7): 751–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.07.007>.
- Vlachou, Dina, Timm Schlegelmilch, Ellen Runn, Antonio Mendes, and Fotis C. Kafatos. 2006. “The Developmental Migration of Plasmodium in Mosquitoes.” *Pattern Formation and Developmental Mechanisms* 16 (4): 384–91. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.06.012>.
- Westergaard, Uffe B., Esben S. Sørensen, Guido Hermey, Morten S. Nielsen, Anders Nykjær, Kirstine Kirkegaard, Christian Jacobsen, Jørgen Gliemann, Peder Madsen, and Claus Munck Petersen. 2004a. “Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (48): 50221–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408873200>.
- . 2004b. “Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (48): 50221–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408873200>.
- Wicht, Kathryn J., Sachel Mok, and David A. Fidock. 2020. “Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Plasmodium Falciparum Malaria.” *Annual Review of Microbiology* 74 (September): 431–54. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115546>.
- Woo, Yong H, Hifzur Ansari, Thomas D Otto, Christen M Klinger, Martin Kolisko, Jan Michálek, Alka Saxena, et al. 2015. “Chromerid Genomes Reveal the Evolutionary Path from Photosynthetic Algae to Obligate Intracellular Parasites.” *ELife* 4 (July): e06974. <https://doi.org/10.7554/eLife.06974>.
- Wu, Shixuan, and Geoffrey J. Letchworth. 2004. “High Efficiency Transformation by Electroporation of *Pichia Pastoris* Pretreated with Lithium Acetate and Dithiothreitol.” *BioTechniques* 36 (1): 152–54. <https://doi.org/10.2144/04361DD02>.
- Yamazaki, Hiroyuki, Hideaki Bujo, Jun Kusunoki, Kouichi Seimiya, Tatsuro Kanaki, Nobuhiro Morisaki, Wolfgang Johann Schneider, and Yasushi Saito. 1996. “Elements of Neural Adhesion Molecules and a Yeast Vacuolar Protein Sorting Receptor Are Present in a Novel Mammalian Low Density Lipoprotein Receptor Family Member.” *Journal of Biological Chemistry* 271 (40): 24761–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24761>.
- Zhou, Xing W., Michael J. Blackman, Steven A. Howell, and Vern B. Carruthers. 2004. “Proteomic Analysis of Cleavage Events Reveals a Dynamic Two-Step Mechanism for Proteolysis of

a Key Parasite Adhesive Complex.” *Molecular & Cellular Proteomics* 3 (6): 565–76.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.M300123-MCP200>.